

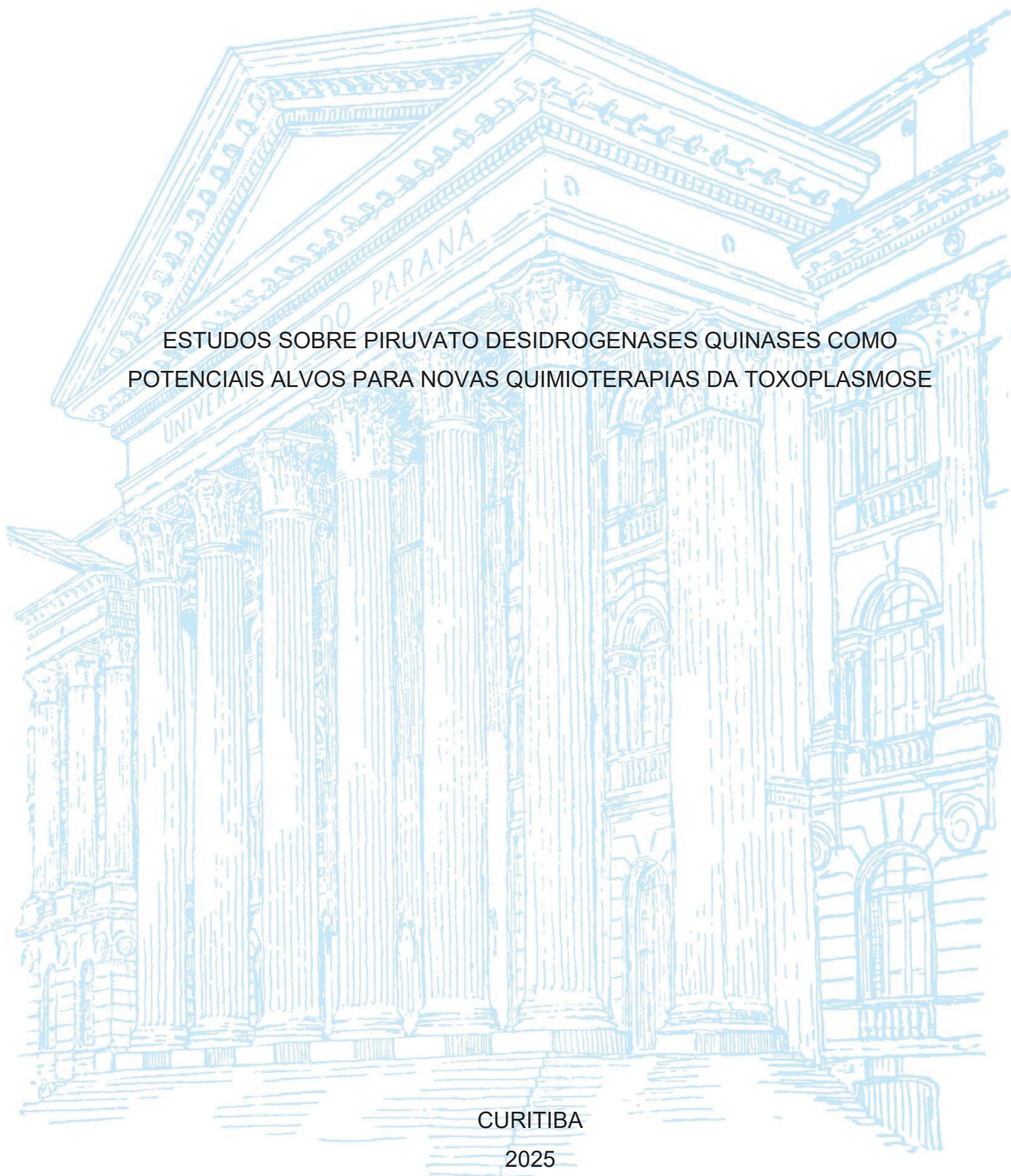
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DENIS AMILTON DOS SANTOS

ESTUDOS SOBRE PIRUVATO DESIDROGENASES QUINASES COMO
POTENCIAIS ALVOS PARA NOVAS QUIMIOTERAPIAS DA TOXOPLASMOSE

CURITIBA

2025



DENIS AMILTON DOS SANTOS

ESTUDOS SOBRE PIRUVATO DESIDROGENASES QUINASES COMO
POTENCIAIS ALVOS PARA NOVAS QUIMIOTERAPIAS DA TOXOPLASMOSE

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof. Dr^a. Andréa Rodrigues Ávila

CURITIBA

2025

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Santos, Denis Amilton dos

Estudos sobre piruvato desidrogenases quinases como potenciais alvos para novas quimioterapias da toxoplasmose / Denis Amilton dos Santos. – Curitiba, 2025.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof. Dr^a. Andréa Rodrigues Ávila.

1. Toxoplasma gondii. 2. Farmacocinética. 3. Complexo piruvato desidrogenase. 4. Tratamento farmacológico. 5. Piruvato desidrogenase quinases. I. Ávila, Andréa Rodrigues. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. III. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
 UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
 PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
 MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **DENIS AMILTON DOS SANTOS** intitulada: **Estudos sobre piruvato desidrogenases quinases como potenciais alvos para novas quimioterapias da toxoplasmose**, sob orientação da Profa. Dra. ANDRÉA RODRIGUES ÁVILA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Janeiro de 2025.

Assinatura Eletrônica

28/01/2025 10:34:24.0

ANDRÉA RODRIGUES ÁVILA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

28/01/2025 11:25:53.0

AUGUSTO SAVIO PEIXOTO RAMOS

Avaliador Externo (INSTITUTO CARLOS CHAGAS)

Assinatura Eletrônica

28/01/2025 12:39:00.0

NILSON IVO TONIN ZANCHIN

Avaliador Interno (INSTITUTO CARLOS CHAGAS)

Assinatura Eletrônica

28/01/2025 07:59:40.0

ADRIANA LUDWIG

Avaliador Externo (UNIVERSITY OF LIVERPOOL)

Assinatura Eletrônica

28/01/2025 11:40:26.0

RICARDO ANDREZ MACHADO DE AVILA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE)

Rua Cel Francisco H. dos Santos, 100. - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1676 - E-mail: pgbiocel@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 421401

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 421401

Dedico esse trabalho:

À minha esposa Daniela Mundim,
por todo o apoio, mesmo nos momentos
mais difíceis de saúde.

Aos meus pais, Amilton e Eliete,
por sempre me apoiarem.

E a todos os que contribuíram direta
e indiretamente para a minha formação
e para o desenvolvimento deste projeto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e coragem para prosseguir na vida acadêmica, mesmo com todas as dificuldades enfrentadas, seja pela fé que mantive durante o tratamento do linfoma, que me afastou das atividades da pesquisa por certo momento, seja por me manter firme e com a motivação necessária para superar os percalços que surgiram durante o desenvolvimento desse projeto.

Agradeço à Daniela Mundim, minha esposa, que me amparou e fez todo o possível durante todo o meu tratamento e ao longo dessa caminhada. Agradeço também a meus pais, que me apoiaram e fizeram todo o possível para me apoiar em todos os momentos.

Agradeço enormemente pelo apoio e orientação da Prof^a Dr^a Andréa Ávila, que me recebeu em seu laboratório e pela confiança depositada em mim durante o andamento do doutorado. Agradeço à Prof^a Tatiana Brasil pelo apoio na discussão de dados da pesquisa. Quero agradecer também por toda a equipe do LAPAPI e Plataformas Tecnológicas do ICC que apoiaram a execução desse projeto.

Agradeço também às Prof^{as} Sheila e Letusa, pelas discussões em grupo, avaliações e trocas de informações que foram muito úteis na forma de pensar as melhores estratégias para se atingir os objetivos do projeto. Quero agradecer também ao Éden Freire, pelos ensinamentos e discussões muito produtivas na área de filogenia e evolução dos organismos. Ao meu grande amigo Paulo Roberto, pelos auxílios no uso de ferramentas de *docking* molecular, e ao Luiz Fernando, que me auxiliou em vários momentos no laboratório e pelos auxílios na área de proteômica.

E um agradecimento à CAPES pela bolsa de doutorado e às demais agências de fomento que apoiaram direta ou indiretamente no fornecimento dos recursos necessários para a realização desse projeto. E assim como na vida, quando trabalhamos em equipe, os obstáculos nunca são grandes o suficiente que não podem ser superados, sendo que cada pequena vitória se torna uma conquista que podemos compartilhar. E como diria o autor espanhol Miguel de Cervantes: *“Quando se sonha sozinho é apenas um sonho. Quando se sonha junto é o começo da realidade.”*

“Maravilhar-se é o primeiro passo para um descobrimento” ...
Louis Pasteur

RESUMO

Toxoplasma gondii constitui o agente etiológico da toxoplasmose, doença de abrangência global e que afeta principalmente pacientes imunocomprometidos e bebês durante o desenvolvimento gestacional, desencadeando severas manifestações clínicas que incluem encefalite, alterações oculares e até mesmo transtornos psiquiátricos. Os fármacos atuais apresentam diversos efeitos adversos aos pacientes e são efetivos apenas sobre a fase proliferativa dos parasitos. Uma das possíveis vias a serem exploradas para novos tratamentos pode estar relacionada ao metabolismo energético de *Toxoplasma*, que diferente dos demais organismos, privilegia as vias glicolíticas como principal fonte de ATP. Na literatura é apontado que na ausência do complexo piruvato desidrogenase (PDH) mitocondrial em *Toxoplasma* e demais apicomplexas, ocorreu uma reconversão bioquímica do complexo desidrogenase de alfa-cetoácidos de cadeia ramificada (BCKDH), o qual assumiu uma função enzimática do tipo PDH, ou seja, voltada à conversão do piruvato, diferente do seu papel “canônico” voltado ao metabolismo de aminoácidos ramificados, como ocorre nos demais organismos. O complexo BCKDH geralmente é regulado pela quinase BCKDK, enquanto o complexo PDH tem como enzima regulatória a quinase PDK. Essas quinases fosforilam resíduos de serina presentes na subunidade E1-alfa dos seus respectivos complexos desidrogenases. Entretanto, em *Toxoplasma* são reportadas as quinases PDK e BCKDK na mitocôndria dos parasitos, mantendo-se como uma questão em aberto qual dessas enzimas estaria participando da regulação do complexo BCKDH, e, indiretamente, promovendo a predominância das vias glicolíticas. Dados anteriores do nosso grupo de pesquisa apontaram que o ácido dicloroacético (DCA), droga voltada à inibição da quinase PDK em modelos tumorais, reduz a proliferação dos parasitos *in vitro*. Dessa forma, esse trabalho busca compreender se as quinases TgPDK e/ou TgBCKDK atuam regulando o complexo BCKDH de *Toxoplasma* e se essas enzimas seriam os alvos biológicos de DCA. Para elucidar essa questão metabólica, utilizamos diferentes abordagens, envolvendo análises filogenéticas, ensaios enzimáticos, análises por *docking molecular* e técnicas de imunoprecipitação. Até o momento a literatura aponta a existência de somente uma subunidade E1-alfa (E1-alfa-01) para o complexo BCKDH dos parasitos, entretanto, nossas análises filogenéticas apontaram a existência de uma nova subunidade, que denominamos como E1-alfa-02, ainda não reportada na literatura. Nossos testes enzimáticos apontaram que a quinase recombinante BCKDK aumenta a sua atividade catalítica *in vitro* na presença de peptídeos sintéticos relacionados tanto à E1-alfa-01 quanto E1-alfa-02, sugerindo que a nova subunidade identificada também é um alvo biológico dessa quinase. Abordagens de imunoprecipitação, seguidas de análises proteômicas, identificaram que o componente E2 do complexo BCKDH está associado a ambas as quinases (TgPDK e TgBCKDK), reforçando a hipótese de que ambas as enzimas poderiam atuar sobre a regulação de ambas as subunidades E1-alfa de BCKDH. Além disso, análises de *docking molecular* indicaram a ligação de DCA em BCKDK e PDK, e ensaios enzimáticos confirmaram o efeito inibidor de DCA sobre a atividade de BCKDK, o que amplia o entendimento sobre a atuação desse fármaco no metabolismo de *Toxoplasma*.

Palavras-chave: PDK; BCKDK; DCA; ensaios de cinética enzimática.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is the etiological agent of toxoplasmosis, a globally widespread disease that primarily affects immunocompromised individuals and fetuses during gestational development, triggering severe clinical manifestations such as encephalitis, ocular alterations, and even psychiatric disorders. Current drugs have various adverse effects on patients and are only effective against the proliferative stage of the parasites. One potential pathway for the development of new treatments involves the energy metabolism of *Toxoplasma*, which, unlike many other organisms, relies predominantly on glycolytic pathways as its main source of ATP. According to the literature, in the absence of mitochondrial pyruvate dehydrogenase (PDH) complex in *Toxoplasma* and other apicomplexans, the branched-chain α -keto acid dehydrogenase (BCKDH) complex has undergone biochemical repurposing, acquiring a *PDH-like* enzymatic function directed toward pyruvate conversion. This function diverges from its canonical role in branched-chain amino acid metabolism, as seen in other organisms. The BCKDH complex is typically regulated by the BCKDH kinase (BCKDK), while the PDH complex is regulated by pyruvate dehydrogenase kinase (PDK). These kinases phosphorylate serine residues on the E1- α subunits of their respective dehydrogenase complexes. However, in *Toxoplasma*, both PDK and BCKDK have been reported in the mitochondria, raising the question of which enzyme is responsible for regulating the BCKDH complex and thereby contributing to the parasite's glycolytic predominance. Previous data from our research group indicated that dichloroacetic acid (DCA), a drug known to inhibit PDK in tumor models, reduces parasite proliferation *in vitro*. This study aims to determine whether TgPDK and/or TgBCKDK regulate the BCKDH complex in *Toxoplasma* and whether these kinases are biological targets of DCA. To explore this metabolic question, we employed several approaches, including phylogenetic analyses, enzymatic assays, molecular docking, and immunoprecipitation techniques. While the literature describes only one E1- α subunit (E1- α -01) for the BCKDH complex in *Toxoplasma*, our phylogenetic analyses identified a previously unreported subunit, which we named E1- α -02. Enzymatic assays demonstrated that recombinant BCKDK exhibits increased catalytic activity in the presence of synthetic peptides corresponding to both E1- α -01 and E1- α -02, suggesting that the newly identified subunit is also a target of this kinase. Immunoprecipitation followed by proteomic analysis revealed that the E2 component of the BCKDH complex interacts with both TgPDK and TgBCKDK, supporting the hypothesis that both kinases may regulate the E1- α subunits. Furthermore, molecular docking analyses showed that DCA binds to both BCKDK and PDK, and enzymatic assays confirmed DCA's inhibitory effect on BCKDK activity. These findings expand our understanding of DCA's action on *Toxoplasma* metabolism.

Keywords: PDK; BCKDK; DCA; enzymatic kinetics assays.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema da ultraestrutura da forma taquizoíta de *Toxoplasma gondii*.** Próximo à extremidade apical encontram-se o conoide, os micronemas e as róprias. Proteínas derivadas dos micronemas e das róprias são liberadas nos processos de invasão das células hospedeiras. Adaptado de AJIOKA; FITZPATRICK; REITTER, 2001.28
- Figura 2. Origem do apicoplasto nos apicomplexas.** A. Representação esquemática da origem do apicoplasto através de sucessivas etapas de endossimbiose. B. Caminho mais provável da evolução, envolvendo o endocitose que uma alga vermelha por um ancestral ligado ao Chromalveotas. Adaptado de STRIEPEN, 2011.29
- Figura 3. Etapas do ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*, mostrando as rotas de transmissão do parasita entre diferentes hospedeiros.** A. Felinos são os hospedeiros definitivos e neles ocorre a fase sexual do ciclo de vida de *T. gondii*. B e C. Os oocistos esporulam e contaminam o solo, alimentos e corpos de água. D. Herbívoros podem se contaminar através desses oocistos espalhados pelo ambiente, constituído os hospedeiros intermediários. E. Após a ingestão dos oocistos, ocorre a infecção dos hospedeiros intermediários, dando origem aos cistos teciduais. F e G. Contaminação dos seres humanos ou de outros animais carnívoros através da ingestão de carne crua ou malcozida. H. Transmissão vertical do parasita durante a gestação, causando graves problemas de saúde aos bebês. I e J. Infecção em humanos por *T. gondii* em transfusões de sangue e transplante de órgãos. Adaptado de ATTIAS et al., 2020.31
- Figura 4. Distribuição geográfica dos genótipos de *Toxoplasma gondii*.** Os círculos escuros indicam os locais de amostragem dos isolados e os gráficos coloridos indicam a quantidade de genótipos encontrados em cada região. Adaptado de SHWAB et al., 2014.33
- Figura 5. Histórico de dispersão das linhagens de *T. gondii* inferida a partir de cinco marcadores moleculares.** A diversidade de haplótipos dentro das populações (círculos cinza) é correlacionada à distância geográfica de várias origens, indicada pelo sombreamento de cores. O caminho mais curto correspondente da origem até as várias populações é indicado pelas linhas pretas sólidas. Adaptado de BERTRANPETIT et al., 2017.34
- Figura 6. Mapa simplificado da soroprevalência global para *Toxoplasma gondii*.** Legenda de cores: vermelho-escuro: >60%; vermelho: 40-60%, amarelo: 20-40%, azul: 10-20%; verde: <10%; branco: sem dados. Áreas listradas apresentam diferentes conforme a localidade. Adaptado de PAPPAS et al., 2009.35
- Figura 7. Diferenças metabólicas entre tecidos diferenciados e tecidos proliferativos ou tumorais.** Células diferenciadas tendem a metabolizar o piruvato através das vias mitocondriais em condições fisiológicas ricas em oxigênio, porém em condições anóxicas ocorre a reversão do metabolismo para um perfil fermentativo, com a conversão do piruvato (substrato final da glicólise) em lactato. Células altamente proliferativas ou tumorais, mesmo quando o oxigênio não é um recurso limitante, mantem um metabolismo central na glicólise. Adaptado de BOSE et al., 2021.38
- Figura 8. Mecanismo de ação de DCA sobre a quinase PDK.** A quinase PDK atua fosforilando o complexo PDH, desativando a sua atividade catalítica. Em contrapartida, a enzima PDP (piruvato desidrogenase fosfatase) atua reativando o

complexo PDH através da remoção do grupo fosfato. A droga DCA atua sobre a enzima PDK, impedindo a sua atividade, o que mantém o complexo PDH constantemente ativo. Figura do autor, utilizando a ferramenta online Biorender.39

Figura 9. Esquema representativo da organização estrutural dos complexos desidrogenases. A. O complexo KGDH (reportado para quase todos os organismos) e os complexos PDH e BCKDH da maioria das bactérias gram-negativas apresenta componente E1 estruturado na forma de homodímero. B e C. Complexos PDH e BCKDH de bactérias gram-positivas e dos eucariotos apresentam componente E1 na forma de heterotetrâmero, com a fusão de cadeias peptídicas relacionadas às subunidades E1-alfa e E1-beta. Ocorre também diferenças quanto a estruturação do componente E2 nesses organismos. Figura do autor, utilizando a ferramenta online Biorender, com bases nas informações de HEVLER et al., 2023.....41

Figura 10. Esquema geral das reações catalisadas pelos complexos desidrogenases de alfa-cetoácidos......42

Figura 11. Participação do complexo PDH no metabolismo do piruvato em mitocôndrias e plastídios. A: Na mitocôndria, o complexo PDH atua na formação de acetil-CoA, que então é utilizado no ciclo de Krebs, fornecendo energia para cadeia de transporte de elétrons (ETC) e fosforilação oxidativa). **B:** participação do complexo PDH na conversão de piruvato e acetil-CoA nos plastídios (incluindo o apicoplasto), na produção de ácidos graxos. Adaptado de MARTÍNEZ-REYES & CHANDEL, 2020; STORM & MÜLLER, 2012.....44

Figura 12. Sítios de fosforilação da subunidade E1-alfa do complexo PDH de humanos. O eixo horizontal representa a sequência de aminoácidos da proteína e o eixo vertical se associa ao número total de dados experimentais que se utilizam de metodologias confirmatórias além de espectrometria de massas. Adaptado de PhosphositePlus (2024) (<https://www.phosphosite.org/>).45

Figura 13. Metabolismo BCAAs mediado pela ação do complexo BCKDH. Os aminoácidos valina, isoleucina e leucina são metabolizados inicialmente pela enzima BCAT, gerando α -cetoácidos que podem ser metabolizados pelo complexo BCKDH. Após o processamento pelo complexo desidrogenase, os produtos dessa reação são encaminhados para o metabolismo do ciclo de Krebs, gerando de ATP. Adaptado de DE MEEÛS D'ARGENTEUIL et al., 2021.47

Figura 14. Dados do site PhosphoSitePlus, evidenciando os sítios de fosforilação da subunidade E1-alfa do complexo BCKDH de humanos. O eixo horizontal representa a sequência de aminoácidos da proteína e o eixo vertical se associa ao número total de dados experimentais que se utilizam de metodologias confirmatórias além de espectrometria de massas. Adaptado de PhosphoSitePlus (<https://www.phosphosite.org/>).48

Figura 15. Rotas metabólicas de BCAAs e do piruvato em *T. gondii*. O complexo BCKDH tem como papel principal a conversão do piruvato, mas mantendo uma atividade residual no metabolismo de BCAAs. Adaptado de OPPENHEIM et al., 2014.49

Figura 16. Localização celular das quinases PDK e BCKDK em *Toxoplasma gondii*. A. Co-localização das enzimas PDK e BCKDK (em verde, tag HA), em relação à proteína mitocondrial HSP60-RFP (em vermelho). B. Não ocorre sobreposição na localização celular dessas enzimas em relação quando a proteína CPN60 (presente no apicoplasto) está imunolocalizada. Adaptado de FERRARINI et al., 2021.....50

Figura 17. Classificação e localização celular das proteínas quinases atípicas e eucarióticas. Adaptado de Atlas do Quinoma, 2024.51

Figura 18. Estrutura de domínios e mecanismo de ação das quinases PDKs. A. As quinases PDK e BCKDK possuem organização de domínios características, envolvendo a presença de 02 domínios catalíticos. B. Os asteriscos (*) indicam os resíduos de histidina que são inicialmente autofosforilados na enzima, com a posterior fosforilação dos sítios de serina nas regiões-alvo da subunidade E1-alfa do complexo desidrogenase. Adaptado de ANWAR et al., 2021; THELEN; MIERNYK; RANDALL, 2000.	53
Figura 19. Vetores pet28a(+), contendo as sequências para a expressão recombinante de TgBCKDK e TgPDK.	59
Figura 20. Esquemas de recombinação Gateway utilizados no projeto. A e B, amplificação das regiões-alvo por PCR (TgPDK e TgBCKDK, respectivamente), a partir dos vetores-molde, e então recombinação em vetores pDONR221 e pDEST17.	67
Figura 21. Identificação de proteínas relacionadas à subunidade E1-alfa de BCKDH com o uso da ferramenta BLAST. A: Buscas utilizando a proteína TGME49_239490 (E1-alfa já descrita para o complexo BCKDH) como referência. B: Buscas utilizando a proteína TGME49_245670 (E1-alfa já descrita para o complexo PDH, do apicoplato) como referência.....	73
Figura 22. Alinhamento entre a subunidade E1-alfa (TGME49_239490) do complexo de BCKDH de <i>T. gondii</i> e a proteína TGME49_292100. A: Alinhamento entre as sequências de resíduos para ambas as proteínas. B: Alinhamento entre as regiões que contém o sítio de Serina (asterisco), e que constitui o alvo principal de fosforilação. C: Índice de similaridade entre as proteínas.	75
Figura 23. Diagrama evolutivo da subunidade E1-alfa do complexo BCKDH para <i>Toxoplasma</i>. É possível observar que junto ao clado Coccidia (apicomplexa) é reportado um ponto de divergência evolutiva, que deu origem a duas proteínas relacionadas à subunidade E1-alfa do complexo BCKDH. Dados OrthoDB (https://www.orthodb.org/).	76
Figura 24. Regiões de domínios preditas para as proteínas relacionadas à subunidade E1-alfa para o complexo BCKDH de <i>Toxoplasma gondii</i>. A. Proteína TGME49_239490 (E1-alfa-01), já reportada na literatura. B. Proteína TGME49_292100 (E1-alfa-02). Dados Interpro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/).....	77
Figura 25. Perfis de expressão de diferentes proteínas em <i>Toxoplasma gondii</i>. Perfis de transcriptoma (RNA-Seq) de cultivos de taquizoítas <i>in vitro</i> em diferentes tempos (gráfico laranjas à direita), e perfis de infecção <i>in vivo</i> (enterócitos, gráficos em azul). EES1: estágio muito inicial de infecção, isolado a partir de um gato. EES2: estágio inicial de infecção em células entéricas, isolados a partir de dois gatos. EES3 e 4: estágio misto e tardio de infecção em células entéricas, respectivamente, isolados a partir de dois gatos. EES5: estágio tardio de infecção, isolado de um gato. TPM = transcritos por milhão. Adaptado de ToxoDB (https://toxodb.org/) e Ramakrishnan et al., 2019.....	79
Figura 26. Modelagens <i>in silico</i> para as proteínas E1-alfa-01 e E1-alfa-02. A: Subunidade E1-alfa-01 de BCKDH. B: Possível subunidade E1-alfa-02 de BCKDH. C: Sobreposição estrutural entre as subunidades E1-alfa-01 (em azul) e E1-alfa-02 (em vermelho); região tracejada com asterisco: região próxima à região N-terminal de cada proteína, sem sobreposição estrutural.	82
Figura 27. Árvore filogenética para a subunidade E1-alfa dos complexos BCKDH e PDH em diferentes organismos. Cada grupo de organismos está representada pelas cores contidas na legenda.	83

Figura 28. Árvore filogenética para as quinases BCKDK e PDK, considerando diferentes grupos de organismos. Cada grupo de organismos está representada pelas cores contidas na legenda.	86
Figura 29. Distribuição dos complexos desidrogenases mitocondriais BCKDH/PDH e das quinases BCKDK/PDK entre os organismos do supergrupo SAR.	88
Figura 30. Ensaio de Expressão de TgPDK (~ 82 kDa), na cepa <i>E. coli</i> Δ-SLyD. A. Expressão a 20°C, por 16 horas. Géis contendo extrato solúvel, contendo as condições controle (não induzido), e as seguintes concentrações de IPTG (0,1, 0,5, 1,0 e 2,0 mM). B. Expressão a 37°C, por 04 horas. Extrato solúvel, contendo as condições controle (não induzido), e as seguintes concentrações de IPTG (0,1, 0,5, 1,0 e 2,0 mM). Géis corados com Azul de Comassie. Marcador de peso molecular Page Ruler Protein Ladder (Thermo).	91
Figura 31. Ensaio de Expressão de TgPDK (~82 kDa), na cepa <i>E. coli</i> BL21 Star (Extrato solúvel), meio de cultura Terrific Broth. A. Teste de expressão conduzido a 18 °C. 1) Controle sem IPTG. 2) Indução a 0,5 mM IPTG. 3) Indução a 1,0 mM IPTG. Condições 1 a 3 com tempo de expressão de 04 horas. 4) Controle sem IPTG. 5) Indução a 0,5 mM IPTG. 6) Indução a 1,0 mM IPTG (todas por 16 horas). B. Teste de expressão conduzido a 25 °C. 1) Controle sem IPTG. 2) Indução a 0,5 mM IPTG. 3) Indução a 1,0 mM IPTG. Condições 1 a 3 com tempo de expressão de 04 horas. 4) Controle sem IPTG. 5) Indução a 0,5 mM IPTG. 6) Indução a 1,0 mM IPTG. Todas as condições com cultivo por 16 horas.	92
Figura 32. Expressão de TgPDK em <i>E. coli</i> BL21 Star, meio Terrific Broth com as temperaturas de expressão de 30 e 37 °C. 1 a 3: temperatura de expressão a 30 °C controle não induzido, indução com IPTG 0,5 mM e indução com IPTG 1,0 mM, respectivamente. 4 a 6: Temperatura de expressão a 37 °C, controle não induzido, indução com IPTG 0,5 mM e indução com IPTG 1,0 mM, respectivamente.	92
Figura 33. Expressão de TgPDK em <i>E. coli</i> cepa Arctic Express. Expressão conduzida a 12°C, por 16 horas. 1) Extrato total não induzido 2) Extrato total induzido. 3) Extrato Solúvel não induzido. 4) Extrato Solúvel induzido. 5) Extrato insolúvel não induzido. 6) Extrato insolúvel induzido. Induções realizadas com a adição de 1 mM de IPTG ao meio LB. Marcador de peso molecular Page Ruler Protein Ladder (Thermo).	93
Figura 34. Expressão recombinante de TgBCKDK (~56kDa) em <i>E. coli</i> Nico21 a 20°C. A. Gel SDS-Page 10%, corado com Azul de Comassie. 1) Extrato total, não induzido. 2) Extrato total, induzido. 3) Extrato solúvel, condição não induzido, purificado manualmente com resina de níquel-NTA. 4) Extrato solúvel, condição induzido, purificado manualmente com resina de níquel-NTA, 5) Extrato solúvel, condição não induzido. 6 – Extrato solúvel, condição induzido. B. Membrana de Western Blot, com marcação anti-His. 1) Extrato total não induzido. 2) Extrato total induzido. 3) Extrato solúvel, condição não induzido, purificado em bancada com resina de níquel-NTA. 4) Extrato solúvel, condição induzido, purificado manualmente com resina de níquel-NTA, 5) Extrato solúvel, condição não induzido. 6) Extrato solúvel, condição induzido. Seta indica expressão da proteína recombinante. Marcador de peso molecular Page Ruler Protein Ladder (Thermo).	94
Figura 35. Purificação de TgBCKDK com o sistema de afinidade Äkta. A. Dados de absorvância das diferentes frações. B. Frações B10 a B23. C. Frações B24 a B32. D. Frações B33 a B41. A primeira coluna dos géis de eletroforese (B, C e D), refere-se ao marcador de peso molecular Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo).	95

Figura 36. Purificação por Cromatografia de exclusão de tamanho de TgBCKDK.	
A. Dados de absorvância das diferentes frações. B. Gel de SDS-Page (10%), corado com Azul de Comassie. Coluna 1: marcador de peso molecular Page Ruler. Coluna 2: Amostra da fração B27 utilizada no experimento (controle). Colunas 3 a 10: Análise das frações coletadas a partir da cromatografia de exclusão de tamanho.....	96
Figura 37. Purificação por Troca Iônica de TgBCKDK.	
A. Dados de absorvância das diferentes frações. B e C. Géis SDS-Page (10%), corados com Azul de Comassie. B. 1: marcador de peso molecular Page Ruler. 2: Amostra pré-coluna das frações B32 a B40 utilizadas no experimento. Setas indicam uma presença muito fraca de proteínas, mas ainda contendo as 02 bandas adicionais. C. 1: Marcador de peso molecular Page Ruler Protein Ladder (Thermo). Demais poços correspondem a amostras das diferentes frações coletadas.	97
Figura 38. Modelagens <i>in silico</i> das proteínas TgBCKDK e TgPDK com o uso da plataforma Alphafold.	
A e B: Proteínas TgBCKDK e TgPDK, respectivamente. É possível observar uma região mais estruturada na parte central da proteína (setas azuis), e a presença de regiões desestruturadas nas regiões N e C-terminal de cada proteína (setas vermelhas).....	99
Figura 39. Projeção conformacional <i>in silico</i> para a enzima TgBCKDK (sequência completa) pela plataforma Swiss-Model.	
A e B: Estrutura na forma de monômero e dímero, respectivamente.	100
Figura 40. Projeção conformacional <i>in silico</i> para a enzima TgPDK (sequência completa) pela plataforma Swiss-Model.	
A e B: Estrutura na forma de monômero e dímero, respectivamente.	100
Figura 41. Regiões de domínios da sequência completa de TgBCKDK.	
Os retângulos coloridos representam as regiões de domínios da proteína de interesse. Dados obtidos com o uso da plataforma online Interpro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/).	101
Figura 42. Regiões de domínios da sequência completa de TgPDK.	
Os retângulos coloridos representam as regiões de domínios da proteína de interesse. Dados obtidos com o uso da plataforma online Interpro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/).	102
Figura 43. PCRs de confirmação de amplificação das regiões-alvo de TgBCKDK e TgPDK.	
A. 1 e 3: Controles negativos. 2 e 4: Amplificação de TgBCKDK e TgPDK, respectivamente, com os primers Gateway. B. Confirmação dos clones positivos para em Top10, contendo vetores pDNOR 221 para TgBCKDK e TgPDK. B: 1 e 7 – controles negativos. B2 e B8: controle positivo: amplificação das regiões originais contidas nos vetores sintéticos. B3 a B6 e B9 a B12, teste de 04 colônias para TgBCKDK e TgPDK. C. Confirmação dos clones positivos para em Top10, contendo vetores pDEST17 para TgBCKDK e TgPDK. C: 1 e 7 – controles negativos. C2 e C8: controle positivo: amplificação das regiões originais contidas nos vetores sintéticos, para TgBCKDK e TgPDK, respectivamente. C3 a C6 e C9 a C12, teste de 04 colônias para TgBCKDK e TgPDK, respectivamente. Setas indicam a amplificação das regiões de interesse, confirmando o sucesso das técnicas.	103
Figura 44. Expressão das novas construções de TgBCKDK e TgPDK.	
A. Expressão de TgBCKDK. B. Expressão de TgPDK. Condições: 1 (controle); 2: indução por IPTG (1 mM); 3: glicose 0,1%; 4: glicose 0,3%; 5: glicose 0,5%; 6: glicose 1%; 7 a 9: glicose 0,1% com lactose 0,2, 0,4 ou 0,6%, respectivamente. Todos as condições utilizando somente a fração solúvel.	105
Figura 45. Purificação de bancada para a proteína TgBCKDK (~47 kDa).	
Gel SDS-PAGE (10%), corado por solução de prata. 1. Marcador de peso molecular Page Ruler Protein Ladder (Thermo). 2. Flow-through. 3 a 10. Solução de tampão contendo 300	

mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH, contendo diferentes concentrações de imidazol: 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 400 mM, respectivamente.	105
Figura 46. Purificação por sistema de cromatografia Äkta de TgBCKDK. Gel SDS-Page 10%, corado com solução de prata. Proteína-alvo sendo eluída com muitos contaminantes. Setas indicam a proteína-alvo. Marcador de peso molecular Page Ruler Protein Ladder (Thermo).....	106
Figura 47. Purificação de bancada para a proteína PDK (~68 kDa). Gel SDS-PAGE (10%), corado por solução de prata. 1. <i>Flow-through</i> . 2 a 7. Solução de tampão contendo 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH, contendo diferentes concentrações de imidazol: 30, 50, 100, 150, 200 e 250 mM, respectivamente. Marcador de peso molecular Page Ruler Protein Ladder (Thermo).....	107
Figura 48. Purificação por sistema de cromatografia Äkta de TgPDK (~68 kDa). Gel SDS-Page 10%, corado com solução de prata. Proteína-alvo sendo eluída com muitos contaminantes. Setas indicam a proteína-alvo. Marcador de peso molecular Page Ruler Protein Ladder (Thermo).	108
Figura 49. Ensaio de atividade cinética de TgBCKDK. Os asteriscos (*) indicam diferença estatística $p < 0,05$, através de teste de ANOVA, seguido por teste de Tukey.	109
Figura 50. Ensaio enzimático com proteína TgBCKDK recombinante frente a peptídeos-alvo sintéticos. Concentração de ATP (150 μ M). Peptídeo 01: região de fosforilação de E1-alfa-01 do complexo BCKDH. Peptídeo 02: região de fosforilação de uma possível nova subunidade E1-alfa para o complexo BCKDH (E1-alfa-02). Asteriscos representam diferença estatística ($p < 0,05$).....	111
Figura 51. Atividade inibitória de DCA frente a quinase TgBCKDK. A e B: Condições utilizando-se os peptídeos-alvo 01 e 02, respectivamente.	112
Figura 52. Docking molecular das quinases TgBCKDK e TgPDK frente a diferentes ligantes. A e B: Proteína TgBCKDK em relação aos ligantes piruvato e DCA, respectivamente. C e D: Proteína TgPDK em relação aos ligantes piruvato e DCA, respectivamente. Ligantes representados em verde. O modelo de nuvem eletrônica apresenta regiões com densidade eletrônica positiva em azul e negativa em vermelho. Regiões neutras hidrofóbicas são brancas.....	114
Figura 53. Sítios de interação entre diferentes ligantes e as quinases TgBCKDK e TgPDK. A e B: Proteína TgBCKDK em relação aos ligantes piruvato e DCA, respectivamente. C e D: Proteína TgPDK em relação aos ligantes piruvato e DCA, respectivamente.	115
Figura 54. Imunoprecipitação (IP) dos complexos proteicos associados a PDK e BCKDK no metabolismo dos parasitos e análise por Western Blot. A: IP utilizando-se tampão contendo 150 mM de cloreto de sódio (Tampão 01). B: IP utilizando-se tampão contendo 300 mM de cloreto de sódio (Tampão 02). O eixo de A e B representa as diferentes condições: 1, 2 e 3 – Fração solúvel dos parasitos (controle, PDK.HA e BCKDK.HA, respectivamente; 4, 5 e 6 – Fração não-ligada (<i>flow-through</i>) das condições controle, PDK.HA e BCKDH.HA, respectivamente; 7, 8 e 9 – Fração contendo os eluídos das condições controle, PDK.HA e BCKDH.HA, respectivamente. C: 1, 2 e 3 - IP utilizando-se tampão contendo 300 mM de cloreto de sódio (Tampão 02) da fração solúvel dos extratos controle, PDK.HA e BCKDK.HA, respectivamente; 4, 5, 6 - IP utilizando-se tampão contendo 400 mM de cloreto de sódio (Tampão 03) da fração solúvel dos extratos controle, PDK.HA e BCKDK.HA, respectivamente. Marcador de peso molecular Page Ruler Protein Ladder (Thermo).	116

Figura 55. Análises estatísticas para a co-imunoprecipitação com o uso de tampão contendo 150 mM de cloreto de sódio. No eixo horizontal constam os dados para os parasitos etiquetados para BCKDK, PDK, ou não etiquetados (Tg-CE, extrato controle). Asteriscos (*) indicam diferença estatística $p < 0,05$	119
Figura 56. Análises estatísticas para a co-imunoprecipitação com o uso de tampão contendo 300 mM de cloreto de sódio. No eixo horizontal constam os dados para os parasitos etiquetados para BCKDK, PDK, ou não etiquetados (Tg-CE, extrato controle). Asteriscos (*) indicam diferença estatística $p < 0,05$	119
Figura 57. Esquema ilustrativo para a interação das quinases BCKDK e PDK em relação ao componente E2 do complexo BCKDH de <i>T. gondii</i>. Na região N-terminal das quinases ocorrem pontos de ancoragem com o componente E2, bem como sítios de interação com o fármaco DCA. O ponto de ancoragem do componente E1 (composto pelas subunidades E1-alfa e E1-beta) ocorre em uma região distinta do sítio de ancoragem das quinases. O sítio H*, representa a histidina que é inicialmente fosforilada nas quinases e promove a transferência do grupo fosfato para a região de serina da subunidade E1-alfa (Thelen; Miernyk; Randall, 2000). Figura do autor, utilizando dados da literatura, e a ferramenta Biorender.	135
Figura 58. Proposta da divergência evolutiva dos complexos BCKDH e PDH, juntamente com as quinases PDK e BCKDK para os organismos em geral e <i>Toxoplasma gondii</i>. Em decorrência da perda do complexo PDH mitocondrial em um ancestral ligado aos apicomplexas, ocorreu o surgimento da subunidade E1-alfa-01, descrita na literatura como voltada ao metabolismo do piruvato, possivelmente compensando a atividade do complexo PDH que foi perdido, bem como a readaptação evolutiva da quinase PDK, possivelmente possibilitando a regulação das enzimas ligadas à subunidade E1-alfa do complexo BCKDH.	137
Figura 59. Possível mecanismo de alternância das atividades catalíticas de BCKDH em <i>Toxoplasma gondii</i>. A alternância entre as subunidades E1-alfa, identificadas para esse complexo desidrogenase, permitiria a conversão enzimática de todo o complexo, permitindo uma adaptação metabólica dos parasitos frente a diferentes condições nutricionais. A partir da interação com o componente E2, as diferentes subunidades E1-alfa estariam sujeitas à regulação mediada pelas quinases PDK/BCKDK, e pela ação de fosfatases.	138
Figura 60. Sequências consenso para a região que contém o sítio de serina sujeito à fosforilação na subunidade E1-alfa dos complexos PDH e BCKDH de localização mitocondrial. Estão representados os organismos dos principais filos que compõem os reinos do Domínio Eukarya (eucariotos).	193
Figura 61. Sequências consenso para a região que contém o sítio de serina conservado na subunidade E1-alfa dos complexos PDH de plastídios. Estão representados os organismos dos principais filos que compõem os reinos do Domínio Eukarya (eucariotos).	194

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
BCAT	<i>Branched-chain amino acid transaminase</i> (Aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada)
BCKDH	<i>Branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex</i>
BCKDK	<i>Branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase</i>
DCA	Ácido dicloroacético
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
g	gravidade - Força centrífuga
IP	Imunoprecipitação
IPTG	isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
kDa	kiloDaltons (mil Daltons)
kb	kilobases (mil pares de bases)
PDH	<i>Pyruvate Dehydrogenase Complex</i> (Complexo piruvato desidrogenase)
PDK	<i>Pyruvate Dehydrogenase Kinase</i> (Piruvato desidrogenase quinase)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (solução salina tamponada)
PBS-T	PBS contendo 0,05% de Tween 20
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	SDS - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Eletroforese em Gel de poliacrilamida com SDS)
SFB	Soro Fetal Bovino
UV	Luz ultravioleta
V	Volt

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1 Características gerais do protozoário <i>Toxoplasma gondii</i>	26
2.2 Ciclo de vida.....	30
2.3 Distribuição geográfica e Diversidade Genética	32
2.4 Toxoplasmose como problema de saúde pública	35
2.5 Tratamentos para a toxoplasmose: fármacos atuais e principais desafios.....	36
2.6 Complexos desidrogenases no metabolismo celular	40
2.6.1 Estrutura dos complexos desidrogenases.....	40
2.6.2 Metabolismo do complexo PDH	43
2.6.3 Metabolismo do complexo BCKDH	47
2.6.4 Regulação dos complexos PDH e BCKDH através de quinases	50
3. OBJETIVOS	55
3.1 Objetivos Gerais.....	55
3.2 Objetivos específicos	55
4. MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1 Análises de filogenia para a subunidade E1-alfa dos complexos BCKDH e PDH e das quinases BCKDK e PDK.....	56
4.2 Modelagem tridimensional e análise do padrão de expressão de proteínas relacionadas à estruturação e regulação do complexo BCKDH de <i>Toxoplasma gondii</i>	58
4.3 Síntese de plasmídeos pet28a(+) contendo os genes TgPDK e TgBCKDK.....	59
4.4 Transformação em bactéria competente	59
4.5 Expressão das proteínas TgPDK e TgBCKDK (proteínas na sequência completa)	60
4.6 Eletroforese de proteínas	61
4.7 Coloração por Azul de Comassie	61
4.8 Coloração por prata.....	62
4.9 Transferência e <i>Western Blot</i>	62
4.10 Purificação por cromatografia de afinidade em cromatógrafo modelo Äkta	63
4.11 Cromatografia de exclusão por tamanho e troca iônica.....	63
4.12 Diálise de proteínas através de membrana semipermeável.....	64
4.13 Abordagens <i>in silico</i> para predição da estrutura das proteínas TgBCKDK e TgPDK e para <i>docking</i> molecular.....	64

4.14 Amplificação das regiões de domínios de TgBCKDK e TgPDK, para clonagem em sistema Gateway (Invitrogen).....	65
4.15 Recombinação Gateway	66
4.16 Expressão recombinante da região de domínios das proteínas TgPDK e TgBCKDK.....	68
4.17 Estratégias de purificação das proteínas recombinantes	69
4.18 Concentração e diálise das frações com utilização de filtro <i>amicon</i>	69
4.19 Ensaio enzimáticos.....	70
4.20 Imunoprecipitação (IP) dos complexos proteicos associados a TgPDK e BCKDK	71
5. RESULTADOS	73
5.1 Busca de proteínas candidatas às subunidades E1-alfa do complexo BCKDH e PDH em <i>Toxoplasma gondii</i>	73
5.2 Análises <i>in silico</i> para as regiões de domínios da subunidade E1-alfa de BCKDH	77
5.3 Modelagens <i>in silico</i> para as subunidades E1-alfa do complexo BCKDH de <i>T. gondii</i>	82
5.4 Análises filogenéticas para as subunidades E1-alfa do complexo BCKDH de apicomplexas	83
5.5 Análises filogenéticas para as quinases BCKDK e PDK dos apicomplexas.....	86
5.6 Panorama evolutivo dos complexos desidrogenases e das quinases mitocondriais para os Apicomplexas e demais Alveolatas.....	88
5.7 Expressão recombinante de PDK (sequência completa) em sistema procarioto	91
5.8 Expressão da proteína TgBCKDK (sequência completa) em sistema procarioto	94
5.9 Cromatografia por afinidade em sistema de cromatografia Äkta.....	94
5.10 Cromatografia por exclusão de tamanho e troca iônica	96
5.11 Diálise das proteínas	98
5.12 Modelagens <i>in silico</i> de TgBCKDK e TgPDK	98
5.13 PCR e clonagem das sequências estáveis de TgBCKDK e TgPDK em vetores do sistema Gateway	102
5.14 Transformação bacteriana e expressão da região de domínios de TgBCKDK e TgPDK.....	103
5.15 Etapas de purificação de TgBCKDK (versão truncada).....	105
5.16 Etapas de purificação de TgPDK (versão truncada).....	107
5.17 Ensaio de cinética enzimática para TgBCKDK.....	109
5.18 Análises <i>in silico</i> dos sítios de interação de DCA frente à quinases BCKDK e PDK	114
5.19 Ensaio de imunoprecipitação (IP) e análises de espectrometria de massas .	115

6. DISCUSSÃO	122
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	139
7.1 PERSPECTIVAS	140
REFERÊNCIAS.....	141
ANEXO I – Artigo de revisão publicado (Frontiers in Cellular and Infection Microbiology).....	161
ANEXO II – Dados referentes às análises filogenéticas dos complexos desidrogenases BCKDH/PDH e das quinases PDK/ BCKDK.....	175
ANEXO III – Sequências consenso para a região de fosforilação da subunidade E1-alfa dos complexos BCKDH e PDH para diferentes grupos de organismos.	193
ANEXO IV – Dados de proteômica relacionado à Imunoprecipitação dos complexos proteicos associados às quinases TgBCKDK e TgPDK em <i>Toxoplasma gondii</i>.....	195

1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose se caracteriza como uma infecção de abrangência global com severos impactos sobre a saúde dos animais (silvestres, domésticos e de produção), atingindo também as populações humanas em todos os continentes (STELZER *et al.*, 2019). Essa patologia tem como agente causador o organismo *Toxoplasma gondii*, patógeno intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, capaz de infectar virtualmente qualquer célula nucleada de hospedeiros endotérmicos (MARINO; BOOTHROYD, 2017). A ocorrência desses parasitas tem sido reportada em mais de 300 espécies de mamíferos e 30 espécies de aves, tornando essencial o monitoramento adequado da saúde dos rebanhos, uma vez que o consumo de carnes contaminadas é uma via importante de transmissão da toxoplasmose aos humanos (FLEGR *et al.*, 2014; VANWORMER *et al.*, 2014).

Diferentes índices de soroprevalência são reportados conforme a região geográfica, podendo superar os 60% da população em determinadas localidades do Brasil, assim como em alguns países da África e do sudeste asiático (PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009). Regiões com menores níveis socioeconômicos, como áreas rurais e populações com baixa escolaridade, geralmente apresentam taxas mais elevadas de infecção, constituindo um grave problema de saúde pública (CABRAL MONICA *et al.*, 2022).

Indivíduos imunocompetentes geralmente são assintomáticos frente à infecção por *T. gondii*, entretanto, a circulação de cepas atípicas e mais virulentas, especialmente nas Américas, tem sido associada à ocorrência de quadros clínicos mais severos (BRITO *et al.*, 2023). Pacientes imunocomprometidos, ou sob condições medicamentosas que induzem à imunossupressão, também podem apresentar formas graves da toxoplasmose devido à rápida multiplicação dos parasitos bem como reativação de cistos latentes. Nesses casos, a doença pode desencadear quadros sistêmicos, afetando diferentes órgãos, com a ocorrência de convulsões, danos oculares, encefalite e problemas respiratórios, o que pode resultar na morte dos pacientes (WANG, ZE DONG *et al.*, 2017).

As gestantes são consideradas um grupo de risco para a toxoplasmose, devido à transmissão vertical dos parasitos através da placenta, o que leva à alterações graves nos embriões, com quadros associados a danos oculares e neurológicos, além da ocorrência de abortos, implicando na necessidade de diagnósticos mais precoces

e tratamento adequado tanto das gestantes quanto dos recém-nascidos infectados (MCAULEY, 2014).

As vias de transmissão ocorrem principalmente através do consumo de carnes cruas ou malcozidas, contendo cistos teciduais, ou ainda devido à contaminação de alimentos ou fontes de água por oocistos (ATTIAS *et al.*, 2020). Um dos maiores surtos de contaminação por toxoplasmose no Brasil ocorreu na cidade de Santa Maria/RS, em 2018, e foi associado à contaminação de água tratada e distribuída para o abastecimento urbano, gerando mais de 900 casos confirmados através de exames sorológicos (MINUZZI *et al.*, 2021).

Atualmente não existem terapias farmacológicas totalmente efetivas contra a essa infecção. O protocolo de tratamento mais utilizado consiste no uso combinado dos fármacos sulfadiazina e pirimetamina, que agem somente contra a fase proliferativa do ciclo de vida dos parasitos, constituída pelos taquizoítas, mas sem efeitos sobre a forma latente, que se apresenta na forma de cistos teciduais (contendo bradizoítas), que podem reiniciar a infecção (BEN-HARARI; GOODWIN; CASOY, 2017).

Essa combinação de drogas atua reprimindo a multiplicação dos parasitos através da inibição da via metabólica do folato. Entretanto, essa mesma via metabólica é importante para o metabolismo adequado das células normais do paciente, o que desencadeia severos efeitos colaterais (DUNAY *et al.*, 2018). Em alguns casos, o uso de suplementos a base ácido fólico pode ser recomendado como forma de reduzir os efeitos adversos dessas terapias (NZILA; OKOMBO; MOLLOY, 2014). Pacientes intolerantes à medicação podem apresentar quadros severos de hipersensibilidade, incluindo alterações hematológicas e de medula óssea (AZAMI *et al.*, 2021).

Devido aos graves efeitos colaterais e a necessidade de tratamentos prolongados, estima-se que 30% dos pacientes abandonem as terapias (ALDAY; DOGGETT, 2017), o que representa um grande risco à saúde considerando a possível recidiva da doença. Dessa forma, estudos que ajudam a distinguir especificidades do metabolismo parasitário em relação ao metabolismo das células do hospedeiro, podem contribuir para terapias mais eficientes, de menor duração e menores efeitos adversos, o que permitiria também a eliminação das formas latentes.

Entre as características marcantes presentes em *Toxoplasma*, e que poderiam constituir alvos importantes para novas terapias estão as proteínas quinases ligadas ao metabolismo do carbono (SANTOS *et al.*, 2023), a grande dependência da glicólise

para o metabolismo energético dos parasitos (SHUKLA *et al.*, 2018), bem como as características bioquímicas únicas que levaram à adaptação de um complexo desidrogenase mitocondrial para uma função não-tradicional voltada ao metabolismo do piruvato (OPPENHEIM *et al.*, 2014).

Em células normais de mamíferos, o ATP é produzido majoritariamente através das vias mitocondriais, onde o complexo piruvato desidrogenase (PDH) promove a conversão do piruvato (originado da glicólise) em acetil-CoA, o qual é então metabolizado pelo ciclo de Krebs, gerando cofatores que ativam a fosforilação oxidativa (BULTHUIS *et al.*, 2019). Entretanto, em *Toxoplasma*, ocorre um predomínio da glicólise sobre o metabolismo mitocondrial (SHUKLA *et al.*, 2018), fenótipo também verificado nas fases eritrocíticas de *Plasmodium*, sendo um mecanismo metabólico essencial para sustentar a rápida proliferação e os processos de invasão de novas células (VAN NIEKERK *et al.*, 2016).

Nos parasitos, a intensa produção de piruvato pela glicólise, juntamente à sua limitada degradação pelas vias mitocondriais, acarreta a acumulação desse metabólito no citoplasma. Dessa forma, o piruvato é então convertido a lactato, fornecendo tanto energia para o metabolismo parasitário quanto biomassa suficiente para sustentar a contínua proliferação celular (SALCEDO-SORA *et al.*, 2014). Além disso, a excreção de lactato para o meio extracelular promove a acidificação do vacúolo parasitóforo, contribuindo para o egresso dos parasitos (HUYNH; CARRUTHERS, 2022). A formação de cistos teciduais, essenciais para a forma latente da doença, também é fortemente dependente da glicólise (SHUKLA *et al.*, 2018).

Esse perfil metabólico, apresentado pelos apicomplexas, é fenotipicamente similar ao apresentado pelas células tumorais, e conhecido como Efeito Warburg, no qual, mesmo sob condições ricas em oxigênio, ocorre supressão do metabolismo mitocondrial, com a produção de ATP sendo conduzida majoritariamente pela glicólise (MARTINS PINTO *et al.*, 2023). Essa estratégia metabólica garante a manutenção de uma alta concentração intracelular de compostos de carbono, o que sustenta uma contínua proliferação celular, além da repressão das vias apoptóticas ligadas ao metabolismo mitocondrial (MATHUPALA; KO; PEDERSEN, 2010). Nos tumores, esse fenótipo ocorre através da superexpressão da quinase PDK (piruvato desidrogenase quinase), que atua na fosforilação de resíduos de serina presentes na subunidade E1-alfa do complexo PDH (piruvato desidrogenase), reduzindo a sua atividade, e promovendo de forma indireta as vias glicolíticas (HE *et al.*, 2017). A superexpressão

da quinase PDK3 também está associada à maior agressividade dos tumores, além de piores prognósticos (KUO *et al.*, 2021).

O ácido dicloroacético (DCA) é capaz de inativar a quinase PDK em células tumorais, e, indiretamente, reestabelecer a atividade do complexo PDH, o que leva os tumores à morte celular (TIERSMA *et al.*, 2022). Dessa forma, o reposicionamento de fármacos antitumorais, e que são capazes de reverter esse fenótipo glicolítico em tumores, também poderia constituir a base de novas estratégias terapêuticas contra *T. gondii*.

Nesse sentido, dados obtidos anteriormente em nosso grupo de pesquisa demonstraram que o DCA também é capaz de reduzir a proliferação de taquizoítas *in vitro*, com aumento da atividade mitocondrial e da conversão do piruvato em acetil-CoA (FERRARINI *et al.*, 2021), entretanto ainda se desconhecem os alvos moleculares dessa droga nos parasitos.

Entre os fatores que dificultam a atribuição precisa do alvo molecular de DCA em *Toxoplasma*, destaca-se as especificidades metabólicas desses parasitos em relação à maior parte dos demais organismos, além da ausência de um complexo PDH na mitocôndria. Neste caso, o complexo PDH encontra-se restrito ao apicoplasto (organela similar aos plastídios de algas) (FLEIGE *et al.*, 2007).

Apesar da ausência de um complexo PDH mitocondrial, os parasitos ainda apresentam o complexo BCKDH (complexo desidrogenase de alfa-cetoácidos de cadeia ramificada) que é normalmente envolvido no metabolismo de aminoácidos ramificados (derivados de valina, leucina e isoleucina, BCAAs) (WHITE *et al.*, 2018). Nos apicomplexas é proposto que esse complexo apresentou uma adaptação evolutiva, tornando-se um complexo *PDH-like*, com sua atividade enzimática majoritária voltada à conversão do piruvato em acetil-CoA, o que permitiu a continuidade das vias energéticas mitocondriais, mesmo na ausência de um complexo PDH “canônico”. Entretanto, a literatura também pontua que esse complexo desidrogenase manteve uma atividade catalítica basal frente aos BCAAs (OPPENHEIM *et al.*, 2014). Dessa forma, o complexo BCKDH de *Toxoplasma* teria a capacidade teórica de metabolizar 04 substratos diferentes, com atuação enzimática em vias metabólicas distintas, algo muito diferente do que é normalmente observado nos demais organismos.

Essa situação metabólica de *Toxoplasma* é contrastante com a verificada em *Plasmodium*, que evolutivamente perdeu a capacidade de metabolizar os BCAAs. Em

contrapartida, *Toxoplasma* manteve a enzima BCAT (aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada) (MATHUR; WAKEMAN; KEELING, 2021), que realiza o pré-processamento dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina, fornecendo os substratos adequados para uma função catalítica canônica associada a um complexo BCKDH (NONG *et al.*, 2022).

Os complexos PDH e BCKDH são estruturalmente semelhantes e regulados por proteínas quinases. Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, reportaram a ocorrência de duas proteínas quinases na mitocôndria desses parasitas (TgPDK e TgBCKDK), sem a ocorrência de proteínas relacionadas à essas enzimas no apicoplasto (FERRARINI *et al.*, 2021). Ainda se desconhece o papel dessas quinases na regulação do complexo BCKDH, e se essas enzimas poderiam ser o alvo metabólico de DCA. Portanto, investigações mais detalhadas, focadas em avaliar os aspectos funcionais *in vitro*, bem como a avaliação das redes de interação metabólica dessas enzimas, podem trazer dados relevantes para o desenvolvimento de terapias mais eficazes contra a toxoplasmose.

Além disso, a atividade catalítica do complexo BCKDH está diretamente associada à sua subunidade E1-alfa, e a literatura descreve apenas uma enzima E1-alfa em *T. gondii*, mesmo sendo postulada uma função metabólica dupla para esse complexo desidrogenase (OPPENHEIM *et al.*, 2014). Por isso, tivemos a iniciativa de realizar análises evolutivas dessa subunidade, visando comparar os dados obtidos com as análises filogenéticas que realizamos para as quinases TgBCKDK e TgPDK, e esclarecer, a partir de dados evolutivos, o panorama metabólico encontrado nos parasitos.

1.1 JUSTIFICATIVA

Novas estratégias farmacológicas são de extrema urgência para o tratamento da toxoplasmose, dado à sua abrangência global (PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009), às severas consequências verificadas sobre gestantes e bebês ainda na fase gestacional (FLORES *et al.*, 2021), assim como a ocorrência de alterações oculares (CONCEIÇÃO *et al.*, 2021) e comportamentais que são verificadas nos casos mais graves (DESMETTRE, 2020). Além disso, as drogas atuais são incapazes de eliminar as fases latentes da doença, bem como acarretam severos efeitos adversos aos pacientes, levando ao abandono das terapias (ALDAY; DOGGETT, 2017).

É reportado na literatura que o ácido dicloroacético (DCA) inibe a proliferação de *T. gondii* em estudos *in vitro* (FERRARINI *et al.*, 2021), porém os alvos moleculares desse fármaco, no metabolismo dos parasitos, ainda são desconhecidos. Nesse sentido, os potenciais alvos biológicos de DCA podem estar relacionados às quinases PDK e/ou BCKDK, cuja localização mitocondrial as tornam candidatas à regulação do complexo BCKDH de *T. gondii* (FERRARINI *et al.*, 2021), porém, ainda há uma carência na literatura dos dados funcionais de ambas as quinases, bem como de estudos visando a expressão e caracterização de formas recombinantes dessas enzimas.

Além disso, a literatura postula que o complexo BCKDH, apesar de sua atividade majoritária voltada ao piruvato, ainda mantém uma atividade basal voltada aos aminoácidos (OPPENHEIM *et al.*, 2014), o que caracterizaria esse complexo com uma atividade “dupla”, participando de duas vias metabólicas diferentes. Nesse sentido, também se justifica que análises filogenéticas sejam realizadas a fim de se verificar a possibilidade de existir alguma subunidade E1-alfa de BCKDH ainda desconhecida, possivelmente voltada ao metabolismo dos aminoácidos, e que também se constituiria em um possível alvo biológico para as quinases PDK e/ou BCKDK.

Esses dados em conjunto podem fornecer subsídios tanto para uma melhor compreensão de questões ligadas ao metabolismo de *Toxoplasma*, quanto para o desenvolvimento de terapias mais efetivas voltadas à eliminação dos parasitos em diferentes fases do seu ciclo de vida.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características gerais do protozoário *Toxoplasma gondii*

As primeiras evidências científicas sobre a biologia do organismo *Toxoplasma gondii* remontam ao ano de 1908 e são atribuídas aos estudos conduzidos de forma independente por Nicolle e Manceaux, ligados ao Instituto Pasteur da Tunísia, e por Splendore, no Brasil (DUBEY, 2020). Nicolle e Manceaux observaram o novo patógeno a partir da análise histológica de tecidos infectados do roedor *Ctenodactylus gundi*, que ocorre no norte da África. Inicialmente esse novo microrganismo foi classificado junto ao gênero *Leishmania* (NICOLLE, CHARLES; MANCEAUX, 1908). Enquanto isso, Splendore relatou a presença do mesmo parasita ocorrendo em coelhos (SPLENDORE, 1908).

No ano seguinte, em 1909, Nicolle e Manceaux repropõem a classificação desse parasita, o qual não estaria adequadamente relacionado ao gênero *Leishmania*, mas que se tratava efetivamente de uma nova espécie (posicionando-a também em um novo gênero), a qual denominaram de *Toxoplasma gondii* (NICOLLE, C; MANCEAUX, 1909). Os radicais que compõem o nome do gênero (*toxon*: arco e *plasma*: forma), estão relacionados ao formato curvado do parasita, e o epíteto específico *gondii* seria uma referência ao roedor onde esse organismo foi originalmente encontrado (DUBEY, 2020).

T. gondii pertence ao filo Apicomplexa, grupo que abriga mais de 6.000 espécies de parasitas intracelulares obrigatórios, com a maior parte de seus representantes sendo classificados como de importância médica, dado os impactos negativos que proporcionam tanto sobre a saúde dos animais silvestres e domesticados quanto à saúde humana (VOTÝPKA *et al.*, 2016).

Dentro do filo Apicomplexa, podemos elencar outros gêneros importantes, como *Plasmodium* (ligado a organismos causadores da malária), *Cryptosporidium* (vinculado à criptosporidíase, doença relacionada à problemas intestinais) e *Babesia* (causador da babesiose, enfermidade transmitida por carrapatos e que desencadeia quadros de anemia) (ARISUE; HASHIMOTO, 2015).

Além desses, outros gêneros de importância veterinária também podem ser citados como *Besnoitia* (causador da besnoitiose, doença que acomete bovinos, causando prejuízos na pecuária) (DELOOZ *et al.*, 2021), *Neospora* (causador da

neosporose em bovinos e animais de produção, e que apresenta como hospedeiro definitivo os cães) (SOKOL-BORRELLI; COOMBS; BOYLE, 2020) e o gênero *Hammondia*, que afeta os enterócitos de diferentes hospedeiros, mas que se apresenta menos patogênico que *Toxoplasma* (WALZER *et al.*, 2013).

Os apicomplexos possuem algumas características exclusivas que os distinguem dos demais grupos, entre elas a presença do complexo apical que é um conjunto de organelas envolvidas no parasitismo de novas células hospedeiras, sendo composto pelas róptrias, micronemas e conoide (**Figura 1**) (KATRIS *et al.*, 2014).

As róptrias são organelas secretórias que ocupam de 10 a 30% do volume total da célula e atuam na liberação de proteínas que participam dos processos de invasão da célula hospedeira, formação do vacúolo parasitóforo, além de auxiliarem na troca de nutrientes e sinais entre o parasita e a célula hospedeira (DONGCHAO; NING; QIJUN, 2020; SHEINER *et al.*, 2010).

Os micronemas atuam na liberação de complexos proteicos que favorecem as interações entre o parasito e os receptores das células hospedeiras. Organismos contendo deleção gênica para proteínas secretadas pelos micronemas apresentam seus processos de invasão fortemente comprometidos (SHEINER *et al.*, 2010).

Os conoides são estruturas compostas por longos filamentos de tubulina, com disposição helicoidal, que formam uma estrutura em formato de funil e atuam na etapa de invasão da membrana plasmática da célula hospedeira (MORRISSETTE; GUBBELS, 2013).

Além do complexo apical, os apicomplexos apresentam os grânulos densos, organela secretória que atua na liberação de proteínas que interagem com a membrana do vacúolo parasitóforo, promovendo a formação de poros e aumentando a permeabilidade em relação a nutrientes originados da célula hospedeira, o que favorece a proliferação dos parasitos (GRIFFITH; PEARCE; HEASLIP, 2022).

Além do complexo apical, outra organela específica e importante na biologia desse grupo de organismos é o apicoplasto, que se caracteriza como um plastídio não-fotossintetizante, originado evolutivamente a partir de processos de endossimbiose secundária, contendo quatro membranas e que apresenta genoma próprio (ELAAGIP; ABSALON; FLORENTIN, 2022). Em termos metabólicos, o apicoplasto participa da síntese de ácidos graxos, isoprenoides e heme, os quais estão interligados a vias bioquímicas importantes para a sobrevivência dos parasitos (ARISUE; HASHIMOTO, 2015; SATO, 2011). Em relação aos ácidos graxos, no

apicoplasto está presente a via de produção de ácidos graxos do tipo II (*FAS II pathway*) que também ocorre em outros organismos que contém plastídios (como algas, outros cromalveolatas, e até vegetais superiores) (RYALL; HARPER; KEELING, 2003). Entretanto, apesar da grande participação metabólica atribuída ao apicoplasto, alguns representantes desse filo, como as gregarinas e os representantes do gênero *Cryptosporidium*, perderam essa organela durante o processo evolutivo (VOTÝPKA *et al.*, 2016).

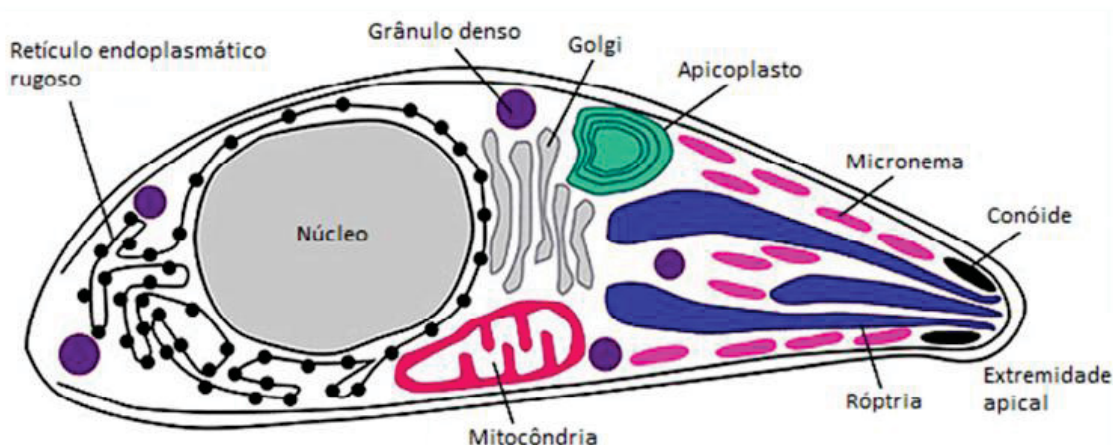


Figura 1. Esquema da ultraestrutura da forma taquizoíta de *Toxoplasma gondii*. Próximo à extremidade apical encontram-se o conóide, os micronemas e as róptrias. Proteínas derivadas dos micronemas e das róptrias são liberadas nos processos de invasão das células hospedeiras. Adaptado de AJIOKA; FITZPATRICK; REITTER, 2001.

Os dados relacionados ao genoma do apicoplasto têm sido utilizados para traçar a história evolutiva dos Apicomplexas, auxiliando na compreensão de questões relacionadas à epidemiologia e fisiologia de todo o grupo. O DNA do apicoplasto foi isolado pela primeira vez de *Plasmodium lophurae* como um extracromossomo circular com tamanho de 35 kb. Análises genéticas indicaram que as sequências nucleotídicas dessa organela estão organizadas de forma similar à encontrada nos plastídios de algas vermelhas, o que confirma a sua origem evolutiva através de eventos de endossimbiose secundária (ARISUE; HASHIMOTO, 2015).

Genomas de plastídios apresentam em média de 150 a 250 kb de comprimento. Em contrapartida, plastídios de vegetais não-fotossintetizantes apresentam genoma reduzido a 70 kb, e o mesmo ocorre em *T. gondii*, cujo genoma do apicoplasto contém tamanho aproximado de apenas 35 kb. A redução do genoma dessa organela está diretamente ligada às adaptações aos ciclos de vida voltados ao

parasitismo obrigatório, onde a capacidade fotossintética passou a não ser mais necessária, ocorrendo a perda seletiva desses genes (SEEBER *et al.*, 2020).

Dados filogenéticos apontam que o apicoplasto teve origem em um processo de endossimbiose secundária, explicando a presença das quatro membranas observadas nessa organela. Em um período inicial, uma cianobactéria fotossintetizante foi endocitada por um ancestral eucarioto ligado às algas, permitindo a aquisição da capacidade fotossintética, similar ao encontrado nos cloroplastos dos demais vegetais. Em uma segunda etapa evolutiva, ocorreu um processo de endocitose dessa alga ancestral em um hospedeiro secundário, resultando assim na obtenção de um plastídio em um organismo ancestral ligado ao supergrupo dos Chromalveolatas, ramo ao qual pertence os Apicomplexas (**Figura 2**) (STRIEPEN, 2011).

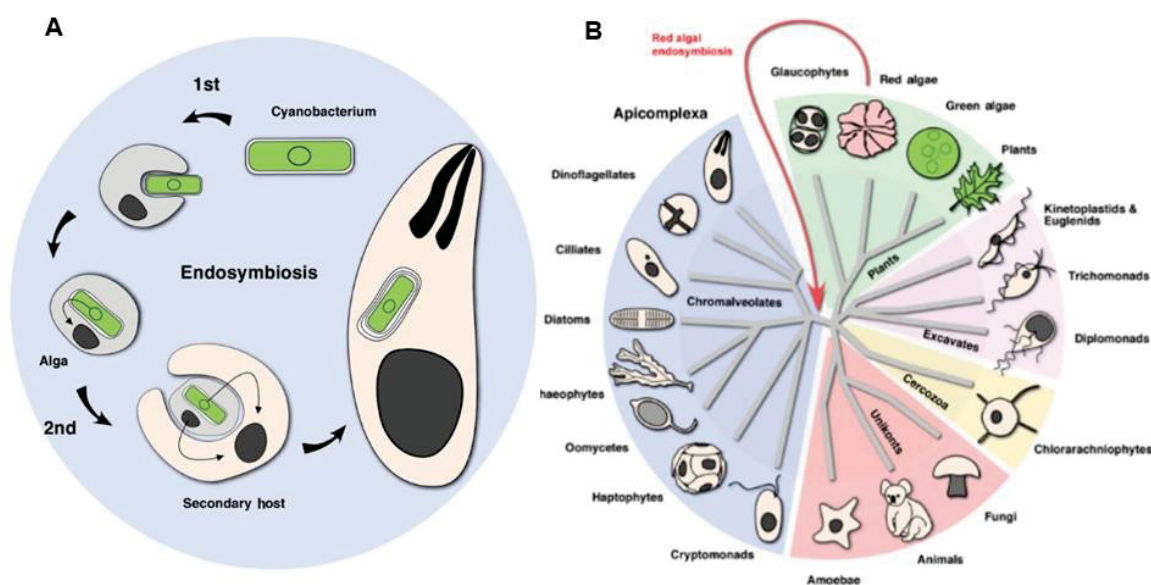


Figura 2. Origem do apicoplasto nos apicomplexas. A. Representação esquemática da origem do apicoplasto através de sucessivas etapas de endossimbiose. B. Caminho mais provável da evolução, envolvendo o endocitose que uma alga vermelha por um ancestral ligado ao Chromalveolatas. Adaptado de STRIEPEN, 2011.

A sobrevivência de *T. gondii* é totalmente dependente das vias metabólicas do apicoplasto. Em parasitas duplo-nocautes para as quinases PYK1 e PYK2, que atuam na conversão do fosfoenolpiruvato em piruvato, e que ocorrem no citoplasma e apicoplasto, respectivamente, se observa que o bloqueio na conversão do piruvato acarreta a paralisação das vias metabólicas ligadas ao apicoplasto, sendo que esse substrato é essencial para a via metabólica dos ácidos graxos e para a síntese de

isoprenoides. Como consequência, os parasitos perdem os apicoplastos, ocorre redução da expressão gênica do complexo PDH dessa organela, e, por consequência, os parasitos são incapazes de realizar a proliferação celular (XIA *et al.*, 2019).

Abordagens farmacológicas voltadas ao bloqueio de vias bioquímicas do apicoplasto também têm sido sugeridas, como o uso da azitromicina, que bloqueia a maquinaria de tradução dessa organela (AMANZOUAGAGHENE *et al.*, 2024). As drogas relacionadas à fluoroquinolonas e rifampicina também tem perfil de ação sobre a enzima DNA girase e sobre a transcrição de RNA do apicoplasto, bloqueando de forma indireta a proliferação dos parasitos (LOW *et al.*, 2018).

2.2 Ciclo de vida

T. gondii apresenta ciclo de vida complexo, envolvendo diferentes estágios de desenvolvimento. Os felinos (tanto domésticos quanto selvagens) são considerados os hospedeiros definitivos, pois no sistema digestivo destes animais ocorre a fase sexuada do ciclo de vida, com a formação de oocistos que são liberados no ambiente através das fezes (DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ *et al.*, 2019).

Os oocistos podem contaminar fontes de água e vegetais usados na alimentação humana e animal. Após a ingestão, a membrana dos oocistos é degradada e ocorre a liberação dos esporozoítas, que invadem o epitélio intestinal dos hospedeiros. Dentro das células, os esporozoítas se diferenciam em taquizoítas, forma caracterizada pela grande capacidade de infecção, pois podem invadir novas células e se multiplicar rapidamente (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Durante o processo de invasão da forma taquizoíta, que dura aproximadamente de 20 a 30 segundos, proteínas liberadas pelo complexo apical do parasito promovem interações com os receptores da célula hospedeira, promovendo a sua invaginação e a interiorização do parasita, com a consequente formação do vacúolo parasitóforo (SIBLEY; DAVID SIBLEY, 2011). Dentro do vacúolo parasitóforo, ocorrem sucessivas etapas de multiplicação do parasita que levam ao rompimento da célula hospedeira. Após a lise celular, os parasitas são liberados, reiniciando as etapas de infecção e multiplicação celular (PORTES *et al.*, 2023). Todo esse processo leva à ativação do sistema imunológico do hospedeiro e, por consequência, à queda na multiplicação dos taquizoítas. Em contrapartida, para conseguir evadir do sistema imune, alguns

taquizoítas passam a se diferenciar em bradizoítas, forma de crescimento lento e caracterizada pela formação de cistos teciduais que afetam principalmente a musculatura e o sistema nervoso dos pacientes (CERUTTI; BLANCHARD; BESTEIRO, 2020).

Os cistos teciduais presentes na carne de animais contaminados também são fontes de contágio aos animais carnívoros (como os felinos) e aos seres humanos. Casos de contaminação através de procedimentos de transfusão de sangue e transplante de órgãos também já foram relatados. Além disso, a transmissão vertical dos parasitos durante a gravidez também ocorre, acarretando severos danos neurológicos e oculares nos fetos (**Figura 3**) (MAREZE *et al.*, 2019).

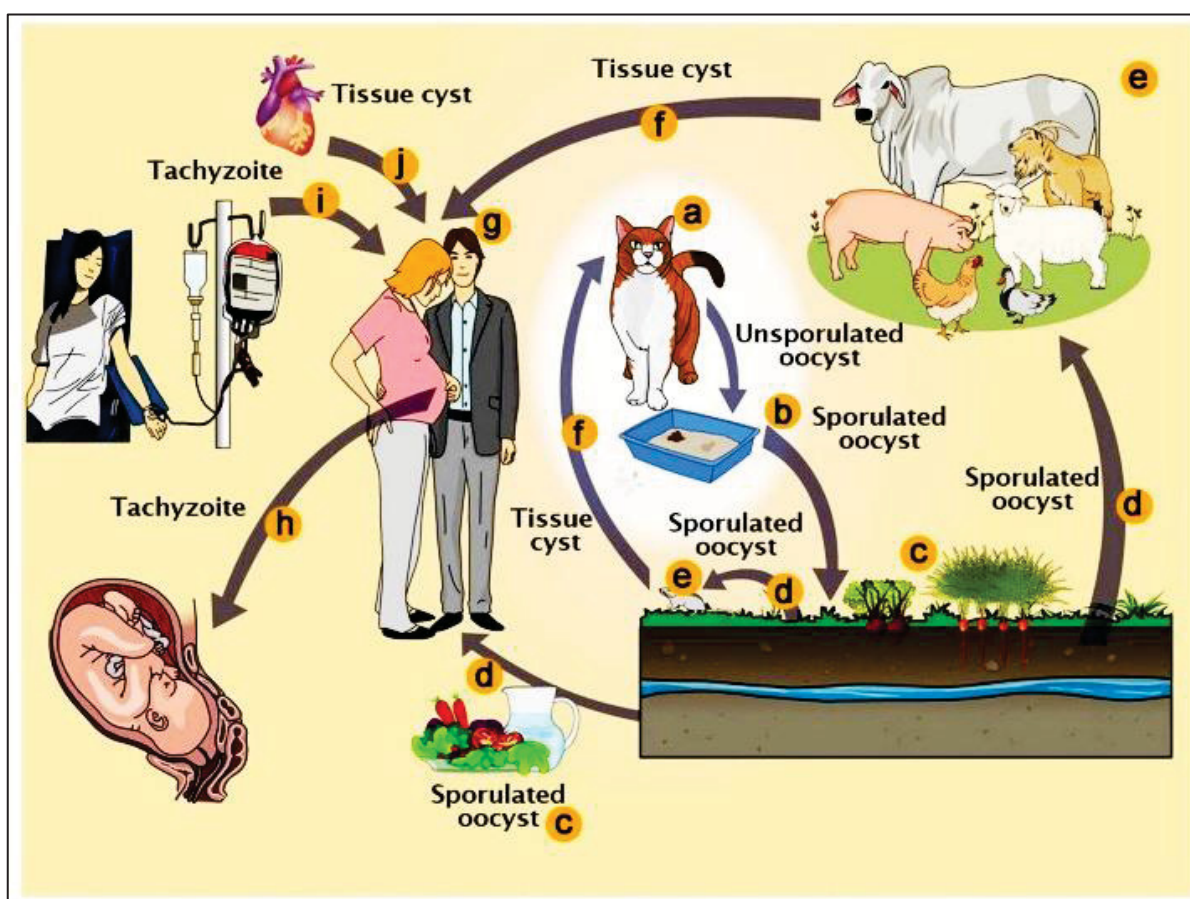


Figura 3. Etapas do ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*, mostrando as rotas de transmissão do parasita entre diferentes hospedeiros. A. Felinos são os hospedeiros definitivos e neles ocorre a fase sexual do ciclo de vida de *T. gondii*. **B e C.** Os oocistos esporulam e contaminam o solo, alimentos e corpos de água. **D.** Herbívoros podem se contaminar através desses oocistos espalhados pelo ambiente, constituído os hospedeiros intermediários. **E.** Após a ingestão dos oocistos, ocorre a infecção dos hospedeiros intermediários, dando origem aos cistos teciduais. **F e G.** Contaminação dos seres humanos ou de outros animais carnívoros através da ingestão de carne crua ou malcozida. **H.** Transmissão vertical do parasita durante a gestação, causando graves problemas de saúde aos bebês. **I e J.** Infecção em humanos por *T. gondii* em transfusões de sangue e transplante de órgãos. Adaptado de ATTÍAS *et al.*, 2020.

2.3 Distribuição geográfica e Diversidade Genética

Os primeiros estudos sobre a diversidade genética de *T. gondii* foram realizados por Howe e Sibley em 1995 a partir da análise de 106 isolados originados da América do Norte e Europa. Utilizando técnicas de PCR/RFLP, os autores observaram a existência de três linhagens clonais diferentes, as quais foram nomeadas de Tipos I, II e III. Nessa época foi proposto uma maior prevalência do Tipo I em infecções congênitas, o Tipo II em pacientes com AIDS acometidos por encefalite, e o Tipo III presente em animais (HOWE; SIBLEY, 1995).

Em 2011, uma 4ª linhagem clonal (Tipo IV) foi identificada na América do Norte (também conhecida como halogrupo 12), possivelmente endêmica para esse continente e ocorrendo majoritariamente junto à fauna silvestre (KHAN *et al.*, 2011).

Entretanto, diferente do originalmente proposto, *T. gondii* é altamente diverso em outras regiões geográficas. Dados moleculares envolvendo a análise conjunta de marcadores de polimorfismos em 950 isolados, abrangendo mais de 30 regiões gênicas indicou uma alta taxa de recombinação e diversidade gênica para a América do Sul, o que contrasta com os perfis gênicos mais conservados da América do Norte, permitindo então a classificação dos isolados em 06 clados distintos (SU *et al.*, 2012).

Outro estudo, utilizando abordagens de genotipagem de cepas por PCR-RFLP identificou a presença de mais de 156 genótipos ocorrendo conjuntamente na América do Sul e Central, sem a presença de genótipos dominantes, diferente do que ocorre no hemisfério norte e em outros continentes (**Figura 4**) (SHWAB *et al.*, 2014).

No Brasil, somente no estado do Mato Grosso foram identificados 22 genótipos de *T. gondii* junto à fauna (cães, gatos, animais de produção e silvestres), com 05 genótipos ainda desconhecidos, o que também traz preocupações sérias em relação às questões de saúde pública dado o consumo de carnes ser uma das principais vias de infecção em humanos (BRITO *et al.*, 2023).

As cepas atípicas têm sido associadas a um perfil de virulência maior, assim como quadros patológicos mais graves. Na América do Sul os casos de toxoplasmose ocular tendem a gerar lesões mais graves, maiores e mais numerosas do que as encontradas na Europa (DE-LA-TORRE *et al.*, 2013). Dados experimentais *in vivo*, com o uso de murinos, têm demonstrado que a cepa atípica CK2 (isolada a partir de aviários do Rio Grande do Norte), leva a um maior número de cistos cerebrais e de infiltrados inflamatórios, bem como quadros de ansiedade e depressão, em

comparação com a linhagem ME49 (Tipo II), além de alterações na relação fisiológica entre neurônios e micrógliã.

Quadros infecciosos de cepas atípicas da Amazônia (também conhecida como toxoplasmose amazônica) têm sido associados com febre persistente, aparecimento de sinais cutâneos, além de hepatomegalia, esplenomegalia e linfadenopatia (BLAIZOT *et al.*, 2019).

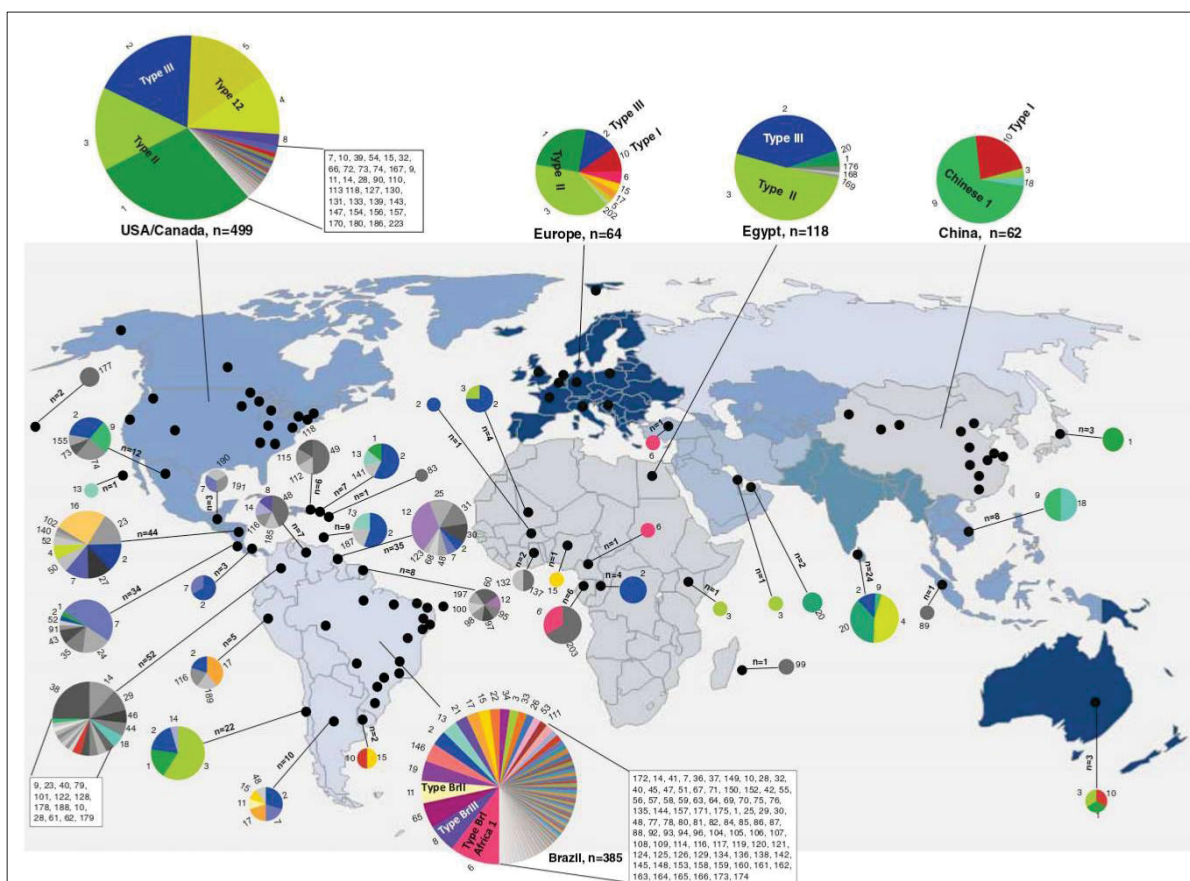


Figura 4. Distribuição geográfica dos genótipos de *Toxoplasma gondii*. Os círculos escuros indicam os locais de amostragem dos isolados e os gráficos coloridos indicam a quantidade de genótipos encontrados em cada região. Adaptado de SHWAB *et al.*, 2014.

Análises de filogeografia usando 168 isolados derivados de todos os continentes, têm indicado que o ancestral de *T. gondii*, emergiu na América do Sul há cerca de 1,5 milhões de anos e esteve ligado à migração dos felídeos entre as Américas, depois da formação do Istmo do Panamá (BERTRANPETIT *et al.*, 2017; O'BRIEN *et al.*, 2008). De forma semelhante, roedores da família Muridae, possíveis hospedeiros intermediários iniciais, também adentraram o território sul-americano nessa mesma época (WEBB, 2006). A expansão dos felídeos pelo continente sul-americano, bem como dos roedores, levou o parasita para novos ambientes, bem como permitiu a ocorrência da infecção em uma gama maior de hospedeiros. Assim,

as novas pressões evolutivas favoreceram a seleção de novas linhagens com maior virulência e infectividade (**Figura 5**) (BERTRANPETIT *et al.*, 2017).

Dessa forma, as cepas da América do Sul adquiriram uma maior competência no processo transmissão oral (pelo carnivorismo de presas contaminadas) do que as cepas originais, gerando vantagem competitiva na etapa de transmissão. Devido a migração dos animais entre as Américas, alguns dos novos genótipos de *Toxoplasma* podem ter voltado à América do Norte, passando então pelo Estreito de Bering, chegando à Ásia, Europa e África (BERTRANPETIT *et al.*, 2017). A expansão de poucas linhagens de *T. gondii* no Velho Mundo pode ser atribuída ao fato de que, diferente da diversidade de felídeos das Américas, o gato doméstico foi o principal hospedeiro definitivo, e com isso, somente os genótipos de parasitas mais adaptados a esse animal foram os que puderam ser mais facilmente dispersos (Müller & Howard, 2016).

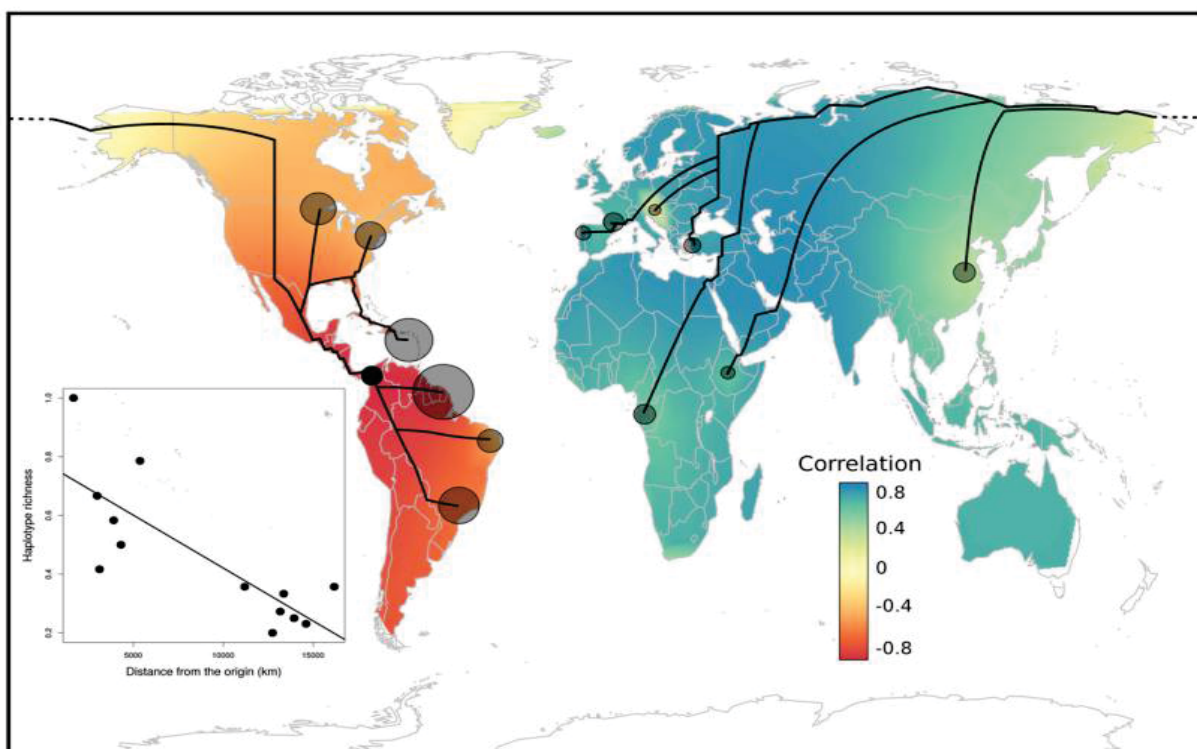


Figura 5. Histórico de dispersão das linhagens de *T. gondii* inferida a partir de cinco marcadores moleculares. A diversidade de haplótipos dentro das populações (círculos cinza) é correlacionada à distância geográfica de várias origens, indicada pelo sombreamento de cores. O caminho mais curto correspondente da origem até as várias populações é indicado pelas linhas pretas sólidas. Adaptado de BERTRANPETIT *et al.*, 2017.

2.4 Toxoplasmose como problema de saúde pública

Estimativas indicam que 30 a 50% da população mundial está infectada com *T. gondii*, porém essas taxas variam conforme o país e as condições socioeconômicas (**Figura 6**). Altas taxas de infecção são verificadas no Brasil (77,5%), Colômbia (63,5%), Cuba (61,8%) e São Tomé e Príncipe (75,2%) (PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009). Em países desenvolvidos, como nos Estados Unidos, as taxas de infecção verificadas são menores (22,5%), porém as estimativas para esse país apontam para mais de 1 milhão de novos casos a cada ano (MONTAZERI *et al.*, 2017).

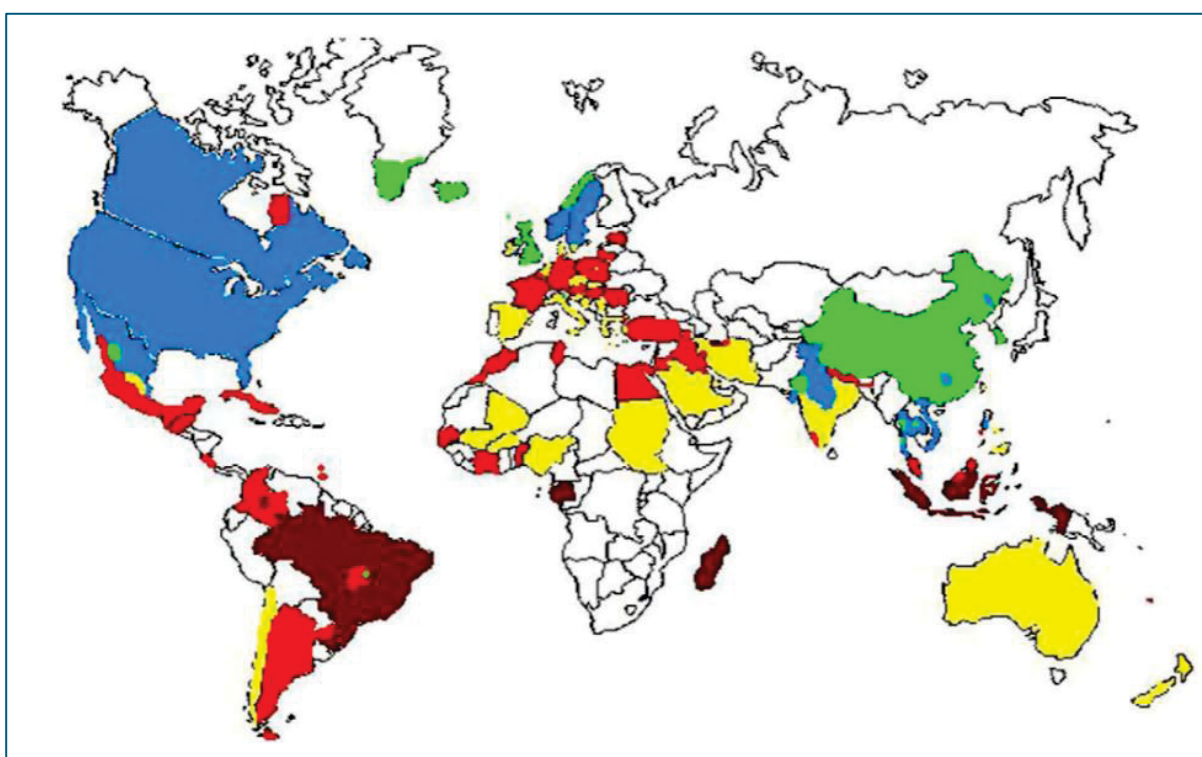


Figura 6. Mapa simplificado da soroprevalência global para *Toxoplasma gondii*. Legenda de cores: vermelho-escuro: >60%; vermelho: 40-60%, amarelo: 20-40%, azul: 10-20%; verde: <10%; branco: sem dados. Áreas listradas apresentam diferentes conforme a localidade. Adaptado de PAPPAS *et al.*, 2009.

Embora o sistema imune seja capaz de controlar a infecção primária, a presença de cistos teciduais pode reativar a infecção e induzir danos irreversíveis. Nos casos de reativação de cistos oculares, as lesões da retina podem evoluir para a perda total da visão (FABIANI *et al.*, 2022). Pacientes imunocomprometidos ou sob condições medicamentosas de imunossupressão (como no caso de pacientes oncológicos sob tratamentos quimioterápicos), a toxoplasmose pode evoluir para

quadros sistêmicos, podendo desencadear miocardite, inflamações na musculatura e encefalite (GHARAMTI *et al.*, 2018).

O mesmo ocorre em pacientes portadores do vírus HIV, cujo acometimento do sistema imune permite uma maior proliferação dos parasitos levando a um número aumentado de casos de toxoplasmose cerebral (BOKHARAEI-SALIM *et al.*, 2020). Além disso, a presença de cistos no sistema nervoso central tem sido correlacionada a mudanças no comportamento, com risco aumentado de transtornos psiquiátricos como esquizofrenia (ROSADO *et al.*, 2024), impulsividade e agressividade (COCCARO *et al.*, 2016).

Gestantes também são um grupo de risco para a toxoplasmose, dado a transferência materno-fetal dos parasitos. A incidência da toxoplasmose congênita varia em relação ao período da gestação no qual a infecção materna foi adquirida. Em mulheres não-tratadas, a taxa de transmissão para os fetos é de aproximadamente 25% no primeiro trimestre, de 54% no segundo trimestre e de 65% no terceiro trimestre. Estudos em animais demonstram que os taquizoítas podem infectar as células uterinas, atingindo o embrião através da placenta (MCAULEY, 2014).

Estudos conduzidos na França mostraram que durante a gravidez, tanto a prevenção como a administração de fármacos adequados, ajudam a diminuir os riscos de sintomas e sequelas nos recém-nascidos (WALLON; PEYRON, 2015). As manifestações clínicas da toxoplasmose congênita podem ser variadas, incluindo micro ou macrocefalia, nascimento prematuro, alterações motoras, presença de calcificações cerebrais, alterações hematológicas, catarata e cegueira (BOLLANI *et al.*, 2022).

2.5 Tratamentos para a toxoplasmose: fármacos atuais e principais desafios

A estratégia farmacológica normalmente utilizada contra a infecção por *Toxoplasma* consiste na combinação de duas drogas: pirimetamina e sulfadiazina. Esses fármacos agem sinergicamente, atuando sobre a proliferação e a sobrevivência dos parasitos através da inibição da via metabólica do folato (DUNAY *et al.*, 2018).

Contudo, estas drogas também podem afetar vias presentes em células humanas, visto que efeitos adversos associados à pirimetamina estão associados à inibição da via do ácido fólico em tecidos com alta atividade metabólica, como epitélio

e medula óssea, e ocorrem de forma significativa e independem da manifestação clínica da infecção (BEN-HARARI; GOODWIN; CASOY, 2017).

De modo geral, é consenso que os efeitos tóxicos das drogas rotineiramente usadas são significativos. Um estudo, com a análise de 115 pacientes acometidos pela toxoplasmose e com sintomas de encefalite, indicou que 62% sofreram efeitos adversos devido ao uso de sulfadiazina, resultando no abandono das terapias de 1/3 dos pacientes (ALDAY; DOGGETT, 2017).

Em pacientes alérgicos à sulfadiazina esse fármaco pode ser substituído por clindamicina, porém o tratamento se torna menos efetivo e ainda com possibilidade de efeitos adversos (Katlama et al., 1996). O uso combinado de sulfametoxazol e trimetoprima também tem demonstrado eficácia semelhante a pirimetamina-sulfadiazina e pode ser usada como uma alternativa em pacientes que não toleram pirimetamina, ou quando a droga não está disponível. Além dos efeitos colaterais, pirimetamina e sulfadiazina estão associadas com reações severas raras, como necrólise epidermal, danos hepáticos e alterações hematológicas (ALDAY; DOGGETT, 2017).

Outro agravante é a necessidade de terapias de longa duração, que podem ser de 4 a 6 semanas para os casos de infecção ocular, e até 1 ano em pacientes com infecção congênita (DE-LA-TORRE *et al.*, 2011). Tratamentos ainda mais longos podem ser necessários dado que os medicamentos atuais são incapazes de afetar os bradizoítas e por consequência são ineficazes na eliminação dos cistos teciduais, que podem levar reiniciar os processos infecciosos (HAN *et al.*, 2020).

Para formulações de novos tratamentos algumas questões precisam ser contempladas, como a diminuição dos efeitos colaterais, a redução do tempo de exposição aos fármacos, bem como a busca por alvos específicos de *T. gondii*, focando em atingir também os cistos teciduais em prol de terapias mais efetivas e com menores efeitos colaterais.

Nesse contexto, explorar as características exclusivas que distinguem os parasitas em relação às células de mamíferos pode se constituir em uma abordagem promissora para o desenvolvimento de terapias mais eficientes, em especial para o desenvolvimento de fármacos voltados à saúde humana.

Uma das características marcantes do metabolismo energético em *Toxoplasma* em relação as células hospedeiras está relacionada à produção de ATP majoritariamente através da glicólise, com uma menor participação das vias

mitocondriais, onde a glicólise é uma via essencial para os estágios replicativos, bem importante nas etapas de formação dos cistos teciduais (SHUKLA et al., 2018).

Esse perfil glicolítico de *Toxoplasma* se aproxima com o perfil metabólico apresentado pelas células de tumores, o qual é conhecido como efeito Warburg (Figura 7), cujo metabolismo tende a reprimir as vias mitocondriais em prol da glicólise, o que produz um acúmulo de biomassa de carbono no interior de célula, favorecendo a proliferação celular (LIBERTI; LOCASALE, 2016). A produção de lactato, verificada tanto em tumores quanto nos apicomplexas, é relacionada à evasão do sistema imune no caso de tumores (ZHANG, YUANYUAN et al., 2022) e à acidificação do vacúolo parasitóforo, no caso dos parasitos, permitindo seu egresso da célula hospedeira (HUYNH; CARRUTHERS, 2022).

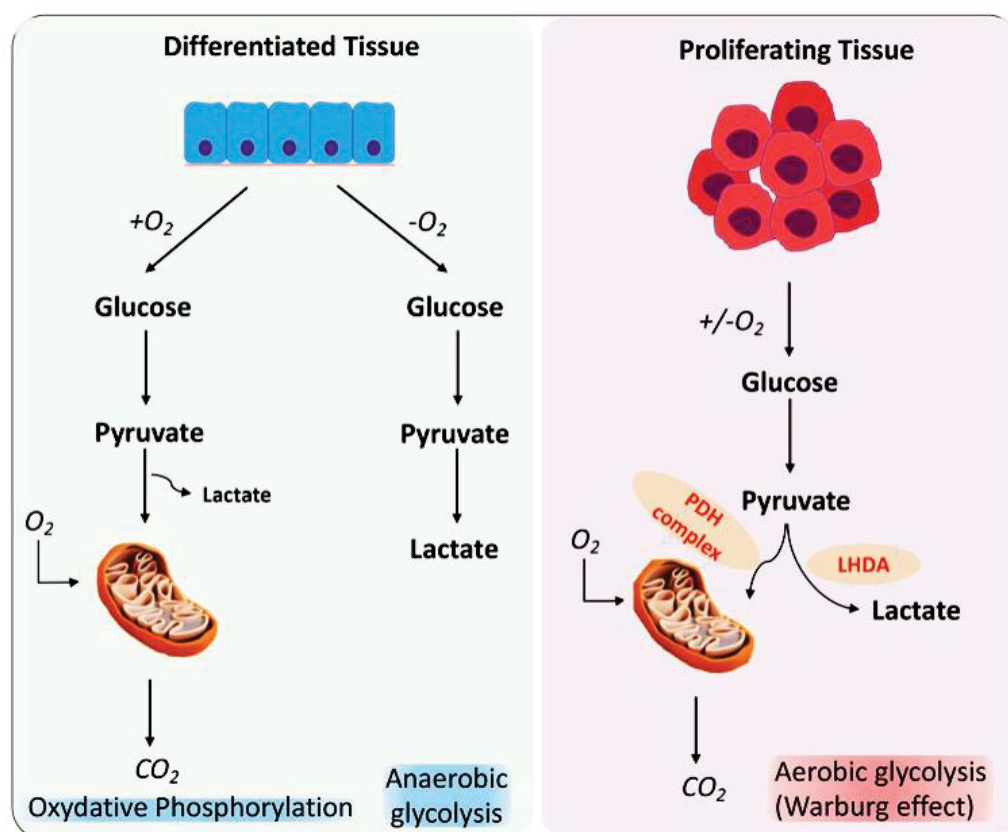


Figura 7. Diferenças metabólicas entre tecidos diferenciados e tecidos proliferativos ou tumorais. Células diferenciadas tendem a metabolizar o piruvato através das vias mitocondriais em condições fisiológicas ricas em oxigênio, porém em condições anóxicas ocorre a reversão do metabolismo para um perfil fermentativo, com a conversão do piruvato (substrato final da glicólise) em lactato. Células altamente proliferativas ou tumorais, mesmo quando o oxigênio não é um recurso limitante, mantem um metabolismo central na glicólise. Adaptado de BOSE et al., 2021.

Os tumores promovem a superexpressão de quinases do tipo PDKs (piruvato desidrogenase quinases), que em humanos ocorrem em quatro variantes (PDKs 1 a

4). Essas quinases atuam bloqueando a atividade do complexo piruvato desidrogenase (PDH) através de fosforilação (**Figura 8**), o que impede a atividade catalítica desse complexo na conversão do piruvato em acetil-CoA (TAO; TAO; CAI, 2024).

O ácido dicloroacético (DCA) é um inibidor de quinases voltadas à inibição de PDKs, e é eficiente na redução de tumores através da reversão do perfil glicolítico dessas células, o que também reativa as vias mitocondriais ligadas à apoptose (KOLTAI; FLIEGEL, 2024).

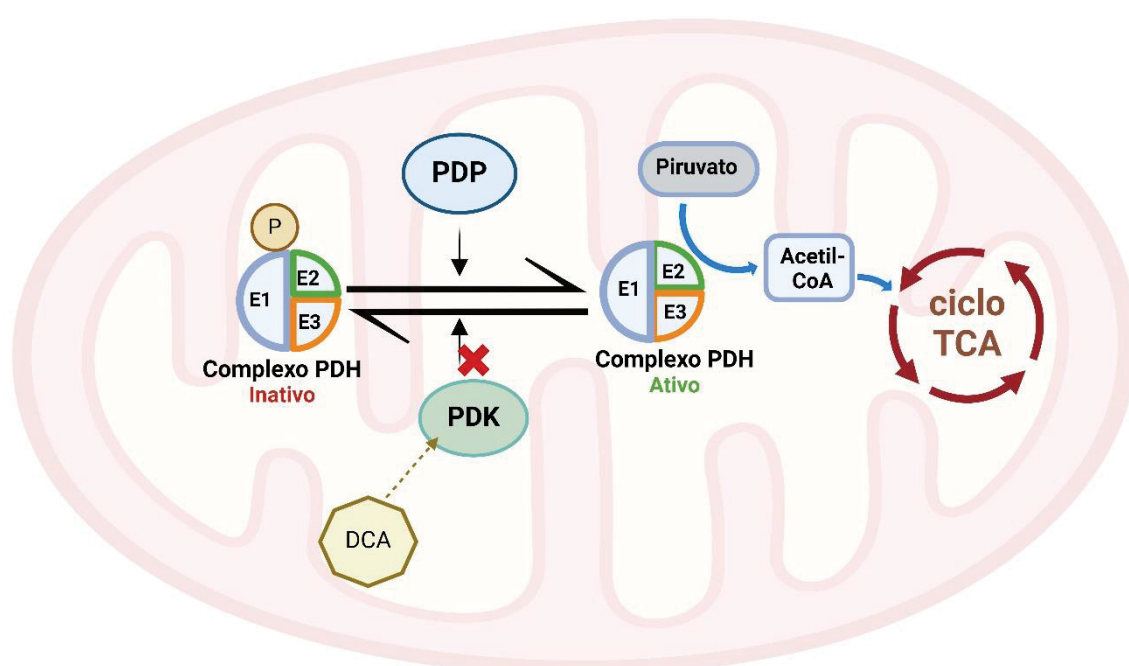


Figura 8. Mecanismo de ação de DCA sobre a quinase PDK. A quinase PDK atua fosforilando o complexo PDH, desativando a sua atividade catalítica. Em contrapartida, a enzima PDP (piruvato desidrogenase fosfatase) atua reativando o complexo PDH através da remoção do grupo fosfato. A droga DCA atua sobre a enzima PDK, impedindo a sua atividade, o que mantém o complexo PDH constantemente ativo. Figura do autor, utilizando a ferramenta online Biorender.

Esse mesmo fármaco demonstrou eficácia no tratamento dos sintomas de acidose láctica verificados em pacientes com malária (*Plasmodium*, Apicomplexa), que, em casos severos, pode acarretar a morte dos pacientes (AGBENYEGA *et al.*, 2003). Do mesmo modo, estudos *in vitro* evidenciaram que DCA reprime a proliferação de *T. gondii*, com o aumento da produção de ATP, o que indicaria a presença de algum alvo molecular de DCA no metabolismo desses parasitos, possivelmente relacionado a uma possível quinase regulatória, que atuaria reprimindo a ação de um complexo desidrogenase (FERRARINI *et al.*, 2021).

Entretanto, algumas características únicas encontradas nos parasitos dificultam a determinação adequada do alvo biológico de DCA nos parasitos. Os apicomplexas apresentam duas organelas distintas que atuam sobre o metabolismo do piruvato, o apicoplasto e a mitocôndria, e que contém os complexos desidrogenases PDH e BCKDH, respectivamente. Além disso, a presença de duas quinases na mitocôndria (PDK e BCKDK) que poderiam regular o complexo desidrogenase dessa organela, dificulta ainda mais o esclarecimento de todo esse panorama bioquímico.

Para entendermos melhor a atuação desses complexos desidrogenases, e a possível participação de quinases regulatórias a nível mitocondrial, é importante um olhar mais aprofundado em relação aos aspectos funcionais e de atividade enzimática desses complexos enzimáticos e sua regulação. Dessa forma, é essencial a busca por mais informações a partir de dados científicos já consolidados para outros grupos de organismos.

2.6 Complexos desidrogenases no metabolismo celular

2.6.1 Estrutura dos complexos desidrogenases

Entre os diferentes complexos desidrogenases presentes nos organismos, a família dos complexos desidrogenases de alfa-cetoácidos (KDH, *alfa ketoacid dehydrogenase complexes*), desempenha um papel metabólico central, permitindo a degradação de substratos derivados de monossacarídeos, aminoácidos e ácidos graxos, e garantindo uma grande flexibilidade energética para as células. Na família dos KDHs estão incluídos o complexo Piruvato Desidrogenase (PDH), complexo desidrogenase de alfa-cetoácidos de cadeia ramificada (BCKDH), complexo desidrogenase de alfa-cetoglutaratos (KGDH) e complexo desidrogenase de oxoadipatos (KAGH) (MAILLOUX, 2024).

Esses complexos estão estruturalmente e filogeneticamente relacionados, e apresentam a mesma configuração básica desde os procariotos até os eucariotos (SCHNARRENBARGER; MARTIN, 2002), e são estruturados a partir de múltiplas cópias de três componentes fundamentais (E1, E2 e E3), sendo que o componente

E2 estrutura uma região central permitindo a ligação dos componentes E1 e E3 que estão posicionados na região periférica do complexo (SZABO *et al.*, 2024).

Além dessa configuração básica, o complexo PDH de eucariotos apresenta algumas peculiaridades, como a estruturação do componente E2 na forma de icosaedro, diferente da estrutura de octaedro observada em BCKDH e KGDH (HEVLER *et al.*, 2023) e a presença de um componente adicional denominado de E3BP (E3-binding protein) encontrado em fungos e mamíferos (FORSBERG, 2023) (**Figura 9**).

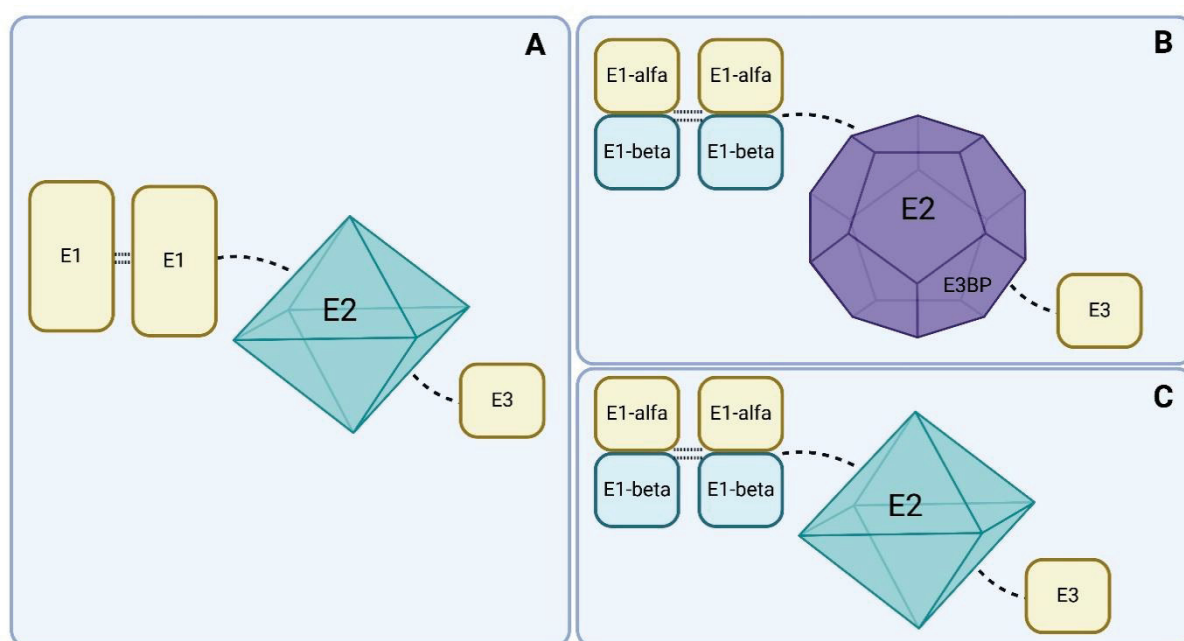


Figura 9. Esquema representativo da organização estrutural dos complexos desidrogenases. A. O complexo KGDH (reportado para quase todos os organismos) e os complexos PDH e BCKDH da maioria das bactérias gram-negativas apresenta componente E1 estruturado na forma de homodímero. B e C. Complexos PDH e BCKDH de bactérias gram-positivas e dos eucariotos apresentam componente E1 na forma de heterotetrâmero, com a fusão de cadeias peptídicas relacionadas às subunidades E1-alfa e E1-beta. Ocorre também diferenças quanto a estruturação do componente E2 nesses organismos. Figura do autor, utilizando a ferramenta online Biorender, com bases nas informações de HEVLER *et al.*, 2023.

As reações catalíticas básicas desses complexos envolvem a descarboxilação de um alfa-cetoácido pelo componente E1, seguida de transesterificação com uma Coenzima A (CoA), gerando um acil-CoA com a participação do componente E2. Esse processo também conta com a participação do componente E3, que fornece energia a partir da clivagem de FAD, formando ao final um NADH (**Figura 10**) (SZABO *et al.*, 2024).

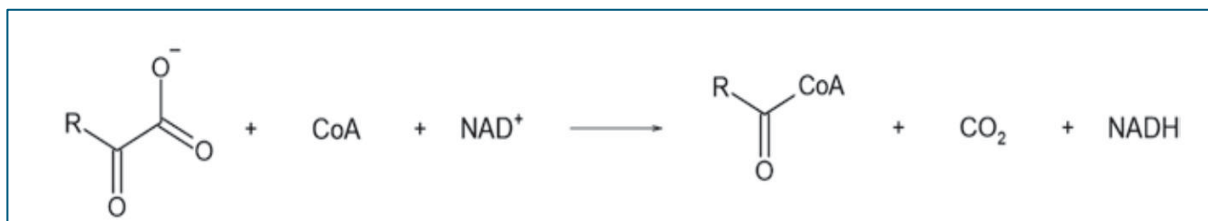


Figura 10. Esquema geral das reações catalisadas pelos complexos desidrogenases de alfa-cetoácidos.

Dados de filogenia têm apontado para uma origem mais ancestral do complexo BCKDH em relação ao complexo PDH, o qual surgiu posteriormente a partir do aumento da disponibilidade de oxigênio na atmosfera há cerca de 02 bilhões de anos, permitindo aos organismos a geração de ATP a partir da respiração aeróbica (STACPOOLE; MCCALL, 2023). Essa divergência evolutiva, que culminou no surgimento do complexo PDH, a partir de BCKDH, é atribuído a processos de neofuncionalização, ou seja, quando um complexo proteico adquire uma nova função com o transcorrer dos processos evolutivos (SCHNARRENBARGER; MARTIN, 2002).

A especificidade de cada complexo é mediada pela interação dos substratos com o componente E1, e em menor grau também a partir de interações com o componente E2, enquanto o componente E3, pode ser compartilhado entre os diferentes complexos (SZABO *et al.*, 2024).

Em eucariotos e procariotos gram-positivos o componente E1 de BCKDH e PDH é subdividido em unidades menores, denominadas de subunidades E1-alfa e E1-beta, sendo expressas a partir de genes distintos. A subunidade E1-alfa é funcionalmente dependente de sua ligação com a subunidade E1-beta. Na ausência dessa ligação, a subunidade E1-alfa é totalmente inativa, bem como não é reconhecida por quinases regulatórias (como BCKDK e PDK, respectivamente) (JENG; HUH; SONG, 1994).

Após a ligação entre as subunidades E1-alfa e E1-beta, ocorre então uma interligação com um par de subunidades homólogas, formando um heterotetrâmero, com uma configuração denominada de $\alpha 2\beta 2$. De forma contrastante, em bactérias gram-negativas o componente E1 é expresso a partir de um gene único, que quando dimerizado é caracterizado como um homodímero (SCHREINER *et al.*, 2005), com exceções reportadas para os gêneros *Zymomonas* e *Thiobacillus* que são bactérias

gram-negativas, mas com subunidade E1 na forma de heterotetrâmero (NEVELING; BRINGER-MEYER; SAHM, 1998).

De forma interessante, o componente E1 do complexo KGDH, se manteve na forma de homodímero em todos os organismos, permanecendo uma lacuna científica quanto à origem ancestral do componente E1 desses complexos desidrogenases, se a partir de um gene único (que sofreu clivagem posterior), ou a partir da fusão de genes relacionados às subunidades E1-alfa e E1-beta (FRANK *et al.*, 2007).

Dado ao foco do nosso estudo estar ligado a atividade e regulação dos complexos PDH e BCKDH em *Toxoplasma*, abordaremos adiante um panorama mais aprofundado somente sobre esses 02 complexos enzimáticos.

2.6.2 Metabolismo do complexo PDH

O complexo PDH se caracteriza como o maior complexo enzimático dos organismos, tanto de procariotos quanto de eucariotos, com peso molecular de cerca de 9 milhões de Daltons, e catalisa a conversão do piruvato em condições aeróbicas, resultando na produção de acetil-CoA, NADH e liberação de CO₂ (SZABO *et al.*, 2024).

Existem duas configurações de complexos PDH, os residentes nas mitocôndrias (mtPDH) e os complexos PDH de plastídios (pIPDH). Ambos os complexos são direcionados para a conversão de piruvato em acetil-CoA, porém enquanto mtPDH fornece substratos para o ciclo de Krebs, o pIPDH fornece acetil-CoA para a via de produção de ácidos graxos (LEI *et al.*, 2022), ocorrendo tanto em vegetais, algas e nos apicomplexas (RYALL; HARPER; KEELING, 2003) (**Figura 11**).

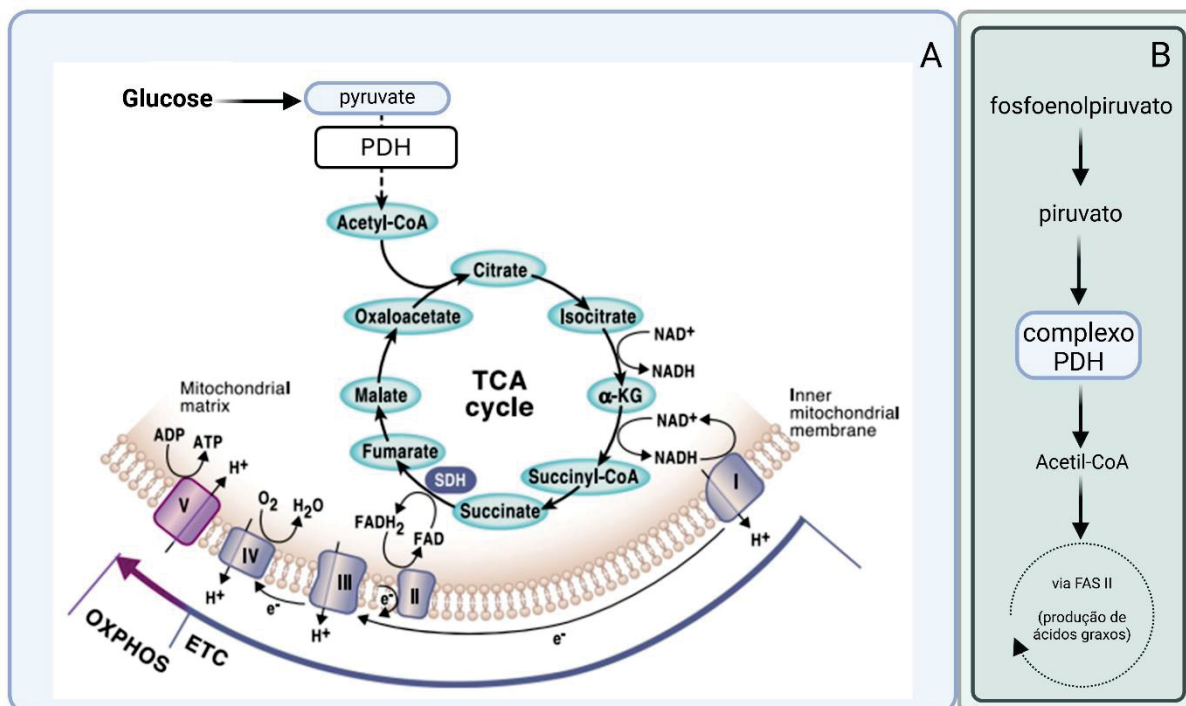


Figura 11. Participação do complexo PDH no metabolismo do piruvato em mitocôndrias e plastídios. A: Na mitocôndria, o complexo PDH atua na formação de acetil-CoA, que então é utilizado no ciclo de Krebs, fornecendo energia para cadeia de transporte de elétrons (ETC) e fosforilação oxidativa). **B:** participação do complexo PDH na conversão de piruvato e acetil-CoA nos plastídios (incluindo o apicoplasto), na produção de ácidos graxos. Adaptado de MARTÍNEZ-REYES & CHANDEL, 2020; STORM & MÜLLER, 2012.

As células vegetais são as únicas a possuírem 02 complexos PDH simultaneamente, porém enquanto mtPDH é regulado através da ação de quinases e fosfatases, o pIPDH é autoregulado, através de autoinibição mediada tanto pelos subprodutos relacionados ao processamento enzimático do próprio complexo, quanto pelo ambiente bioquímico variável do estroma dos cloroplastos (TOVAR-MÉNDEZ; MIERNYK; RANDALL, 2003). Como já mencionado anteriormente, o apicoplasto presente nos parasitos apicomplexas é evolutivamente derivado dos plastídios de algas vermelhas, que foram adquiridos por meio de endossimbiose secundária (ARISUE & HASHIMOTO, 2015).

Até o momento não foram encontradas quinases da família das PDKs nessa organela (FERRARINI *et al.*, 2021), e o Atlas do Quinoma (https://www.cellimagelibrary.org/pages/kinome_atlas) afirma que essa família de quinases é essencialmente mitocondrial, sem a presença de representantes dessas enzimas em outras organelas, o que nos indica que o complexo PDH do apicoplasto

provavelmente segue a regra geral de autoinibição encontrada nos pIPDHs dos demais organismos vegetais.

A regulação do complexo mtPDH ocorre pela ação de PDKs (piruvato desidrogenases quinases), que realizam a fosforilação de um sítio de serina altamente conservado presente na subunidade E1-alfa desse complexo (MOONEY; MIERNYK; RANDALL, 2002), permitindo rápidas adaptações celulares frente à condições de stress, à biodisponibilidade total de glicose, e às demandas energéticas da célula que são altamente variáveis entre os períodos de proliferação ou repouso e, dessa forma, uma regulação fina desse complexo se torna altamente necessária (STACPOOLE; MCCALL, 2023).

Alterações na dinâmica do complexo PDH em humanos têm sido associadas à diferentes patologias, como epilepsia, disfunções motoras, cognitivas e acidose láctica (BHANDARY; AGUAN, 2015). São descritos 03 sítios de fosforilação na subunidade E1-alfa do complexo PDH, em resíduos de serina (Ser). Esses sítios são associados às posições Ser-293 (sítio principal), Ser-300 e Ser-232, nessa ordem de preferência. A fosforilação de qualquer um desses sítios inativa a atuação da subunidade E1-alfa e por consequência, a atividade de todo o complexo. Em humanos ocorrem quatro PDKs, além de duas PDPs (fosfatases) (HURD *et al.*, 2012). A posição dos sítios de serina, bem como dos resíduos flanqueadores dessas regiões podem ser observados em detalhes a partir dos dados disponíveis na plataforma PhosphositePlus (**Figura 12**).

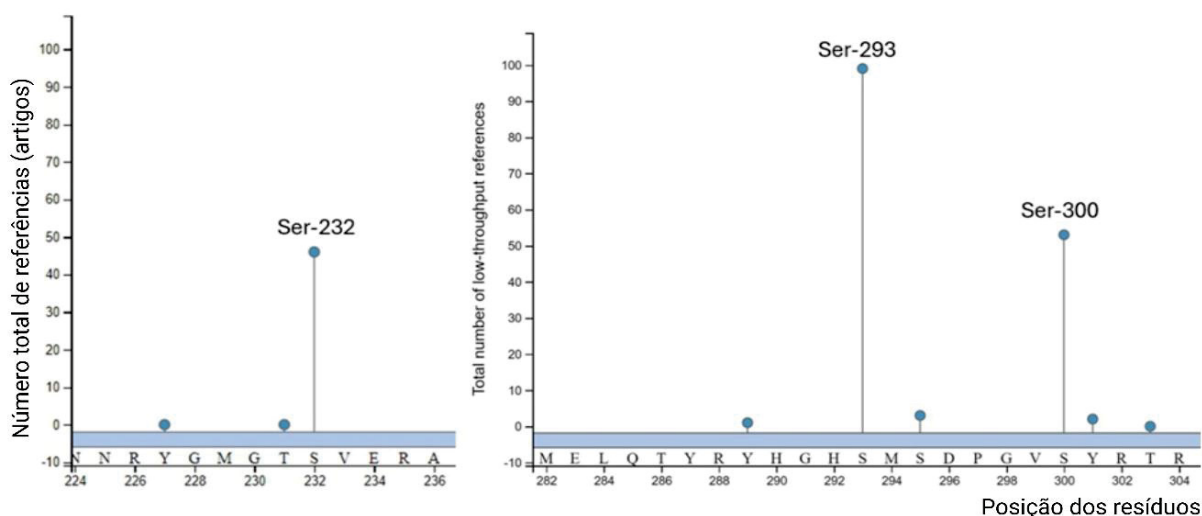


Figura 12. Sítios de fosforilação da subunidade E1-alfa do complexo PDH de humanos. O eixo horizontal representa a sequência de aminoácidos da proteína e o eixo vertical se associa ao número total de dados experimentais que se utilizam de metodologias confirmatórias além de espectrometria de massas. Adaptado de PhosphositePlus (2024) (<https://www.phosphosite.org/>).

Entretanto, além da presença de um sítio de serina principal (Ser-293), a interação entre PDK e PDH é altamente dependente dos resíduos flanqueadores desse resíduo, onde substituições tanto *upstream* quanto *downstream* podem levar a um menor nível de fosforilação. Além disso, mesmo alterações de aminoácidos “distantes” em relação à serina principal, bem como alterações dirigidas ao resíduo de prolina (P-297), impede completamente o reconhecimento da PDK em relação a peptídeos sintéticos relacionados a subunidade E1-alfa desse complexo (AHSAN *et al.*, 2012).

Quando analisamos a questão do metabolismo dos apicomplexas, contudo encontramos uma situação peculiar. Enquanto em algas e plantas coexistem 02 complexos PDHs situados em organelas diferentes (cloroplasto e mitocôndria) (Tovar-Méndez *et al.*, 2003), nos apicomplexas encontramos apenas um complexo PDH que está restrito ao apicoplasto e ausente na mitocôndria (OPPENHEIM *et al.*, 2014).

Essa situação metabólica deu origem a algumas especulações em relação à perda do complexo PDH mitocondrial, como a hipótese de sua translocação da mitocôndria para o apicoplasto (OPPENHEIM *et al.*, 2014), o que dependeria de um evento simultâneo de translocação de 04 proteínas (E1-alfa e E1-beta, E2 e E3), dado a arquitetura inerente a esse complexo. Entretanto, um estudo posterior, apesar de voltado a questões bioquímicas da via FAS II, trouxe alguns dados filogenéticos que sustentam que o complexo PDH do apicoplasto tem uma origem filogenética compartilhada com plastídios e, mais remotamente com as cianobactérias (LIANG *et al.*, 2020), o que contradiz a hipótese da translocação desse complexo entre organelas evolutivamente distintas.

Dado à ausência de um complexo PDH na mitocôndria, é postulado que o complexo BCKDH tenha assumido a função catalítica associada a um complexo PDH, passando então a metabolizar majoritariamente o piruvato como substrato principal, classificando-o como um complexo *PDH-like*. Apesar dessa classificação, é proposto que esse complexo ainda mantém uma atividade catalítica sobre os BCAAs, embora muito reduzida. Além disso, apesar de exercerem papéis bioquímicos similares, a subunidade E1-alfa de PDH, do apicoplasto, foi incapaz de substituir a função da subunidade homóloga de BCKDH em parasitas nocaute (OPPENHEIM *et al.*, 2014).

O complexo BCKDH dos demais organismos exerce um papel majoritário sobre aminoácidos, diferente do que é encontrado nos apicomplexas, além de ser postulado

a sua ocorrência como um complexo único nos parasitos, mas com dupla função catalítica (metabolizando piruvato e aminoácidos). Dessa forma, é válido que análises mais aprofundadas em relação à evolução desse complexo sejam realizadas, a fim de se esclarecer melhor essas questões bioquímicas encontradas em *Toxoplasma*, em busca de informações possivelmente ainda não exploradas pela literatura.

2.6.3 Metabolismo do complexo BCKDH

O complexo BCKDH tem por função “canônica” a conversão de substratos derivados de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs). Em uma primeira etapa os aminoácidos leucina, isoleucina e valina, são previamente desaminados pela enzima aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada, (BCAT, *Branched-chain amino acid aminotransferase*). Essa reação promove a formação de α -cetoisocaproico, α -ceto- β -metilvalerato, e α -cetoisovalerato, respectivamente, que podem então ser metabolizados pelo complexo BCKDH (DU *et al.*, 2022) (**Figura 13**).

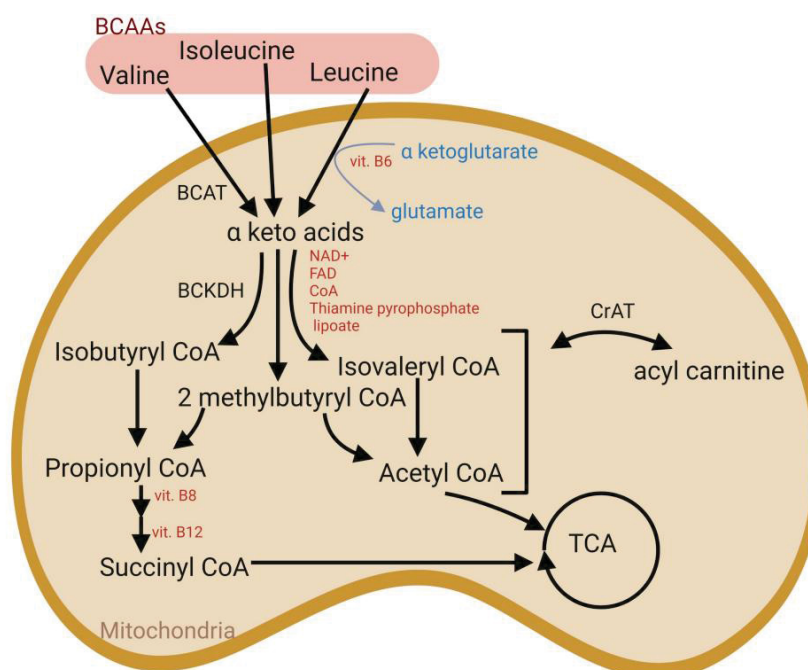


Figura 13. Metabolismo BCAAs mediado pela ação do complexo BCKDH. Os aminoácidos valina, isoleucina e leucina são metabolizados inicialmente pela enzima BCAT, gerando α -cetoácidos que podem ser metabolizados pelo complexo BCKDH. Após o processamento pelo complexo desidrogenase, os produtos dessa reação são encaminhados para o metabolismo do ciclo de Krebs, gerando de ATP. Adaptado de DE MEEÛS D'ARGENTEUIL *et al.*, 2021.

Os BCAAs desempenham papéis importantes no metabolismo celular, atuando em diferentes vias fisiológicas desde a síntese de proteínas, regulação de vias de sinalização, além de participação no metabolismo energético. Diferentes patologias humanas estão associadas a disfunções no complexo BCKDH, como resistência à insulina e diabetes (VANWEERT; SCHRAUWEN; PHIELIX, 2022).

Enquanto bactérias, fungos e plantas podem realizar a biossíntese desse grupo de aminoácidos, essa via é considerada essencial na maioria dos eucariotos, o que inclui os protistas, podendo constituir um alvo terapêutico em potencial para o desenvolvimento de novos fármacos contra parasitos de importância médica (SANTOS SOUZA *et al.*, 2023).

Diferente do que ocorre em relação ao complexo PDH, a subunidade E1-alfa de BCKDH de humanos apresenta somente 02 sítios de fosforilação (**Figura 14**), posicionados nos resíduos Ser-337 (sítio principal) e Ser-347 (PhosphositePlus, 2024). Dado a similaridade em nível de sequências com relação a subunidade E1-alfa de PDH, a Ser-337 também é denominada como Ser-293 na literatura (HAWES *et al.*, 2000).

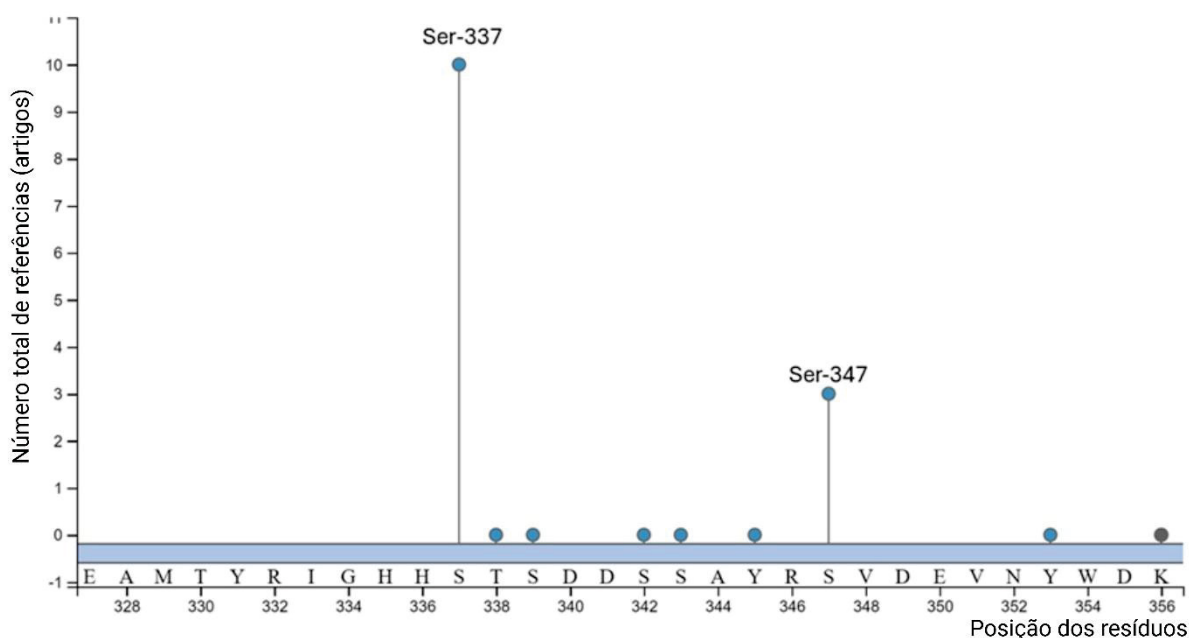


Figura 14. Dados do site PhosphoSitePlus, evidenciando os sítios de fosforilação da subunidade E1-alfa do complexo BCKDH de humanos. O eixo horizontal representa a sequência de aminoácidos da proteína e o eixo vertical se associa ao número total de dados experimentais que se utilizam de metodologias confirmatórias além de espectrometria de massas. Adaptado de PhosphoSitePlus (<https://www.phosphosite.org/>).

Nos apicomplexas, há algumas especificidades em relação ao metabolismo de aminoácidos e do complexo BCKDH. Em *Plasmodium*, o metabolismo de BCAAs está totalmente ausente, o que também inclui a ausência da enzima BCAT (SEEBER; LIMENITAKIS; SOLDATI-FAVRE, 2008).

Em contrapartida, em *T. gondii* encontramos uma situação peculiar, a presença da enzima BCAT, porém o complexo BCKDH está majoritariamente voltado para a conversão do piruvato (em uma reação catalítica favorável ao piruvato na ordem de até 10.000:1 em relação aos BCAAs) mantendo ainda uma atividade residual vinculada à sua função desidrogenase “canônica” (**Figura 15**). Dessa forma, esse complexo desidrogenase foi classificado como um complexo *PDH-like*, e pode ter evoluído para essa atividade dado a ausência de um complexo PDH mitocondrial (OPPENHEIM *et al.*, 2014), ou seja, constituindo pela literatura, como um complexo único com função dupla, diferente do que normalmente ocorre nos demais organismos.

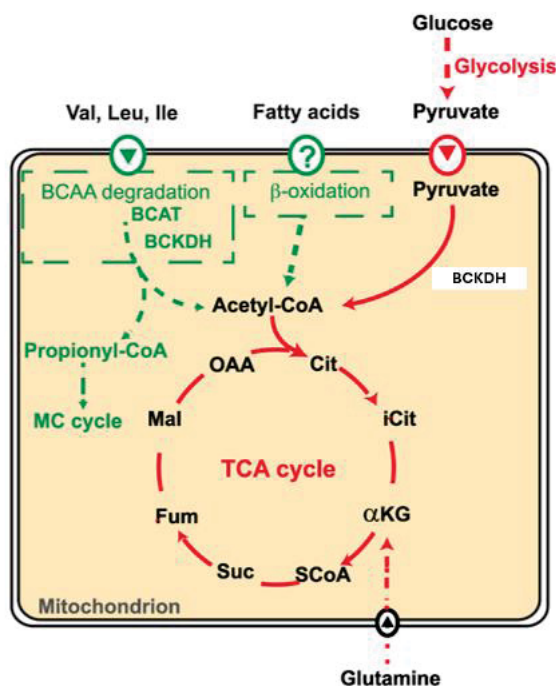


Figura 15. Rotas metabólicas de BCAAs e do piruvato em *T. gondii*. O complexo BCKDH tem como papel principal a conversão do piruvato, mas mantendo uma atividade residual no metabolismo de BCAAs. Adaptado de OPPENHEIM *et al.*, 2014.

2.6.4 Regulação dos complexos PDH e BCKDH através de quinases

Os complexos PDH e BCKDH de localização mitocondrial são normalmente regulados através de fosforilação mediada por atuação de proteínas quinases. Nesse sentido, buscas filogenéticas têm apontado a existência de duas potenciais quinases regulatórias, classificadas como TgPDK e TgBCKDK, de localização mitocondrial para *Toxoplasma*, e que potencialmente poderiam atuar na regulação do complexo BCKDH (FERRARINI *et al.*, 2021) (**Figura 16**).

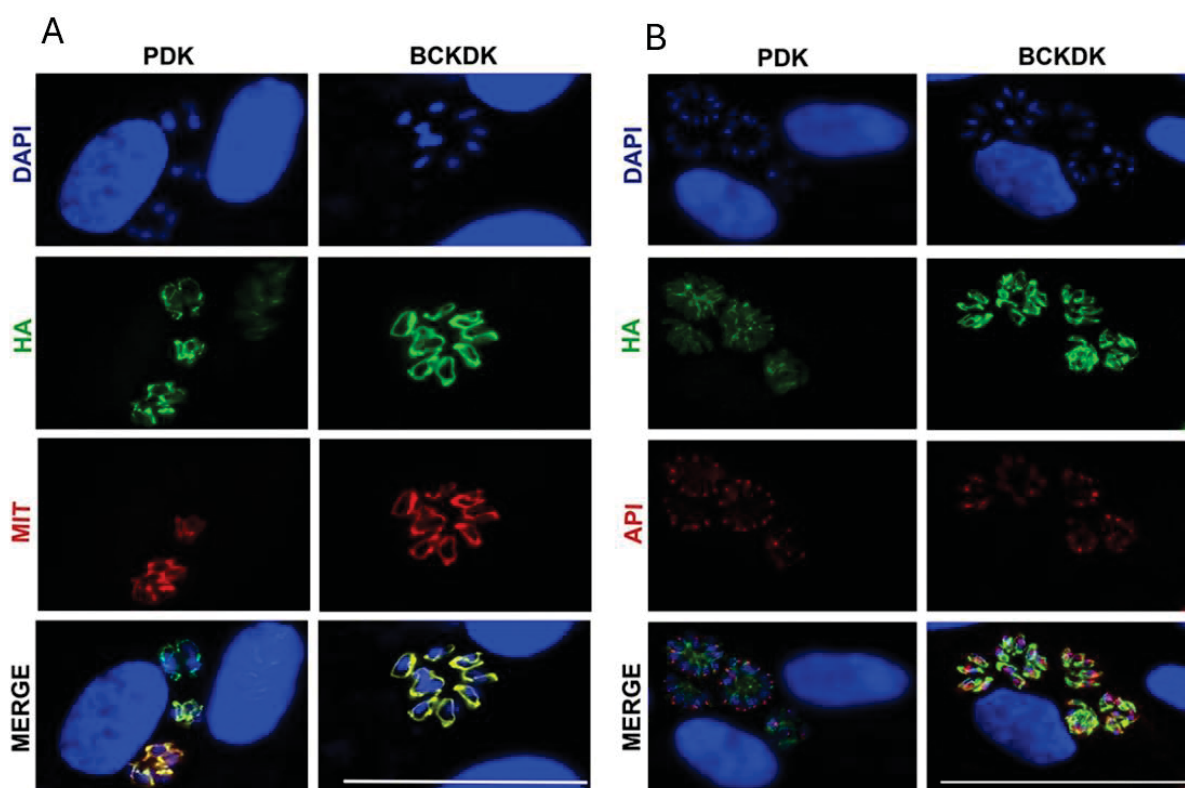


Figura 16. Localização celular das quinases PDK e BCKDK em *Toxoplasma gondii*. **A.** Co-localização das enzimas PDK e BCKDK (em verde, tag HA), em relação à proteína mitocondrial HSP60-RFP (em vermelho). **B.** Não ocorre sobreposição na localização celular dessas enzimas em relação quando a proteína CPN60 (presente no apicoplasto) está imunolocalizada. Adaptado de FERRARINI *et al.*, 2021.

Esse grupo de quinases é classificado no grupo das proteínas quinases atípicas (aPKs), cujas características intrínsecas as distinguem do grupo composto pelas proteínas quinases eucarióticas (ePKs), com maior participação no metabolismo celular na maioria dos organismos (**Figura 17**) (KANEV *et al.*, 2019).

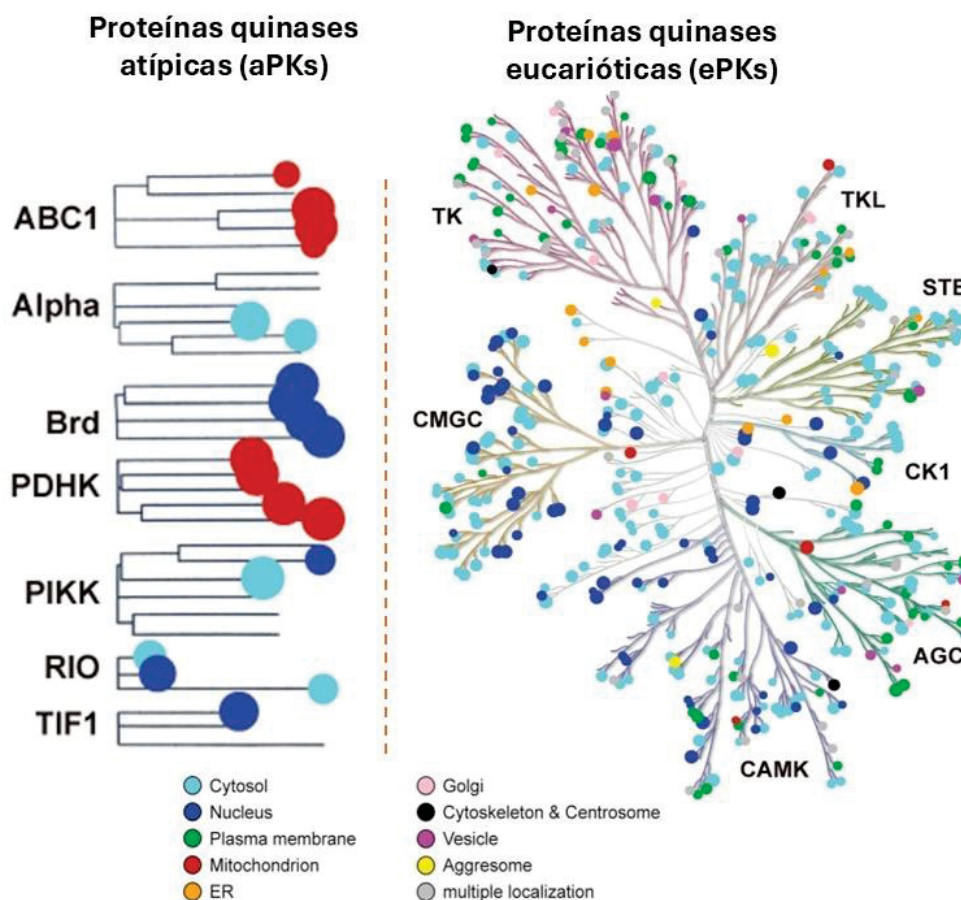


Figura 17. Classificação e localização celular das proteínas quinases atípicas e eucarióticas. Adaptado de Atlas do Quinoma, 2024.

As quinases são enzimas que catalisam as reações de fosforilação, promovendo a transferência de grupos fosfato originados a partir de moléculas de ATP para sítios específicos localizados em diferentes substratos que podem ser carboidratos, lipídios e proteínas (incluindo também outras proteínas quinases) (NAIK; SHAKYA, 2023).

As reações de fosforilação são reversíveis, e ocorrem em escalas de tempo muito reduzidas, e quando dirigidas a outras proteínas constituem uma das mais importantes modificações pós-traducionais (PTM, *post-translational modification*), onde a adição do grupo fosfato promove importantes alterações na conformação e na atividade bioquímica dessas macromoléculas (STRUMILLO *et al.*, 2019). Alterações nos padrões normais de fosforilação também são associadas à diferentes patologias nos organismos, como o desenvolvimento de câncer (COHEN; CROSS; JÄNNE, 2021).

Apesar da alta similaridade dos sítios de fosforilação dos complexos desidrogenases, as quinases PDK e BCKDK normalmente agem de forma específica sobre PDH ou BCKDH, o que impede a interação cruzada entre as quinases e os alvos (HAWES *et al.*, 1995). Além disso, é postulado na literatura que o reconhecimento entre a quinase PDK e a região-alvo de PDH é dependente de um sítio de prolina, localizado próximo ao sítio de serina, para que a reação de fosforilação ocorra (AHSAN *et al.*, 2012).

Estudos mais recentes, utilizando camundongos nocaute para as proteínas PDK, verificaram que BCKDK poderia assumir a função de regulação do complexo PDH, porém isso se restringia à fase embrionária, levando à diferentes anormalidades de desenvolvimento e letalidade poucos dias após o nascimento (HEINEMANN-YERUSHALMI *et al.*, 2021), o que indica que a presença de ambas as quinases são diretamente necessárias para o desenvolvimento dos organismos superiores.

As quinases da família PDK (tanto PDK quanto BCKDK) são enzimaticamente ativas na forma de dímeros, com cada monômero contendo 02 regiões catalíticas, domínio N-terminal (regulatório, também conhecido como domínio BCKDH Adom) e C-terminal (região ATPase). A dimerização além de aumentar a atividade catalítica das enzimas, permite uma maior interação com os seus respectivos alvos nos complexos desidrogenases (ANWAR *et al.*, 2021). O mecanismo de ação das PDKs é baseado na autofosforilação em sítios de histidina e posterior transferência do grupamento fosfato para o sítio de serina da região-alvo (THELEN; MIERNYK; RANDALL, 2000) (**Figura 18**).

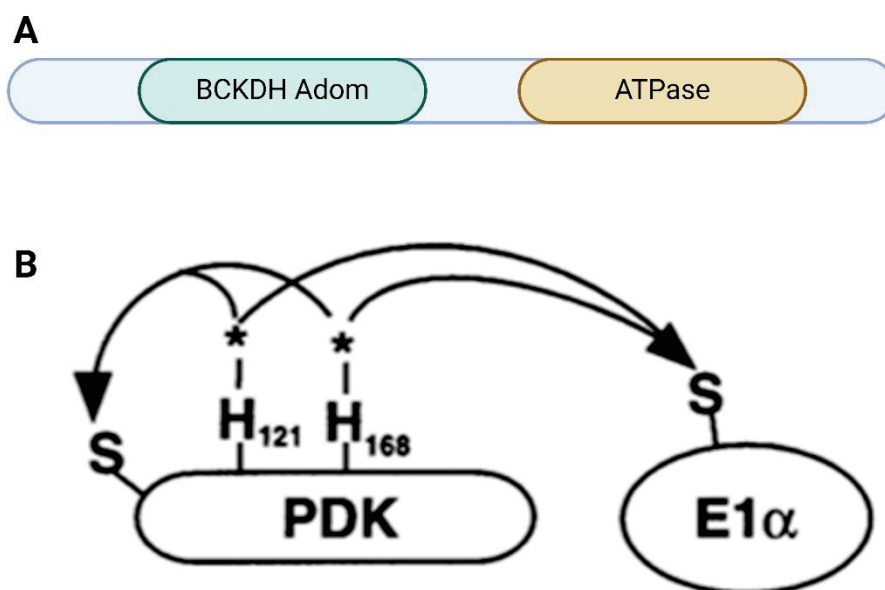


Figura 18. Estrutura de domínios e mecanismo de ação das quinases PDKs. **A.** As quinases PDK e BCKDK possuem organização de domínios características, envolvendo a presença de 02 domínios catalíticos. **B.** Os asteriscos (*) indicam os resíduos de histidina que são inicialmente autofosforilados na enzima, com a posterior fosforilação dos sítios de serina nas regiões-alvo da subunidade E1-alfa do complexo desidrogenase. Adaptado de ANWAR et al., 2021; THELEN; MIERNYK; RANDALL, 2000.

Estudos *in vitro*, com o uso do inibidor DCA, conhecido pela sua atuação inibitória sobre quinases do tipo PDK, levaram os parasitos de *T. gondii* a menor proliferação celular e alta citotoxicidade. Essa droga eleva a atividade mitocondrial nos parasitos, com aumento da produção de ATP, porém sem efeitos sobre o metabolismo de BCAAs (FERRARINI *et al.*, 2021).

Dessa forma, permanece a questão sobre qual a quinase regulatória que atua sobre o complexo BCKDH de *T. gondii*, bem como, qual o alvo molecular de DCA, e se essa droga está relacionada à alguma das quinases previamente reportadas.

Além disso, dado que o complexo BCKDH de *Toxoplasma* apresenta atividade catalítica majoritária voltada ao piruvato, mas mantendo atividade residual sobre BCAAs, o que é bastante incomum em relação aos outros organismos, pois normalmente apresentam complexos distintos para cada função. Dessa forma, é válido que buscas filogenéticas se voltem para verificar a possibilidade da existência de alguma subunidade E1-alfa de BCKDH no metabolismo desses parasitos, ainda

não reportada na literatura, cuja função possa estar relacionada ao seu metabolismo “canônico”, ou seja, voltada à degradação de aminoácidos. Um estudo mais aprofundado dessa questão pode auxiliar em um maior entendimento do metabolismo energético desses parasitos, assim como pode indicar a existência de vias alternativas de produção de energia nas fases latentes da doença, o que também pode indicar possíveis alvos terapêuticos contra a toxoplasmose.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar as proteínas quinases TgPDK e TgBCKDK como potenciais reguladoras das atividades do complexo BCKDH no metabolismo de *Toxoplasma gondii* e como alvo biológico do fármaco DCA.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar análises filogenéticas em relação a subunidade E1-alfa do complexo BCKDH, juntamente com modelagens *in silico*, buscando por regiões conservadas e possíveis candidatos a parálogos presentes em *Toxoplasma gondii*, assim como possíveis ortólogos presentes em outros apicomplexas;
- Utilizar abordagens de filogenia para as quinases TgPDK e TgBCKDK, a fim de buscar possíveis pontos de divergência evolutiva, que também poderiam se associar à sua função regulatória junto ao complexo BCKDH de *T. gondii*;
- Identificar qual das quinases (TgPDK e/ou TgBCKDK) seria o alvo de DCA no metabolismo de *T. gondii*, a partir de testes bioquímicos *in vitro* utilizando-se proteínas recombinantes e peptídeos-alvo sintéticos, além de métodos *in silico* para avaliar possíveis sítios de interação de DCA nessas enzimas.
- Identificar proteínas que interagem com as quinases TgPDK e TgBCKDK a partir de ensaios de imunoprecipitação e espectrometria de massas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Análises de filogenia para a subunidade E1-alfa dos complexos BCKDH e PDH e das quinases BCKDK e PDK

Toxoplasma gondii pertence ao supergrupo SAR, que contém organismos filogeneticamente relacionados apesar de altamente diversos, incluindo dinoflagelados, ciliados, radiolários, algas e apicomplexas, os quais são agrupados nos clados Stramenopiles, Alveolata e Rhizaria (TIKHONENKOV *et al.*, 2022).

Dessa forma, para se compreender melhor a história evolutiva da subunidade E1-alfa dos complexos BCKDH e PDH, e das quinases BCKDK e PDK de *Toxoplasma gondii*, em relação a outros organismos filogeneticamente relacionados, foram utilizadas como referência as sequências de aminoácidos dessas proteínas e que estão identificadas como TGME49_239490, TGME49_245670, TGME49_318560 e TGME49_219682, respectivamente, conforme dados da literatura (FERRARINI *et al.*, 2021; OPPENHEIM *et al.*, 2014) e do banco de dados do ToxoDB (<https://toxodb.org/>).

Para aumentar a confiabilidade das análises também utilizamos como referência as sequências de aminoácidos da subunidade E1-alfa do complexo PDH e BCKDH de humanos, depositadas no banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e com IDs: NP_000275.1 e NP_000700.1, respectivamente.

Em contraste ao que se observa nos apicomplexas, cujo complexo PDH está restrito ao apicoplasto (FOTH *et al.*, 2005), nas espécies vegetais os complexos PDH ocorrem tanto no cloroplasto quanto na mitocôndria (TOVAR-MÉNDEZ; MIERNYK; RANDALL, 2003). Dessa forma, também utilizamos como referência os dados depositados para a espécie *Arabidopsis thaliana* referentes às subunidades E1-alfa do complexo PDH do cloroplasto (NP_171617.1), PDH mitocondrial (NP_176198.1 e NP_173828.1) e complexo BCKDH (NP_173562.1 e NP_568209.1), reportados na base de dados NCBI.

As sequências de referência, reportadas acima, foram utilizadas como dado de entrada na plataforma *online* Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), com o uso da ferramenta *protein-protein blast*, mantendo-se os parâmetros em *default* (padrão), com número de sequências máximo em 100, e erro padrão de 0,05, em relação à

própria cepa de referência de *T. gondii* (ME49), e demais representantes dos grupos Alveolata (Apicomplexa, Ciliophora, Dinoflagellata e Perkinsozoa), Stramenopiles (Bigyra, Bacillariophyta, Ochrophyta e Oomycota) e Rhizaria (Endomyxa, Retaria e Cercozoa), efetuando-se buscas individuais dentro de cada grupo e espécie. Foram consideradas válidas as sequências que apresentaram com E-value $\leq 1E-05$.

Dado que é postulado na literatura que o apicoplasto teve origem a partir da uma endossimbiose secundária de uma alga vermelha (STRIEPEN, 2011), estendemos as buscas na plataforma Blast incluindo também os representantes do clado Archaeplastida (Chlorophyta e Rhodophyta). Além disso, mitocôndrias e cloroplastos são derivados de procariotos ancestrais ligados às alfa-proteobactérias e cianobactérias, respectivamente, (MCFADDEN, 2014; ROGER; MUÑOZ-GÓMEZ; KAMIKAWA, 2017) dessa forma, também incluímos nas análises filogenéticas representantes do clado Eubacteria (Alphaproteobacteria, Cyanophyceae, Flavobacteriia e Actinomycetes).

A partir disso, procedemos verificação de cada sequência obtida com o uso da Plataforma Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), e foram avaliadas quanto à presença de no mínimo um domínio característico dos complexos BCKDH e PDH (E1 desidrogenase) e das quinases BCKDK e PDK (domínios BCKDH_Adom e HATPase). Sequências truncadas, parciais, com E-value $>1E-05$ ou sem a identificação de no mínimo um domínio conservado, foram descartadas.

Além da plataforma Blast, outros bancos de dados também foram consultados para o levantamento de sequências referentes aos complexos PDH e BCKDH, como os bancos de dados Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), PlasmoDB (<https://plasmodb.org>) e OrthoDB (<https://www.orthodb.org/>). A plataforma OrthoDB também foi utilizada para inferir possíveis divergências evolutivas das proteínas de interesse em *Toxoplasma gondii*, com o uso do código Uniprot de cada proteína de interesse como dado de entrada e utilizando-se os parâmetros sugeridos pela plataforma (*default*).

O alinhamento das sequências obtidas (216 sequências para BCKDH e PDH, e 102 sequências para BCKDK e PDK) foi realizado através da ferramenta *online* MAFFT (KATO; ROZEWICKI; YAMADA, 2018), e ferramenta *Align* do banco de dados Uniprot (<https://www.uniprot.org/align>). Regiões mal alinhadas foram removidas

automaticamente com o uso da ferramenta TrimAl, utilizando-se os parâmetros sugeridos pela plataforma (*default*) (CAPELLA-GUTIÉRREZ; SILLA-MARTÍNEZ; GABALDÓN, 2009).

Para a determinação da árvore filogenética, foi utilizado a ferramenta *online* W-IQ-Tree (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at>), (TRIFINOPOULOS et al., 2016; <http://iqtree.cibiv.univie.ac.at>), e foi construída a partir de 1000 pseudoreplicatas de *bootstrap* e analisada através do método de máxima verossimilhança, com enraizamento pelo ponto médio, utilizando os parâmetros padrão (*default*) da plataforma, e editada usando os programas FigTree v1.4.4 (disponível em <https://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>) e Adobe Illustrator.

4.2 Modelagem tridimensional e análise do padrão de expressão de proteínas relacionadas à estruturação e regulação do complexo BCKDH de *Toxoplasma gondii*

Para a modelagem tridimensional das quinases TgPDK (TGME49_219682) e TgBCKDK (TGME49_318560), e da subunidade E1-alfa (TGME49_239490) e possível E1-alfa-02 (TGME49_292100) do complexo BCKDH de *Toxoplasma gondii*, foram utilizadas as ferramentas *online* Rosetta-Fold (<https://rosetta.bakerlab.org/>), Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) e AlphaFold Colab (<https://colab.research.google.com/github/deepmind/AlphaFold/blob/main/notebooks/AlphaFold.ipynb>), com o uso da sequência de aminoácidos referentes à cada proteína como dado de entrada, conforme reportado na plataforma ToxoDB (<https://toxodb.org/>). Os arquivos obtidos com o uso de cada plataforma foram visualizados com o uso dos softwares Chimera (versão 1.17.3) e ChimeraX (versão 1.8).

Os dados relacionados aos padrões de expressão (RNA-Seq) para as proteínas de interesse (subunidades E1-alfa-01, E1-alfa-02 e E1-beta, componentes E2 e E3, quinases TgPDK e TgBCKDK, e enzima BCAT), e que estão anotadas com os seguintes códigos: TGME49_239490, TGME49_292100, TGME49_314400, TGME49_319920, TGME49_206470, TGME49_219682, TGME49_318560, respectivamente, também foram adquiridos através da plataforma ToxoDB (<https://toxodb.org/>).

4.3 Síntese de plasmídeos pet28a(+) contendo os genes TgPDK e TgBCKDK

Plasmídeos foram sintetizados pela empresa Biomatik, tomando como base a sequência completa das enzimas TgPDK (TGME49_219682) e TgBCKDK (TGME49_318560) que constam no banco de dados ToxoDB (<https://toxodb.org/>).

Os genes foram sintetizados, incluindo os sítios de clonagem para *NdeI* e *BamHI* e inseridos em vetor pet28a(+). Esse vetor contém gene de resistência para o antibiótico canamicina e códons para a expressão de uma etiqueta de seis histidinas (6x-His) na porção N-terminal da proteína de interesse (**Figura 19**). Os códons de ambas as construções foram otimizados para a expressão recombinante em *Escherichia coli*. Os plasmídeos liofilizados (4 µg) foram diluídos em 40 µL de tampão TE (solução de Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0), obtendo-se solução com concentração final de 100 ng/µL.

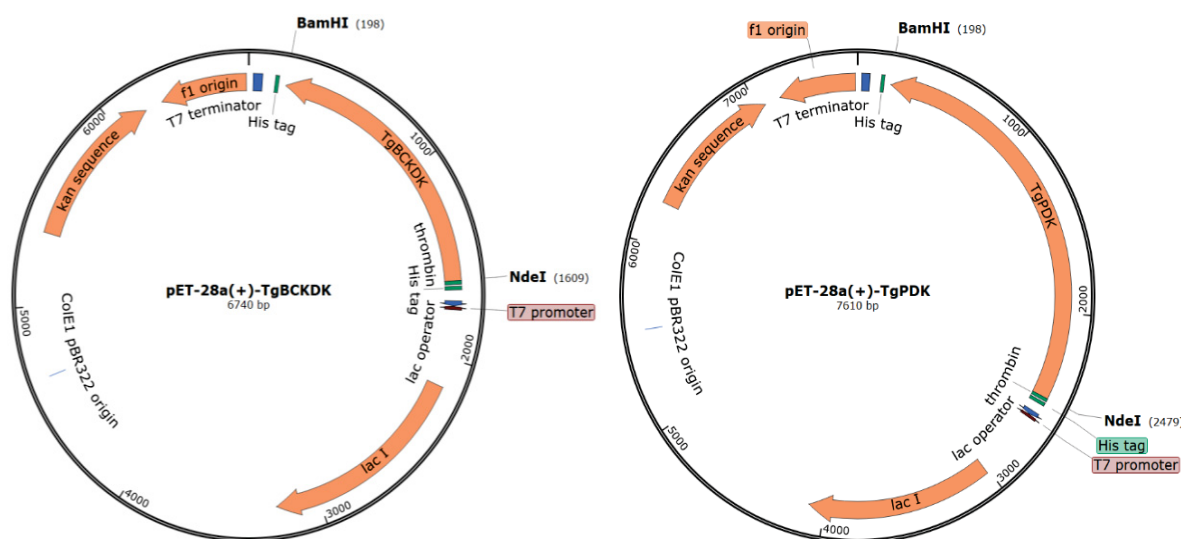


Figura 19. Vetores pet28a(+), contendo as sequências para a expressão recombinante de TgBCKDK e TgPDK.

4.4 Transformação em bactéria competente

Para o processo de transformação bacteriana seguiu-se o procedimento de choque térmico conforme descrito por Sambrook & Russel (2001). Tubos contendo 100 µL de bactérias competentes foram incubados com 0,5 µL da solução de plasmídeos (100 ng/µL) e mantidos em gelo por 30 minutos. Após, as bactérias foram submetidas a choque térmico (42°C por 90 segundos), retornando-se as amostras ao gelo por 5 minutos. Em capela de fluxo laminar, 1 mL de meio LB (triptona 1%, NaCl

0,5% e extrato de levedura 1%) foi adicionado a cada amostra bacteriana, mantendo-se as culturas a 37°C sob agitação constante (200 rpm), por 1 hora. Após o período de recuperação, 100 µL de bactérias foram semeadas em placas contendo meio LB suplementado com 100 µg/mL de canamicina, para a seleção dos clones contendo os plasmídeos pet28a(+) para TgPDK ou TgBCKDK (conforme item 4.3). As placas foram mantidas em estufa a 37 °C, por 16 horas. Foram utilizadas diferentes cepas de *E. coli* (DE3) pertencentes às linhagens Nico21, BL21-Star e Δ-SlyD.

4.5 Expressão das proteínas TgPDK e TgBCKDK (proteínas na sequência completa)

Para os testes de expressão em pequena escala, foi preparado pré-inóculo a partir de uma colônia *E. coli* de cada linhagem bacteriana em 5 mL de meio LB suplementado com 5 µL do antibiótico canamicina (25 mg/mL). As culturas foram mantidas em agitação constante (200 rpm), a 37°C, por 16 horas. Após, foram coletados 150 µL de cada cultura bacteriana e adicionados em 5 mL de meio LB, mantendo-se o antibiótico de seleção na mesma concentração inicial. As culturas foram crescidas a 37 °C, em agitação constante (200 rpm) até atingirem densidade óptica (DO) de 0,4, aferida a 600 nm em equipamento NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Ao atingirem a DO 0,4, as culturas foram transferidas para diferentes temperaturas de expressão. A DO das culturas foi aferida continuamente a cada 30 minutos. Ao atingirem DO entre 0,6 e 0,8, as culturas foram induzidas com adição de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG), na concentração final de 1 mM. Culturas não induzidas, sem IPTG, foram utilizadas como controle negativo.

Após a etapa de expressão, as culturas foram centrifugadas a 3000 x *g*, por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante (meio de cultura) foi descartado, e o precipitado (células bacterianas) foi diluído em 1 mL de tampão de lise (0,3 M NaCl, 50 mM Tris HCl pH 8,0) e então transferido para tubos de 2 mL. Para o rompimento das células bacterianas, os tubos foram colocados em equipamento de sonicação (QSonica), mantendo-se as amostras em gelo, e com o uso de 02 pulsos de 15 segundos (amplitude de 10%), com intervalo de 30 segundos entre cada pulso. A partir do lisado, foram coletados 45 µL de amostra para um tubo contendo 15 µL de tampão de amostra

(TA) 4X (40 mM de Tris-HCl pH 6,8, 1% de SDS 10%, 2,5% de β -mercaptoetanol (14,7 M), 6% de glicerol e 0,005% de azul de bromofenol), essas amostras constituíram a fração extrato total. Os lisados foram então centrifugados a 14.000 x g, por 15 minutos, a 4 °C. Foram coletados 45 μ L de cada amostra e diluídos em 15 μ L de tampão de amostra 4X, denominando-se essas amostras de fração solúvel. Amostras dos precipitados, resultantes do processo de centrifugação, também foram recolhidos para análise em gel de eletroforese, caracterizando as frações insolúveis.

Em relação à proteína TgPDK, em sua sequência completa, mesmo realizando-se diferentes condições de expressão, em diferentes cepas bacterianas, a expressão não foi possível. Em relação à proteína TgBCKDK (em sua construção completa), a melhor condição verificada foi com o uso de *E. coli* Nico 21 (DE3), na temperatura de 20 °C, por 16 horas.

Para o escalonamento da expressão de TgBCKDK foram utilizados 02 litros de meio LB, contendo 2 mL de canamicina (25 mg/mL), juntamente com 3 mL de cultivo bacteriano (pré-inóculo). Foram utilizados frascos do tipo *erlenmeyer* com capacidade total de 1 litro e volume utilizado de 250 mL (para manter a aeração adequada).

4.6 Eletroforese de proteínas

Para as etapas de eletroforese, amostras de cada fração (15 μ L), foram submetidas à corrida em gel desnaturante composto por SDS-PAGE (10%) para a separação de proteínas. Como tampão de corrida foi utilizado solução de 25 mM Tris-base, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS, pH 8.4. Os géis então foram submetidos a 100 V, por 90 minutos. Como marcadores foram utilizados 2 μ L do marcador pré-colorado Page Ruler Protein Ladder (Thermo).

4.7 Coloração por Azul de Comassie

Após a eletroforese, os géis foram corados com solução de Comassie (0,1% de azul de comassie R-250, 45% de Metanol, 45% de água ultrapura 18,2 M Ω .cm e 10% de ácido acético), por 5 minutos. Para a descoloração, os géis foram imersos em água ultrapurificada mantendo-se agitação constante em aparelho orbital, até a remoção do excesso de corante.

4.8 Coloração por prata

Para a coloração de prata, os géis foram submersos em solução de fixação (50% de etanol, 12% ácido acético e 0,1% de formaldeído) por 30 minutos. Após, procedemos 03 lavagens com solução de etanol 50%, sob agitação em orbital. Após o descarte da solução de etanol 50%, da última lavagem, foi adicionado 50 mL de solução de permeabilização (contendo 10 mg de tiosulfato de sódio) por 01 minuto em cada gel. Os géis foram então submetidos a 03 lavagens com água destilada. Após, 50 mL de solução de prata (contendo 100 mg de nitrato de prata e 0,05% de formaldeído) foi adicionado por 01 hora. Os géis foram então lavados com água destilada e revelados com 50 mL solução de revelação (contendo 1,5 g de carbonato de sódio, 0,05% de formaldeído e 1 mL de solução de permeabilização). Após a revelação, utilizamos solução de fixação sem formaldeído para o bloqueio da reação.

4.9 Transferência e *Western Blot*

Após a corrida de eletroforese (conforme item 4.6), os géis foram utilizados na etapa de transferência em equipamento Trans-Blot SD Semi-Dry (Biorad), utilizando-se membrana de nitrocelulose (Optitran BA-S 85 Nitrocellulose Membrane 0,45 µm, GE Healthcare), e voltagem de 20 V, por 1 hora. Para a etapa de bloqueio, a membrana foi incubada com solução de leite em pó desnatado a 5%, diluído em PBS-Tween (PBS 1X contendo 0,05% de Tween-20), por 01 hora, à temperatura ambiente, e sob agitação constante em equipamento orbital. Decorrido esse tempo, a membrana de nitrocelulose foi lavada 03 vezes com PBS-Tween, mantendo-se agitação por 5 minutos em cada lavagem. As membranas foram incubadas com solução de anticorpo primário monoclonal anti-HIS (GE HealthCare 27071401) na diluição de 1:2000 em PBS-Tween, por 1 hora em agitação constante. Após, realizamos novas lavagens com PBS-Tween, por 3 vezes, com 05 minutos de agitação em cada lavagem. As membranas foram então incubadas, por 01 hora, em agitação constante e protegidas da luz, com anticorpo secundário monoclonal anti-IgG de mouse conjugado com fluoróforo IRDye 680 RD Donkey. Após, procedeu-se lavagem das membranas com PBS 1X e análise em equipamento Odyssey Image Systems a 700 nm e 800 nm.

4.10 Purificação por cromatografia de afinidade em cromatógrafo modelo Äkta

Os precipitados bacterianos referentes à expressão de TgBCKDK, (como mencionado no item 4.5), foram ressuspensos em 40 mL de tampão A (solução de 20 mM de fosfato de sódio monobásico, 300 mM de cloreto de sódio e 20 mM imidazol, em pH final 7,5), contendo inibidor de protease (COMPLETE Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablet, Roche), seguido por lise em equipamento microfluidificador por 06 vezes, em gelo. Após a lise, as amostras foram centrifugadas a 20.000 x *g*, por 15 minutos, 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para a purificação em cromatógrafo ÄTKA Pure 25 M (Cytiva), em coluna HisTRAP HP 5 mL (*Histidine-tagged Protein Purification*, GE Healthcare), que contém íons Ni²⁺ imobilizados. Para o gradiente de imidazol foi utilizado tampão B (solução de 20 mM de fosfato de sódio monobásico, 300 mM de cloreto de sódio e 500 mM Imidazol, em pH final 7,5). As frações foram coletadas em tubos de 1,5 mL, e mantidas em gelo. De cada fração foi separada uma alíquota de 45 µL e diluída em 15 µL de tampão TA 4X, procedendo-se aquecimento por 95°C, por 03 minutos. As amostras foram então utilizadas em eletroforese de proteínas e coloração por Azul de Comassie (conforme itens 4.6 e 4.7)

4.11 Cromatografia de exclusão por tamanho e troca iônica

Para otimizar a purificação obtida inicialmente pela cromatografia de afinidade em cromatógrafo Äkta (conforme item 4.10), uma amostra de 500 µL da fração B27 (uma das amostras de pico, obtida na purificação por afinidade) foi submetida a cromatografia de exclusão por tamanho, utilizando coluna Superdex Increase 75 10/300 GL, previamente equilibrada com tampão contendo 20 mM de fosfato de sódio e 150 mM de NaCl, em pH 7,5, e cromatógrafo ÄTKA Pure 25 M (Cytiva). O progresso da cromatografia foi monitorado pela medida da absorbância em comprimento de onda de 280 nm. As frações foram coletadas em tubos de 1,5 mL, e mantidas em gelo. De cada fração foi separada uma alíquota de 45 µL e diluídas em 15 µL de tampão TA 4X, procedendo-se aquecimento por 95 °C, por 03 minutos. As amostras foram então utilizadas em eletroforese de proteínas e coloração por Azul de Comassie (conforme itens 4.6 e 4.7)

Cromatografia de troca iônica também foi realizada para fins de se obter frações com uma menor quantidade de contaminantes ou degradações. As frações

denominadas B32 a B40, também correspondentes ao pico da corrida e obtidas a partir da purificação por cromatografia de afinidade por cromatógrafo Äkta, foram reunidas e diluídas em um volume total de 24 mL de tampão A (composto por 20 mM de fosfato de sódio monobásico e 50 mM de NaCl, em pH 7,5). Utilizamos a coluna Hitrap Q (GE Healthcare Life Sciences), em cromatógrafo ÄTKA Pure 25 M (Cytiva). A eluição das proteínas de interesse foi realizada através da aplicação de um gradiente de cloreto de sódio, obtido pela mistura contínua de tampão A e tampão B (composto por 20 mM de fosfato de sódio monobásico e 1 M de NaCl, em pH 7,5) de 5% a 100% (V/V). As frações foram coletadas em tubos de 1,5 mL, em gelo. De cada fração foi separada uma alíquota de 45 µL e diluída 15 µL em tampão TA 4X, procedendo-se aquecimento por 95°C, por 03 minutos. As amostras foram então utilizadas em eletroforese de proteínas e coloração por Azul de Comassie (conforme itens 4.6 e 4.7).

4.12 Diálise de proteínas através de membrana semipermeável

Dado que as frações obtidas a partir de cromatografia por afinidade contém altas concentrações imidazol, o que pode interferir em testes enzimáticos, procedemos ensaios de diálise. As frações B27, B28 e B29 (presentes no pico da purificação de afinidade, conforme item 4.10) foram coletadas (1 mL de cada) e utilizadas nesse teste. As amostras foram então acondicionadas em membrana de diálise SnakeSkin Dialysis Tubing (Thermo Scientific) (10.000 MWCO), e submersas em 3 litros de tampão de diálise (solução de 20 mM de fosfato de sódio monobásico e 50 mM NaCl, em pH 7,5), em câmara fria e sob agitação.

4.13 Abordagens *in silico* para predição da estrutura das proteínas TgBCKDK e TgPDK e para *docking* molecular

A busca das regiões funcionais e conservadas de TgBCKDK e TgPDK foi realizada através da plataforma *online Interpro* (<https://www.ebi.ac.uk/Interpro/>). As informações obtidas serviram como subsídio para as novas construções que foram realizadas em sequência, voltadas à expressão de proteínas truncadas, contendo somente as regiões de domínios. Os experimentos computacionais de *docking*

molecular foram realizados no software UCSF Chimera versão 1.17.3 (PETTERSEN et al., 2004) com o plug-in AutoDock Vina versão 1.1.2 (TROTT; OLSON, 2010). As imagens foram geradas no ChimeraX versão 1.8 (MENG et al., 2023). Também utilizamos o servidor online Phyre2 para a geração de modelos tridimensionais das quinases (KELLEY et al., 2015). Os ligantes e substratos (piruvato e DCA) foram modelados e conformados nas formas de energia minimizada usando o pacote ChemOffice 21.0.0.28.

4.14 Amplificação das regiões de domínios de TgBCKDK e TgPDK, para clonagem em sistema Gateway (Invitrogen)

A partir dos dados obtidos pelas modelagens *in silico*, procedemos a clonagem por PCR das regiões mais estruturadas e conservadas de ambas as proteínas quinases, com oligonucleotídeos para o sistema Gateway, contendo as regiões apropriadas de recombinação (**Tabela 1**). Dessa forma, optamos pela clonagem da região compreendida entre os códons (451 – 2226), relacionada aos aminoácidos 150-742 para TgPDK e da região compreendida entre os códons (215–1380), relacionada aos aminoácidos 72-460 para TgBCKDK, utilizando como molde os plasmídeos sintetizados pela empresa Biomatik (item 4.3).

Oligonucleotídeo	Sequência
Forward_ TgBCKDK_GW	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGCTTCATGCATACCCCGTTAAGCGTTCC -3'
Reverse_ TgBCKDK_GW	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG TCTTACAGTTCCGGACGTTCTTCAT -3'
Forward_ TgPDK_GW	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGCTTCATGCTGAGCAAAGAACGCCATGATC -3'
Reverse_ TgPDK_GW	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCTTAGCCACGAATCATCTGGGTCAC -3'

Tabela 1. Oligonucleotídeos para clonagem das regiões alvo de TgBCKDK e TgPDK. Sequências em negrito correspondem às sequências attB necessárias para recombinação com vetor pDONR221 da plataforma Gateway (Invitrogen). Sequências em vermelho correspondem códons de parada.

Para a amplificação das regiões-alvo foi utilizada a enzima Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (11304011, Invitrogen), em reação de volume final com 50 µL, contendo High Fidelity PCR Buffer 1X, 2,0 mM de MgSO₄, 0,2 mM de dNTP, 0,2 pmol dos *primers forward* e *reverse*, apropriados para cada

construção, 1 ng de plasmídeo (TgBCKDK ou TgPDK) e 1 U da enzima Taq DNA Polymerase, juntamente com água ultrapura 18,2 MΩ.cm. Em termociclador foram utilizadas as seguintes condições, para verificação da melhor condição de amplificação: desnaturação inicial a 95 °C, por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 30 segundos e extensão a 68 °C (90 segundos para TgBCKDK e 2 minutos para TgPDK), e temperatura final de 4 °C. Os produtos de PCR, foram diluídos em ficol e aplicados em gel de agarose 1%, em tampão TBE (Trisbase 89 mM, Ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM pH 8.0) e corrente de 100 V, por 01 hora. Após, os géis foram corados em solução de brometo de etídio 0,5 µg/ml e visualizado em transluminador acoplado com luz UV.

4.15 Recombinação Gateway

A base da recombinação Gateway se dá através do sistema de recombinação do fago lambda (Ptashne, 1992) que permite a transferência de sequências heterólogas de DNA entre vetores de uma forma facilitada (Hartley *et al.*, 2000). Na primeira etapa das reações, catalisada pela enzima BP Clonase (Invitrogen), ocorre a recombinação entre os sítios attB1/attB2, inseridos por PCR junto aos sítios alvo de clonagem, e os sítios attP1/attP2, presentes no vetor de entrada (pDNOR221), gerando um clone de entrada. Na segunda etapa do processo, catalisada pela enzima LR Clonase, ocorre a recombinação entre os sítios attL1/attL2 do clone de entrada, e os sítios attR1/attR2, presente no vetor de destino, que no caso foi o vetor pDEST17. Para a primeira etapa, realizamos a purificação dos produtos de PCR (obtidos no item 4.14), 150 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) e 100 µL de solução contendo 30% de PEG 8000 e 30 mM MgCl₂. Foi procedido vórtex e centrifugação por 10.000 x g por 15 minutos. Após centrifugação, sobrenadante foi descartado e o precipitado (contendo os *amplicons* purificados) foi diluído 50 µL de tampão TE, e a solução final foi quantificada em NanoDROPS. Para a recombinação foram utilizados 50 fmol dos produtos de PCR e do vetor de entrada pDNOR221, em reação de volume final de 8 µL, juntamente com tampão TE e enzima BP Clonase II. Realizou-se incubação a 25 °C por 1 hora. E então, foi utilizado 1 µL da enzima Proteinase K, e incubação por 10 minutos a 37 °C. No final do processo foi realizado transformação

de bactérias *E. coli*, Top10, cálcio competentes, através de metodologia de choque térmico, conforme protocolo do item 4.4, e seleção em placa LB contendo canamicina. Os clones foram confirmados por PCR, sendo realizado pré-inóculo a partir de uma colônia em 5 mL de meio LB contendo canamicina (37 °C, 200 rpm, 16 horas), e purificação dos plasmídeos através de MiniPrep com uso de kit da Qiagen (Plasmid Plus Midi Kit). Na segunda etapa, foi realizada recombinação entre os plasmídeos pDNOR221 (vetor de entrada) e vetor pDEST17 (vetor de destino) usando enzima LR Clonase II e Proteinase K, nas mesmas condições descritas na primeira etapa da recombinação (**Figura 20**). Os plasmídeos obtidos foram utilizados para a transformação de *E. coli* Top10, cálcio competente, e foi realizada seleção em placas LB contendo ampicilina (25 µg/mL). Com a confirmação dos clones por PCR, foi realizado pré-inóculo e purificação dos plasmídeos por miniprep, para a transformação das bactérias de expressão por choque térmico (conforme item 4.4).

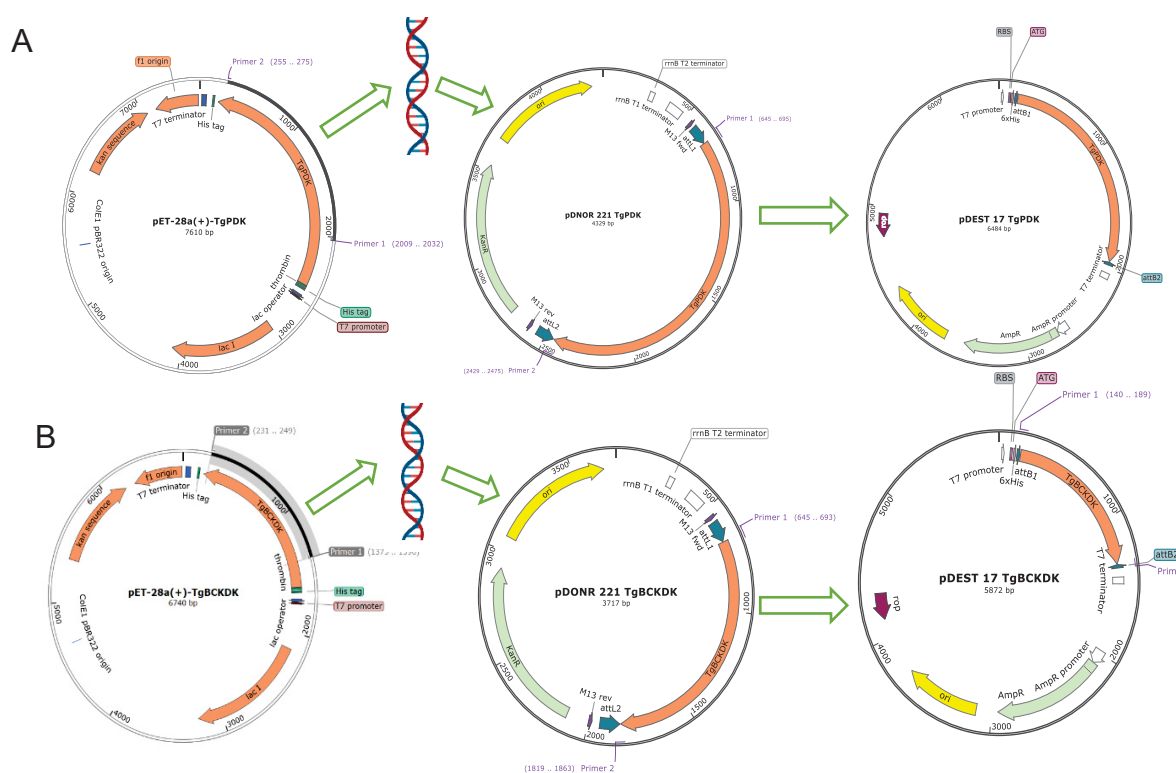


Figura 20. Esquemas de recombinação Gateway utilizados no projeto. A e B, amplificação das regiões-alvo por PCR (TgPDK e TgBCKDK, respectivamente), a partir dos vetores-molde, e então recombinação em vetores pDONR221 e pDEST17.

4.16 Expressão recombinante da região de domínios das proteínas TgPDK e TgBCKDK

Para a expressão das sequências parciais, sem as regiões desestruturadas, obtidas através de clonagem em vetores do sistema Gateway, foi utilizada a cepa *E. coli* plysS (DE3), cálcio competente, e metodologia de choque térmico (item 4.4), juntamente com 50 ng de plasmídeos previamente purificados. Após a seleção dos clones em placa LB contendo ampicilina (25 mg/mL), os clones foram confirmados por PCR e procedeu-se os testes de expressão, utilizando-se 20 mL de meio LB (com 100 µg/ml de ampicilina).

Além da indução tradicional utilizando-se IPTG (1 mM), realizamos testes com condições de glicose (como agente repressor) e lactose (como agente indutor), em diferentes condições, para verificar se o nível de expressão das proteínas de interesse poderia ser aumentado, bem como a expressão basal diminuída, como reportado nos estudos de Studier (2005). Foram preparadas culturas contendo 20 mL de meio LB (com 100 µg/mL de ampicilina), 1% de pré-inóculo, nas condições controle (não-induzido), indução por IPTG (1 mM), diferentes condições de repressão (glicose 0,1, 0,3, 0,5 e 1%), e meio autoinduzido contendo como agente repressor glicose 0,1% e agente indutor lactose nas concentrações de 0,2%, 0,4% e 0,6%. As bactérias foram crescidas a 37°C (200 rpm) até a DO 0,4 (aferida a 600 nm), a temperatura foi reduzida a 16 °C e a indução por IPTG (1 mM) ou lactose foi realizada na DO 0.6-0.8. Após a expressão, as culturas foram centrifugadas a 4 °C, 3000 x g, por 10 minutos e o meio de cultura foi descartado. Procedeu-se então a diluição dos precipitados bacterianos em 5 mL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8,0 e PMSF 1 mM). As bactérias foram então lisadas por sonicação, em equipamento QSonica (amplitude 10, 06 pulsos de 15 segundos, com intervalos de repouso de 30 segundos, em gelo). Os lisados foram então centrifugados a 14.000 x g por 15 minutos, a 4°C, e as frações solúveis foram recolhidas. Amostras de 45 µL das frações solúveis foram diluídas em 15 µL de tampão TA 4X e aquecidas a 95°C por 03 minutos. Nos géis SDS-PAGE 10% foram então aplicadas 15 µL de cada amostra, seguindo-se por eletroforese de proteínas e *Western Blot* (conforme itens 4.6 e 4.9). Após a padronização, também foram realizados ensaios de expressão com 100 mL de meio LB, para cada construção, mantendo-se as condições já descritas de expressão, lise, coleta e análise da fração solúvel.

4.17 Estratégias de purificação das proteínas recombinantes

Para a purificação manual (de bancada, em pequena escala), foram utilizadas colunas plásticas (Biorad) com capacidade de 15 mL, e 100 μ L de solução de resina de níquel-NTA (Sepharose Fast Flow). A resina foi lavada 03 vezes com tampão de lise (1 mL em cada etapa), e então o extrato solúvel foi adicionado à coluna. Após essa etapa, foi adicionado 1 mL de tampão A (0,3 M NaCl, 0,05 M TrisHCl, pH 8,0) contendo 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 400 mM de imidazol, pH 8,0. Os tampões foram adicionados consecutivamente e as frações eluídas foram coletadas em tubos de 1,5 mL e mantidas em gelo.

Para a etapa de eletroforese, foi utilizado 45 μ L de cada fração juntamente com 15 μ L de tampão de amostra, as amostras foram então aquecidas a 95 °C, por 03 minutos e submetidas a eletroforese (conforme item 4.6). Os géis então foram submetidos a coloração por solução de prata (item 4.8).

Além da purificação de bancada, também realizamos tentativas em relação à purificação de ambas as proteínas por sistema de cromatografia por afinidade em cromatógrafo Äkta, utilizando-se 750 mL de cultura bacteriana. Para a expressão da proteína TgPDK foi utilizado meio LB, suplementado IPTG 1 mM. Enquanto isso, para a proteína TgBCKDK foi utilizado meio autoinduzido composto por meio LB, suplementado com glicose 0,1% e lactose 0,2%. Após a expressão, as culturas foram centrifugadas a 3000 x g, por 10 minutos, 4°C. Os pellets foram diluídos em 40 mL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl e 300 mM NaCl, pH 8,0 e PMSF 1 mM) e submetidos à microfluidificação. No cromatógrafo Äkta foi utilizada a coluna HisTrap FastFlow (GE), de 1 mL de capacidade, as eluições foram realizadas em *steps*, tentando replicar as condições realizadas nos testes de purificação em bancada.

4.18 Concentração e diálise das frações com utilização de filtro *amicon*

Após a etapa de purificação em bancada da proteína TgBCKDK, as frações foram concentradas por ultrafiltração com o uso de filtros (modelo amicon) com poro de tamanho nominal de 30.000 Da (500 μ L de capacidade), e centrifugação a 14.000 x g, 15 minutos, a 4°C. Após a concentração, as frações foram submetidas à diálise,

com a utilização de 500 µL de tampão A (300 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, pH 8,0) e mesmas condições de centrifugação, procedendo lavagem por 04 vezes. As frações foram submetidas à eletroforese e coloração de prata para verificar a pureza das frações (itens 4.6 e 4.8).

4.19 Ensaio enzimáticos

Para os ensaios de atividade enzimática foram utilizados 0,4 µM de enzima recombinante purificada (TgBCKDK), tampão de reação na concentração final de 25 mM TrisHCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 30 mM KCl, peptídeos sintéticos relacionados à subunidade E1-alfa de BCKDH (**Tabela 2**) na concentração de 50 µM e ATP em concentrações variáveis (75, 150 e 300 µM). O volume final de reação em cada poço foi de 50 µL. Os ensaios foram realizados em 05 réplicas, em placas de 96 poços (Biofil), com temperatura de 37°C, 150 rpm, por 06 horas, protegidas da luz. Após esse tempo, as placas foram acondicionadas em temperatura ambiente por 10 minutos, e então foi adicionado 50 µL de solução do kit Kinase-Glo (Promega). Após a adição do reagente, as placas foram mantidas sob agitação leve (100 rpm) por 05 minutos, e a leitura da luminescência foi realizada em equipamento Synergy H1M2F. Os dados foram tabulados e analisados em software Prism 8.0, com uso de Análise de Variância (Anova), seguida de teste de Tukey.

Identificação	Sequência dos peptídeos
E1-alfa-01	TYR <u>V</u> GHHSTSD <u>D</u> S <u>F</u> QYR
E1-alfa-01 (mutado)	TYR <u>V</u> GHH <u>A</u> TSD <u>D</u> S <u>F</u> QYR
E1-alfa-02	TYR <u>I</u> GHHSTSD <u>E</u> S <u>G</u> AYR

Tabela 2. Peptídeos sintéticos relacionados à subunidade E1-alfa de BCKDH. E1-alfa-01 se relacionada à região de fosforilação da subunidade E1-alfa já descrita na literatura. E1-alfa-02 se relacionada à região de fosforilação da nova subunidade E1-alfa, encontrada a partir das análises de filogenia. Resíduo em vermelho indica mutação no sítio de serina, região principal de fosforilação. Resíduos sublinhados mostram as diferenças de resíduos entre os peptídeos E1-alfa-01 e E1-alfa-02.

Em uma primeira etapa do projeto, peptídeos sintéticos referentes a região de fosforilação de E1-alfa-01 e do peptídeo mutado foram sintetizados pela empresa Biomatik. Posteriormente, novos peptídeos sintéticos, referentes à região de fosforilação de E1-alfa-01 e E1-alfa-02, foram obtidos em colaboração com a UNESC

(Universidade do Extremo Sul Catarinense) e foram sintetizados manualmente por Fmoc *Solid phase Peptide Synthesis*, seguindo-se metodologia reportada na literatura (MACHADO *et al.*, 2014; SCUSSEL *et al.*, 2022). Os peptídeos sintéticos obtidos foram então caracterizados por espectrometria de massa por *electrospray* (ESI-MS). As análises foram realizadas em espectômetro de massa Xevo TQ-S micro Triplo Quadrupolo, com fonte de ionização de geometria Z-Spray, acoplado a um sistema UPLC (Waters Corporation, Framingham, MA, USA). As amostras dos peptídeos foram diluídas em acetonitrila (LC/MS) e foram introduzidas no equipamento por infusão em modo de ionização positiva. Os íons precursores também foram submetidos à fragmentação. Os espectros obtidos foram analisados pelo software MassLynx, versão V4.2 SCN1001 (2019, Waters Inc.).

4.20 Imunoprecipitação (IP) dos complexos proteicos associados a TgPDK e BCKDK

Para os ensaios de imunoprecipitação foram utilizados parasitos *T. gondii* Δ hxgp_rt Δ ku80 (controle, sem etiqueta) e parasitos da mesma linhagem previamente etiquetados (tag 3x.HA) na porção C-terminal das proteínas (TgPDK e TgBCKDK).

Os parasitos foram cultivados em garrafas de 175 cm² em células NHDF utilizando-se meio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), suplementado com 10% de soro fetal, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, mantendo-se as células a 37 °C em estufa com atmosfera umidificada e enriquecida com 5% de CO₂. Quando as células atingiram confluência adequada, foram inoculadas com taquizoítas de *T. gondii* na proporção de 3 a 5 parasitas por célula. Após a lise das células hospedeiras, os parasitas foram contados, e utilizamos 1×10^8 parasitas para os passos seguintes.

Os parasitos foram centrifugados a 700 x g, por 10 minutos, a 4°C, e o meio de cultura foi descartado. O precipitado de parasitas foi então ressuscitado em 1mL de PBS 1X, seguindo-se por nova rodada de centrifugação, nas mesmas condições. Após a centrifugação, foi realizada nova lavagem dos parasitos com PBS 1X, seguindo-se as mesmas condições. Após nova centrifugação, o *pellet* de parasitas foi suspenso em 1 mL de tampão de lise (50 mM TrisHCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF e 1% NP40), e mantidos sob refrigeração por 01 hora. Após esse tempo, os parasitas foram sonicados por 06 vezes, em pulsos de 15 segundos,

intercalados com períodos de repouso de 30 segundos (amostras mantidas em gelo), utilizando amplitude de 10% no equipamento Qsonica. Após a sonicação, os parasitas foram centrifugados a 14.000 x g, 15 minutos, 4 °C e o sobrenadante foi recolhido para os passos posteriores. Previamente, microesferas *magnéticas* foram lavadas 2x com 500 µL de tampão de lise (e com uso de estante magnética), e incubadas com 5 µL de anticorpo anti.HA (RAT) (Roche, REF 11867423001), sendo incubadas por 18 horas, sob agitação, em câmara fria. Após esse período, o tampão foi removido das microesferas magnéticas através do uso de estante magnética, e então o sobrenadante resultante da centrifugação dos parasitas lisados foi adicionado. Procedeu-se então incubação a 4 °C, por 02 horas, sob agitação. Após esse período, as microesferas foram separadas através do uso de estante magnética e procedeu-se lavagem por 6 vezes com tampão de lavagem (50 mM TrisHCl pH 8,0, 150, 300 ou 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF e 1% NP40). Após isso, o tampão de lavagem foi removido e as microesferas foram incubadas com 50 µL de tampão de eluição (1% SDS, 50 mM TrisHCl pH 8.0, 10 mM EDTA), por 10 minutos, em gelo. As microesferas foram removidas através da estante magnética, e o tampão de eluição, contendo as proteínas foi misturado ao tampão TA 4x e utilizado para eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (item 4.6). Os géis foram utilizados para *Western Blot* e coloração de prata (conforme itens 4.8 e 4.9). Triplicatas de cada condição foram enviadas ao Laboratório de Espectrometria de Massas do Instituto Carlos Chagas para o processamento das amostras.

Os arquivos brutos (.raw) gerados pelo Espectômetro de Massas (LC-MS/MS Orbitrap Exploris 120 e Cromatógrafo Líquido Ultimate 3000 RSLCnano - Thermo) foram processados pelo software MaxQuant (versão 2.6.7.0), com os parâmetros ajustados para permitir identificação por correspondência de espectros a partir do banco de dados de *T. gondii* ME49 (Uniprot). Após o processamento, os arquivos gerados foram analisados através do software Perseus, e as diferenças estatísticas foram calculadas através de Análise Variância (Anova) e teste de Tukey. Também utilizamos o teste não-paramétrico *Kruskal-Wallis* para avaliação dos dados quando os resultados não atingiram os critérios de normalidade ou continham réplicas com valores nulos ou zerados, impossibilitando a análise adequada pelo teste *t*, conforme preconizado na literatura (CLEOPHAS; ZWINDERMAN, 2016).

5. RESULTADOS

5.1 Busca de proteínas candidatas às subunidades E1-alfa do complexo BCKDH e PDH em *Toxoplasma gondii*

O complexo BCKDH de *Toxoplasma gondii* é reportado como um complexo enzimático com dupla-função, atuando majoritariamente sobre a conversão do piruvato, porém com atividade residual sobre o metabolismo de aminoácidos (BCAAs) (OPPENHEIM *et al.*, 2014). Essa é uma característica incomum, e não reportada para outros grupos de organismos, dado que geralmente ocorrem complexos desidrogenases voltados à conversão do piruvato (PDH) ou de aminoácidos (BCKDH), sem a sobreposição de atividades bioquímicas. Dado que o complexo PDH está ausente na mitocôndria dos apicomplexas, realizamos buscas para tentar elucidar a possibilidade de existir uma outra subunidade E1-alfa para o complexo BCKDH, ainda não reportada na literatura, e que poderia estar relacionada à função “canônica” voltada aos BCAAs (conforme metodologia reportada no item 4.1). As buscas no BLAST revelaram uma proteína com E-value: 1E-119 (**Figura 21, A**), sendo uma forte candidata a ser uma nova proteína relacionada à subunidade E1-alfa de BCKDH. Essa proteína está identificada com código de acesso UNIPROT (XP_002368552.1), e nomeada como *2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, putative*.

A

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> dehydrogenase E1 component family protein [Toxoplasma gondii ME49]	Toxoplasma gondii ME49	1191	1191	100%	0.0	100.00%	571	XP_002366588.2
<input checked="" type="checkbox"/> 2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, putative [Toxoplasma gondii ME49]	Toxoplasma gondii ME49	362	362	66%	1e-119	47.23%	516	XP_002368552.1

B

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> pyruvate dehydrogenase complex subunit PDH-E1Alpha [Toxoplasma gondii M...	Toxoplasma gondii ME49	1292	1292	100%	0.0	100.00%	635	XP_002366997.1

Figura 21. Identificação de proteínas relacionadas à subunidade E1-alfa de BCKDH com o uso da ferramenta BLAST. A: Buscas utilizando a proteína TGME49_239490 (E1-alfa já descrita para o complexo BCKDH) como referência. B: Buscas utilizando a proteína TGME49_245670 (E1-alfa já descrita para o complexo PDH, do apicoplato) como referência.

Quando realizamos essa mesma busca utilizando como referência a sequência de resíduos da subunidade E1-alfa do complexo PDH (TGME49_245670), nenhuma outra possível proteína candidata foi encontrada (**Figura 21, B**).

A partir do código XP_002368552.1 (Uniprot), identificamos na plataforma ToxoDB uma proteína identificada com o código TGME49_292100, e, apesar de existirem dados relacionados à sequência e ao perfil de expressão dessa proteína depositados nesse banco de dados, nos chamou a atenção de que não há menções em outros artigos científicos sobre essa proteína, nem sobre a sua possível função biológica no metabolismo dos parasitos.

A ausência de dados sobre essa proteína nos motivou a entender melhor esse panorama, dado que nunca foi reportado uma possível nova subunidade E1-alfa para o complexo BCKDH no grupo dos apicomplexas, e que também poderia constituir um alvo biológico para a atuação das quinases TgBCKDK e/ou TgPDK.

Para investigar as regiões conservadas, presentes pela nova proteína candidata, utilizamos as sequências reportadas no ToxoDB (<https://toxodb.org/>), para as proteínas TGME49_239490 (E1-alfa-01) e TGME49_292100 (possível E1-alfa-02), e realizamos alinhamento com o uso da ferramenta *Align* da plataforma Uniprot (**Figura 22**).

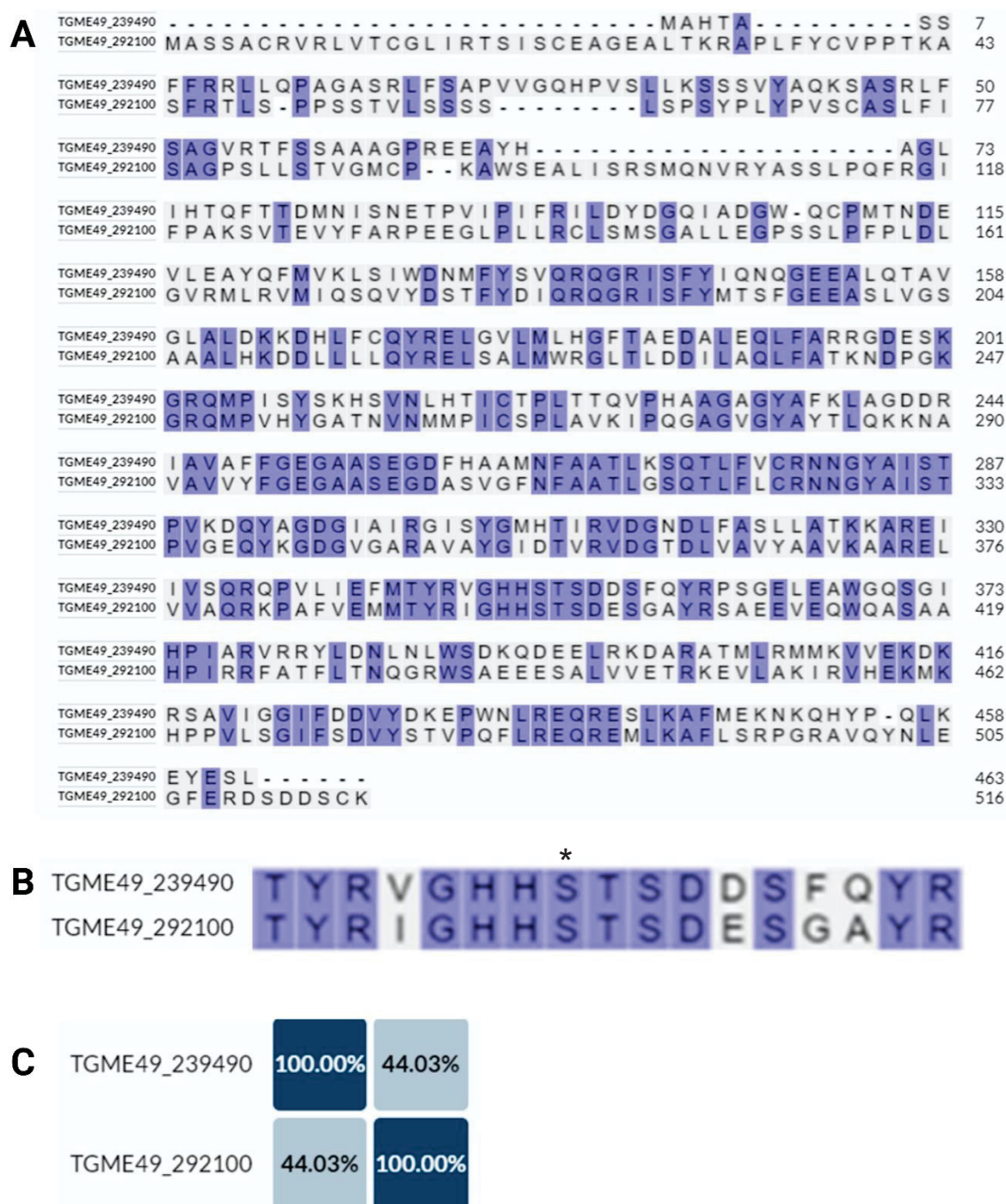


Figura 22. Alinhamento entre a subunidade E1-alfa (TGME49_239490) do complexo de BCKDH de *T. gondii* e a proteína TGME49_292100. A: Alinhamento entre as sequências de resíduos para ambas as proteínas. B: Alinhamento entre as regiões que contém o sítio de Serina (asterisco), e que constitui o alvo principal de fosforilação. C: Índice de similaridade entre as proteínas.

Os dados de alinhamento revelaram diversas regiões conservadas em ambas as proteínas, além de um índice de similaridade de 44,03%, o que fortalece a hipótese de serem proteínas relacionadas. Além disso, ocorre conservação da região associada ao sítio de serina (indicada pelo asterisco) descrito como alvo principal de fosforilação (**Figura 22, B**), (PhosphositePlus, <https://www.phosphosite.org/>). Além disso, ocorre conservação dos resíduos flanqueadores dessa região, em ambas as proteínas, o que é importante para o reconhecimento e interação adequada com proteínas quinases (AHSAN *et al.*, 2012).

A partir dessas informações, realizamos buscas na plataforma OrthoDB (<https://www.orthodb.org/>). Essa plataforma conta com dados genômicos de mais de 18.000 procariotos e aproximadamente 2.000 eucariotos, e pode encontrar proteínas ortólogas em diferentes organismos, inferindo possíveis rotas evolutivas associadas à divergência de sequências-alvo (KUZNETSOV *et al.*, 2023). A submissão do código TGME49_292100 à essa plataforma resultou da identificação da presença de duas proteínas junto à família Sarcocystidae (filo Apicomplexa) (**Figura 23**), o que corrobora com os dados já encontrados no *BLAST* e com o alinhamento das sequências de resíduos de ambas as proteínas. Além disso, os dados apontaram para uma ramificação evolutiva, formando dois grupos distintos, ou seja, a divergência entre as proteínas poderia ser ancestral à origem da própria família Sarcocystidae.

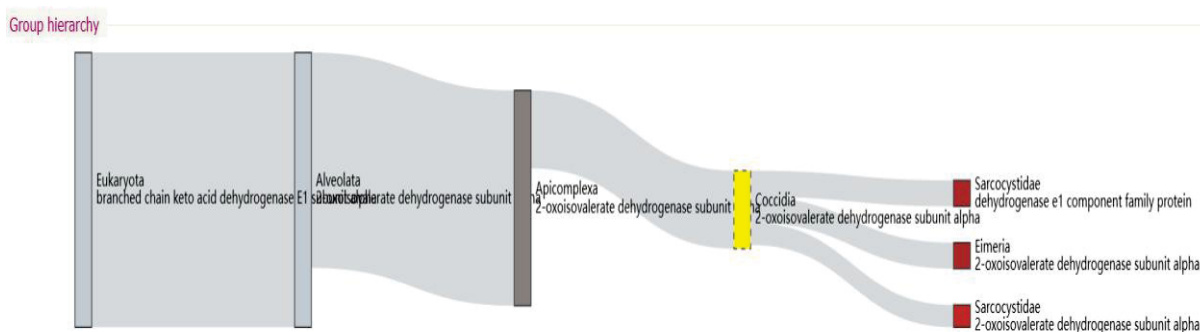
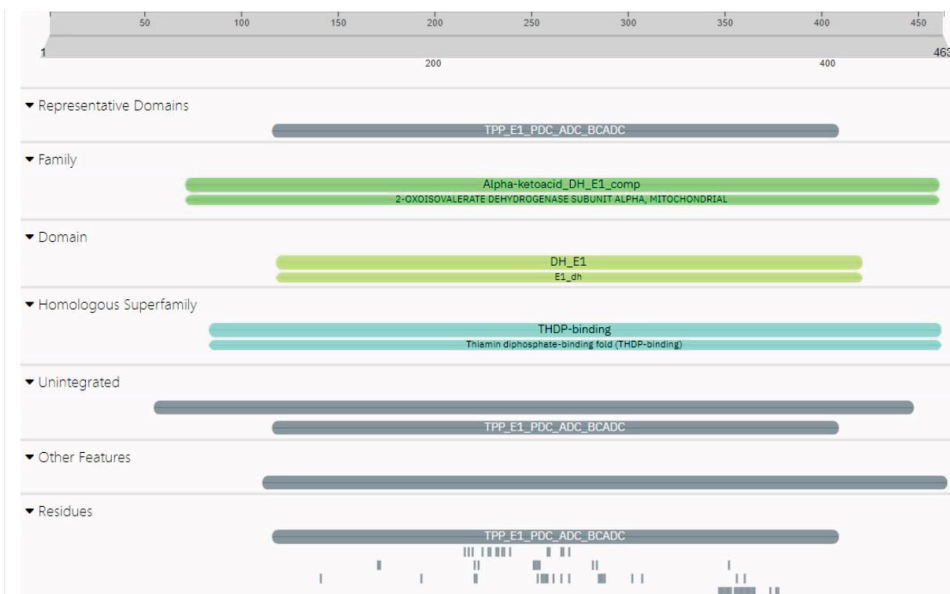


Figura 23. Diagrama evolutivo da subunidade E1-alfa do complexo BCKDH para *Toxoplasma*. É possível observar que junto ao clado Coccidia (apicomplexa) é reportado um ponto de divergência evolutiva, que deu origem a duas proteínas relacionadas à subunidade E1-alfa do complexo BCKDH. Dados OrthoDB (<https://www.orthodb.org/>).

5.2 Análises *in silico* para as regiões de domínios da subunidade E1-alfa de BCKDH

A partir das sequências reportadas para as proteínas TGME49_239490 (E1-alfa-01) e TGME49_292100 (possível E1-alfa-02), realizamos buscas junto à plataforma *Interpro* (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) para verificar se os domínios conservados estariam presentes em ambas as proteínas (**Figura 24**).

A



B

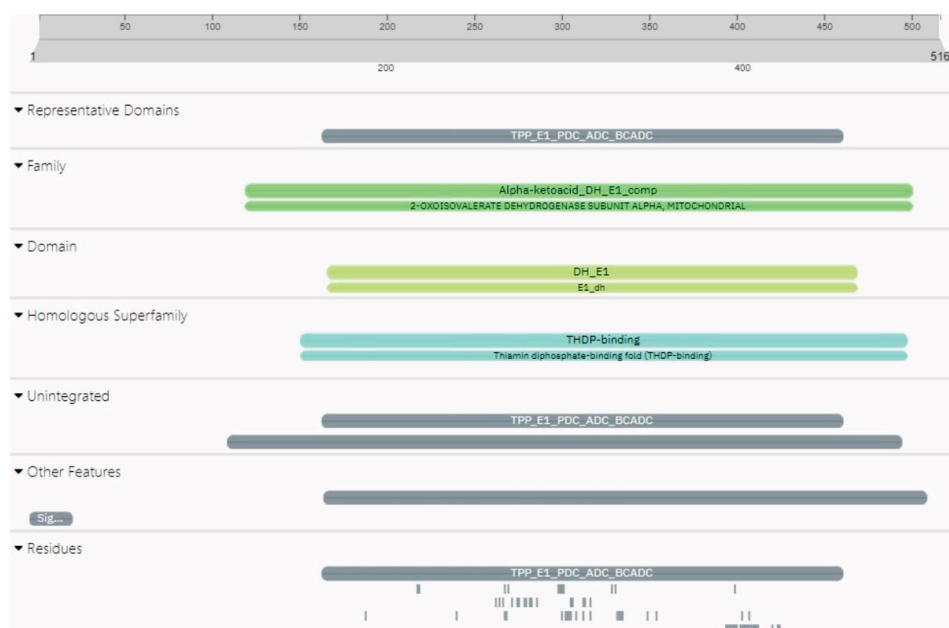


Figura 24. Regiões de domínios previstas para as proteínas relacionadas à subunidade E1-alfa para o complexo BCKDH de *Toxoplasma gondii*. A. Proteína TGME49_239490 (E1-alfa-01), já reportada na literatura. **B.** Proteína TGME49_292100 (E1-alfa-02). Dados Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

Os resultados indicam que ambas as proteínas apresentam as mesmas regiões de domínios, nas mesmas posições, além da identificação de um domínio identificado como “*2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha*”, que é um domínio conservado presente na subunidade E1-alfa dos complexos BCKDH de diferentes organismos (Ævarsson et al., 1999).

Como forma complementar, realizamos buscas em relação ao perfil transcriptômico dessas proteínas, com análise dos dados já depositados na plataforma ToxoDB (<https://toxodb.org/>); além do perfil de expressão das proteínas quinases TgBCKDK e TgPDK, proteína TgBCAT (transaminase que atua na desaminação de BCAAs) (Du *et al.*, 2022), da subunidade E1-beta, proteína que está diretamente associada à função da subunidade E1-alfa nos complexos BCKDH/PDH (JENG; HUH; SONG, 1994); bem como dos componentes E2 e E3, que participam da estruturação desses complexos desidrogenases (HEVLER *et al.*, 2023) (**Figura 25**).

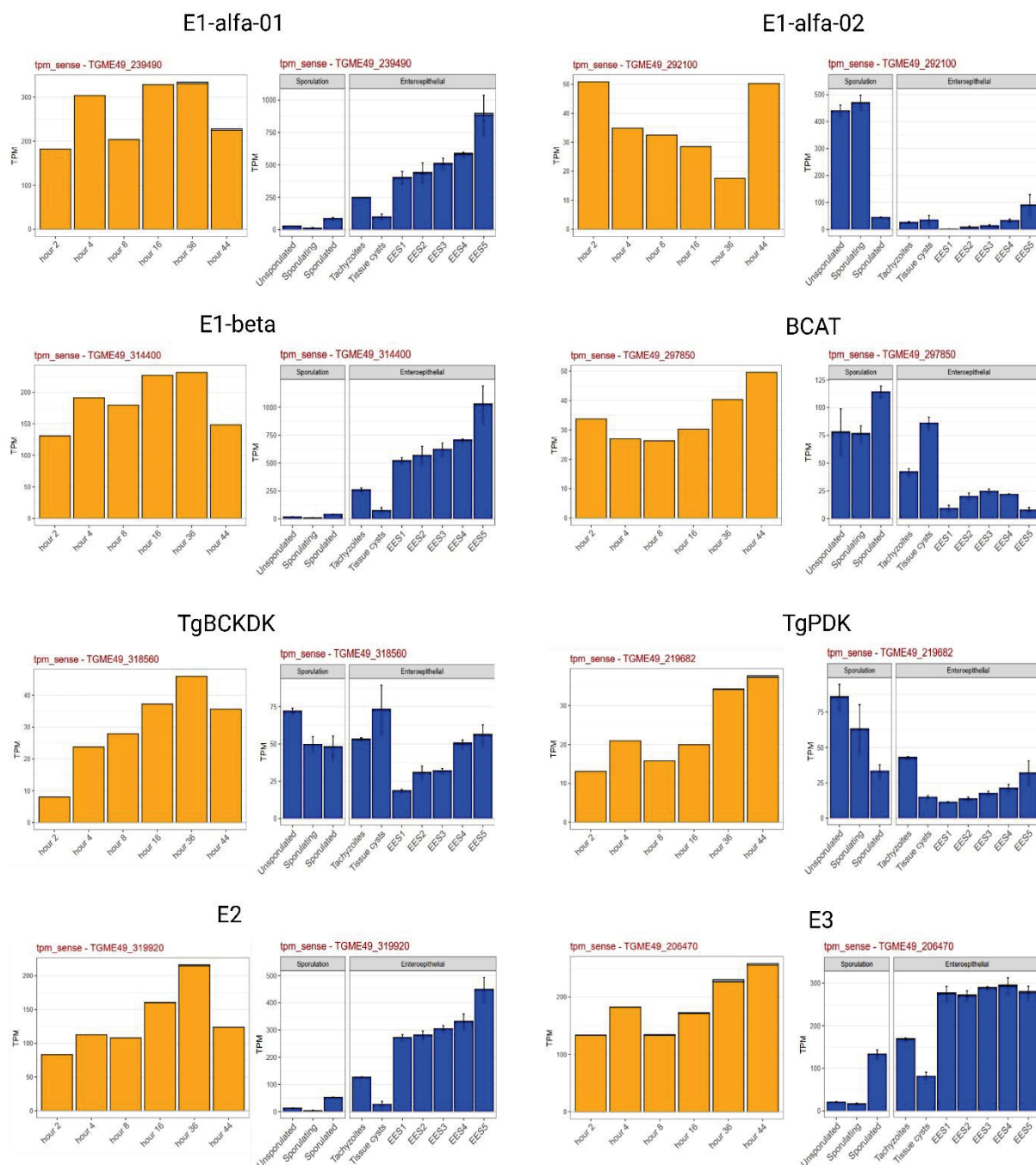


Figura 25. Perfis de expressão de diferentes proteínas em *Toxoplasma gondii*. Perfis de transcriptoma (RNA-Seq) de cultivos de taquizoítas *in vitro* em diferentes tempos (gráfico laranjas à direita), e perfis de infecção *in vivo* (enterócitos, gráficos em azul). EES1: estágio muito inicial de infecção, isolado a partir de um gato. EES2: estágio inicial de infecção em células entéricas, isolados a partir de dois gatos. EES3 e 4: estágio misto e tardio de infecção em células entéricas, respectivamente, isolados a partir de dois gatos. EES5: estágio tardio de infecção, isolado de um gato. TPM = transcritos por milhão. Adaptado de ToxoDB (<https://toxodb.org/>) e Ramakrishnan et al., 2019.

Os perfis de expressão mostram antagonismo entre as proteínas E1-alfa-01 e E1-alfa-02. E1-alfa-01 apresenta uma tendência constante de aumento ao longo das fases de replicação em enterócitos de felinos, porém com uma redução tanto após 44 horas de replicação intracelular *in vitro* quanto nas fases de esporulação. Enquanto isso, E1-alfa-02 apresenta-se aumentada durante a esporulação e reduzida durante a fase proliferativa em enterócitos, porém com um aumento após 44 horas de proliferação *in vitro*, o que nos sugere um comportamento de alternância metabólica entre essas proteínas, o que poderia ser um mecanismo de adaptação à disponibilidade de nutrientes ao longo do ciclo de vida dos parasitos.

Quando analisamos o perfil de expressão da enzima BCAT (relacionada ao pré-processamento de aminoácidos) encontramos um perfil similar ao relacionada à subunidade E1-alfa-02, tanto com um aumento durante a fase de esporulação, quanto na faixa de 36 a 44 horas de proliferação *in vitro*, porém com uma menor expressão durante as fases proliferativas em enterócitos.

A literatura aponta que *Toxoplasma* apresenta um alto consumo de glicose durante as fases replicativas (BLUME *et al.*, 2015), porém na fase de oocistos ocorre um aumento na conversão de BCAAs como fonte de energia (POSSENTI *et al.*, 2013). Dessa forma, analisando-se em conjunto os dados de expressão para E1-alfa-02 e BCAT, quanto o que a literatura já propõe, é possível especular que a enzima E1-alfa-02 esteja diretamente associada à conversão de BCAAs, diferente da atividade da enzima E1-alfa-01 que já foi descrita como voltada à degradação do piruvato (OPPENHEIM *et al.*, 2014), com uma possível alternância entre essas subunidades, o que capacitaria o complexo BCKDH na degradação do piruvato ou de BCAAs conforme a etapa do ciclo de vida dos parasitos.

A subunidade E1-alfa dos complexos desidrogenases apresenta atividade catalítica dependente de sua associação com a subunidade E1-beta (JENG; HUH; SONG, 1994); o que justifica a necessidade de se analisar também os dados de expressão dessa subunidade, em conjunto com o perfil de expressão das subunidades E1-alfa-01 e E1-alfa-02 de *Toxoplasma*. O perfil de expressão de E1-beta revela uma forte similaridade ao perfil já verificado em E1-alfa-01, tanto com uma redução durante as fases de esporulação quanto após 44 horas de proliferação *in vitro*.

Entretanto, para a subunidade E1-alfa-02 os dados de expressão indicam uma faixa de 400 transcritos por milhão (TPM) na fase de esporulação dos parasitos, o que não ocorre para a subunidade E1-beta, que está muito reduzida nessa etapa do ciclo de vida. Dado que a atividade de E1-alfa é dependente de sua associação com uma subunidade E1-beta correspondente para a sua atividade catalítica, isso também poderia nos indicar a existência de outra subunidade E1-beta, também não reportada na literatura. Dessa forma, realizamos buscas nas plataformas Blast, Uniprot e OrthoDB buscando encontrar evidências de proteínas homólogas relacionadas à subunidade E1-beta, entretanto encontramos apenas a subunidade já reportada na literatura.

Analisando-se os dados de expressão das quinases TgBCKDK e TgPDK é possível observar que ambas as quinases estão presentes em todas as fases do ciclo de vida dos parasitos. TgBCKDK apresenta uma redução após 44 horas de cultivo *in vitro*, semelhante à redução verificada na subunidade E1-alfa-01, enquanto a expressão de TgPDK aumenta entre os períodos de 36 e 44 horas de cultivo, similar ao aumento de expressão verificada para a subunidade E1-alfa-02 após 44 horas de cultivo. Dado que ambas as quinases aumentam ao longo da fase proliferativa, quanto durante a fase de esporulação dos parasitos, não é possível sugerir uma possível associação preferencial entre cada quinase em relação à cada uma das subunidades E1-alfa do complexo BCKDH.

O perfil de expressão dos componentes E2 e E3 também se assemelha ao perfil já verificado para as subunidades E1-alfa-01 e E1-beta, com maior expressão principalmente durante a replicação dos parasitos. Os bancos de dados Uniprot, Blast e OrthoDB também não indicam outras possíveis proteínas homólogas para E2 e E3, relacionadas ao complexo BCKDH de *Toxoplasma*, sugerindo que essas proteínas possivelmente podem existir como proteínas únicas, sendo sintetizadas principalmente durante a fase taquizoíta.

5.3 Modelagens *in silico* para as subunidades E1-alfa do complexo BCKDH de *T. gondii*

A partir das sequências reportadas para E1-alfa-01 e possível E1-alfa-02, realizamos modelagens *in silico* através da ferramenta Rosetta-Fold, e posterior sobreposição estrutural com o uso da ferramenta *MatchMaker* do software Chimera versão 1.17.3 (conforme metodologia do item 4.1), para verificar possíveis diferenças estruturais entre essas proteínas (**Figura 26**).

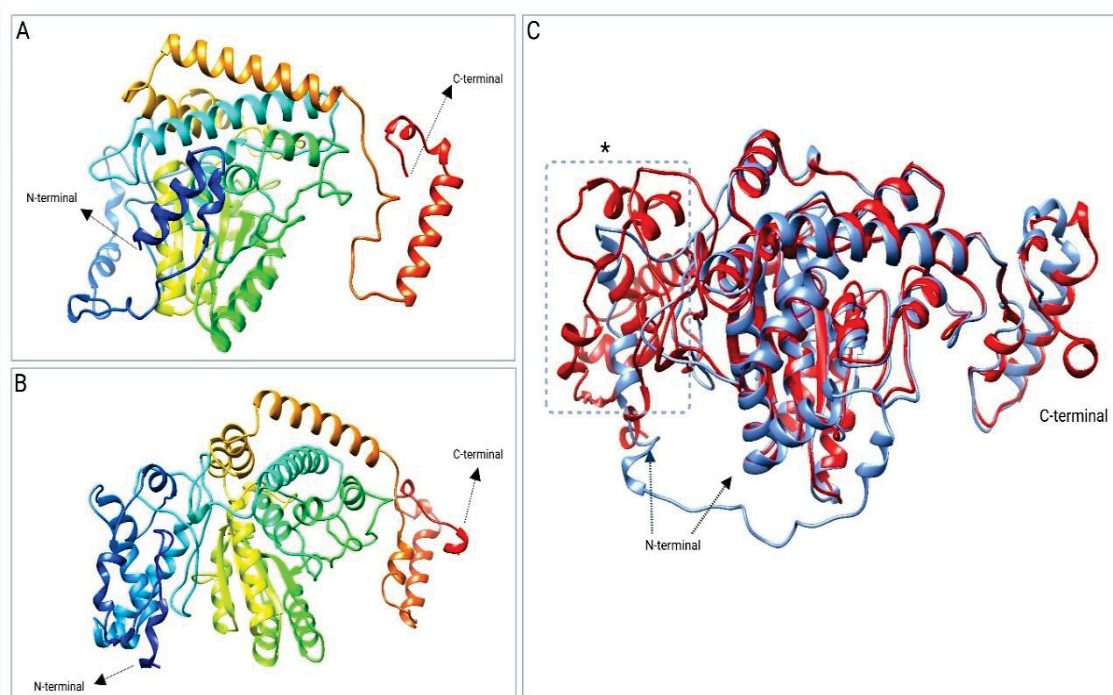


Figura 26. Modelagens *in silico* para as proteínas E1-alfa-01 e E1-alfa-02. A: Subunidade E1-alfa-01 de BCKDH. B: Possível subunidade E1-alfa-02 de BCKDH. C: Sobreposição estrutural entre as subunidades E1-alfa-01 (em azul) e E1-alfa-02 (em vermelho); região tracejada com asterisco: região próxima à região N-terminal de cada proteína, sem sobreposição estrutural.

A sobreposição estrutural entre as proteínas resultou em um índice RMSD (desvio quadrático médio) de 0.838 angstroms, e é possível observar sobreposição estrutural em diversas regiões de alfa-hélices e folhas-beta, com exceção de uma região N-terminal, conforme destacado na figura 26C (asterisco). Essa diferença está diretamente relacionada às diferenças de resíduos já observados no alinhamento entre as duas proteínas (**Figura 22**), onde E1-alfa-02 possui uma região N-terminal com um número maior de resíduos em comparação com a proteína E1-alfa-01.

A literatura aponta que os complexos desidrogenases BCKDH e PDH surgiram muito cedo na evolução dos organismos, ainda nos procariotos, a partir de um ponto de divergência em comum dos genes codificantes das proteínas desses complexos. Além disso, a partir de uma divergência evolutiva mais recente, ocorreu o surgimento do complexo PDH presente nas cianobactérias (SCHNARRENBARGER; MARTIN, 2002).

Nesse sentido, os dados que obtivemos com a árvore filogenética estão de acordo com a literatura, com a presença de um ponto central que liga os complexos BCKDH e PDH entre si, bem como um ponto de divergência posterior, que originou os complexos PDH presentes nas bactérias e nas mitocôndrias dos eucariotos, em relação ao complexo PDH presente em cianobactérias e plastídios. É possível observar também, que apesar das sequências referentes aos complexos desidrogenases das bactérias terem resultado em ramos divergentes dos observados nos eucariotos, é possível observar um ponto evolutivo em comum entre as alfaproteobactérias (gêneros *Rickettsiales*, *Blastomonas*, *Kiloniellales*, *Rhodospirillales*) e em um ponto mais distante com a espécie *Nocarioides marinus* (filo Actinobacteria), em relação ao complexo PDH mitocondrial, o que confirma as relações evolutivas já pontuadas na literatura, que relacionam principalmente as alfaproteobactérias com a origem da mitocôndria (ROGER; MUÑOZ-GÓMEZ; KAMIKAWA, 2017).

Além disso, é possível observar que as sequências relacionadas ao E1-alfa ao complexo PDH das cianobactérias *Pantanalinema* sp. e *Caminibacter pacificus*, também estão em um ramo evolutivo próximo ao complexo PDH dos plastídios, o que corrobora com os dados da literatura, que relacionam a origem dos plastídios a partir de um ancestral ligados às cianobactérias (MCFADDEN, 2014; ROGER; MUÑOZ-GÓMEZ; KAMIKAWA, 2017).

A subunidade E1-alfa do complexo PDH, localizada no apicoplasto de *Toxoplasma gondii* (identificada como TGME49_245670), está junto ao grupo dos complexos PDH de plastídios, o mesmo ocorre para os outros apicomplexos como *Plasmodium*, *Neospora*, *Hammondia*, *Cystoisospora*, o que também indica que esse complexo tem origem a partir do mesmo ramo evolutivo que deu origem aos plastídios (cloroplastos) de vegetais e algas (Liang et al., 2020).

Ortólogos relacionados à subunidade E1-alfa-02 do complexo BCKDH de *Toxoplasma* também foram encontrados em diferentes apicomplexas, como *Neospora*, e nos gêneros *Vitrella* e *Chromera* (grupo Alveolata), ou seja, o evento de duplicação que levou ao surgimento das duas proteínas encontradas em *T. gondii* pode ser anterior ao surgimento do próprios alveolados. Enquanto isso, em *Plasmodium*, *Babesia*, *Theileria* e *Haemoproteus*, ocorre apenas uma proteína relacionada à subunidade E1-alfa-01.

Durante o alinhamento das sequências relacionadas às subunidades E1-alfa dos complexos BCKDH, PDH e PDH de plastídios (o que inclui o apicoplasto), de diferentes organismos eucariotos, também encontramos um padrão conservado na região flanqueadora da serina-293, sítio principal de fosforilação das enzimas mitocondriais desse grupo de proteínas (**Tabela 3**, e dados no **Anexo III**).

Organela	Complexo	Região conservada
Mitocôndria	BCKDH	TYR - - - H S T S D x - - - YR
	PDH	TYR - - - H S M S D P - - - YR
Plastídios	PDH	TYR - - - H S (L/V/P) A D P - - - R

Tabela 3. Regiões conservadas observadas na subunidade E1-alfa dos complexos desidrogenases BCKDH e PDH. Em BCKDH, o resíduo **x** representa uma grande variedade de resíduos, mas sem a ocorrência de prolina (**P**), que ocorre somente nos complexos PDH mitocondriais e de plastídios. Na subunidade E1-alfa do complexo PDH de plastídios não ocorre o aminoácido tirosina (Y), antes da arginina (R). Os trechos marcados com hífen (-) indicam resíduos que são variáveis entre as subunidades E1-alfa desses complexos.

Na subunidade E1-alfa dos complexos BCKDH ocorre uma região central contendo os resíduos **STS**, onde a primeira serina dessa região é o sítio principal de fosforilação. Enquanto isso, no complexo PDH mitocondrial, essa região está composta pelos resíduos **SMSDP**, onde ocorreu a substituição do aminoácido treonina (**T**), pela metionina (**M**) ao longo da evolução, além da presença de um resíduo de prolina (**P**), localizado após o aspartato (**D**), que não é encontrado em BCKDH. Além disso, verificamos que nos complexos PDH do apicoplasto e de plastídios, que a região flanqueadora ao sítio de serina pode ser composta pelos resíduos **SLA**, **SVA** ou **SPA**, com a conservação do sítio de prolina já verificado no complexo PDH mitocondrial, o que reforça a mesma origem evolutiva entre esses dois complexos.

5.5 Análises filogenéticas para as quinases BCKDK e PDK dos apicomplexas

Conforme descrito acima, nossos dados indicaram a presença de 02 proteínas para a subunidade E1-alfa do complexo BCKDH de *T. gondii*, ambas contendo região de fosforilação composta pelo sítio **STS**, o que facilitaria uma atribuição possivelmente clara para a atuação da quinase BCKDK. Entretanto, dado a ausência de um complexo PDH na mitocôndria dos parasitos, a atribuição de um alvo biológico para PDK sobre o metabolismo dos parasitos permaneceria incerta. Além disso, para a atividade catalítica de PDK é necessária a presença dos resíduos flanqueadores correspondentes ao complexo PDH, além da presença obrigatória do resíduo de prolina na região-alvo (AHSAN *et al.*, 2012), os quais estão ausentes em ambas as subunidades E1-alfa encontradas para o complexo BCKDH de *Toxoplasma*. Dessa forma, isso também nos motivou a investigar melhor as origens evolutivas dessa enzima, buscando por alguma possível origem divergente e que pudesse associar essa enzima sobre um possível alvo biológico “não-tradicional”, como o complexo BCKDH dos parasitos (**Figura 28**).

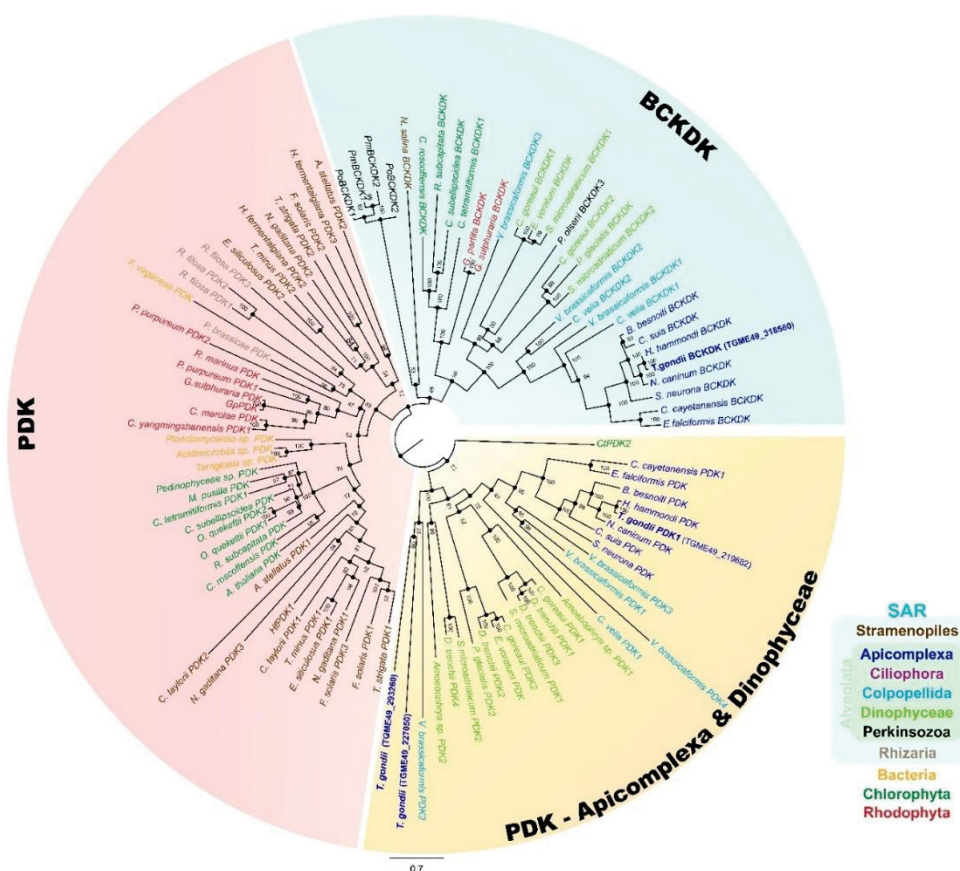


Figura 28. Árvore filogenética para as quinases BCKDK e PDK, considerando diferentes grupos de organismos. Cada grupo de organismos está representada pelas cores contidas na legenda.

Nossos dados filogenéticos indicaram que as quinases BCKDK e PDK da maioria dos organismos possuem uma origem filogenética em comum, podendo-se observar uma divisão dicotômica em relação a esses dois grupos de proteínas. Enquanto a proteína identificada como TGME49_318560 de *T. gondii* está associada ao grupo das quinases BCKDKs de outros organismos, o mesmo não ocorre para a quinase PDK (TGME49_219682), estando em um grupo totalmente divergente de quinases do tipo “PDK” e que engloba vários representantes do grupo Alveolata, ou seja, a divergência dessa proteína é, possivelmente anterior à própria origem de todo esse grupo de organismos.

A partir das buscas filogenéticas também encontramos duas proteínas divergentes, identificadas como TGME49_293260 e TGME49_227050 em *Toxoplasma*, porém não é possível atribuir a essas enzimas uma possível função do tipo PDK, dado que a região N-terminal regulatória (denominada como BCKDHK_Adom), que é conservada e característica dentro do grupo das quinases PDHKs, não foi identificada pela plataforma Interpro. Dessa forma, essas proteínas podem ser totalmente divergentes, apesar de sua origem comum com a enzima TgPDK, e podem não estar associadas à regulação do complexo BCKDH, dado que a presença desse sítio regulatório é importante para a atuação enzimática das quinases do tipo PDK ou BCKDK em outros organismos (ANWAR et al., 2021), entretanto, testes enzimáticos são requeridos para elucidar melhor a participação dessas enzimas no metabolismo de *T. gondii*.

Um trabalho anterior do grupo descreveu a existência de duas enzimas quinases mitocondriais (TgBCKDK e TgPDK) como possíveis enzimas regulatórias para o complexo BCKDH de *Toxoplasma* (FERRARINI et al., 2021), no entanto, sem um estudo aprofundado sobre a origem evolutiva dessas quinases em relação ao grupo dos alveolatas e demais organismos do supergrupo SAR.

Assim, essas informações filogenéticas sobre TgPDK trazem indícios de que essa enzima pode ter se adaptado evolutivamente para uma atuação regulatória sobre o complexo BCKDH de *Toxoplasma*, diferente do que normalmente ocorreria se essa enzima estivesse associada ao grupo das enzimas PDKs dos demais organismos.

5.6 Panorama evolutivo dos complexos desidrogenases e das quinases mitocondriais para os Apicomplexos e demais Alveolatas

Os dados de filogenia em relação à subunidade E1-alfa de BCKDH indicaram a presença da subunidade E1-alfa-02 para esse complexo desidrogenase em *Toxoplasma*, ainda não reportada na literatura. Além disso, encontramos um padrão evolutivo distinto para a quinase PDK dentro dos organismos do grupo Alveolata (apicomplexos e dinofíceas). Dessa forma, para uma melhor análise das questões evolutivas referentes tanto aos complexos desidrogenases (PDH e BCKDH), quanto em relação às possíveis quinases regulatórias (BCKDK e PDK), realizamos a sobreposição dos dados encontrados em relação aos principais organismos do supergrupo SAR, visando verificar a distribuição dessas proteínas ao longo da evolução desses organismos (**Figura 29**).

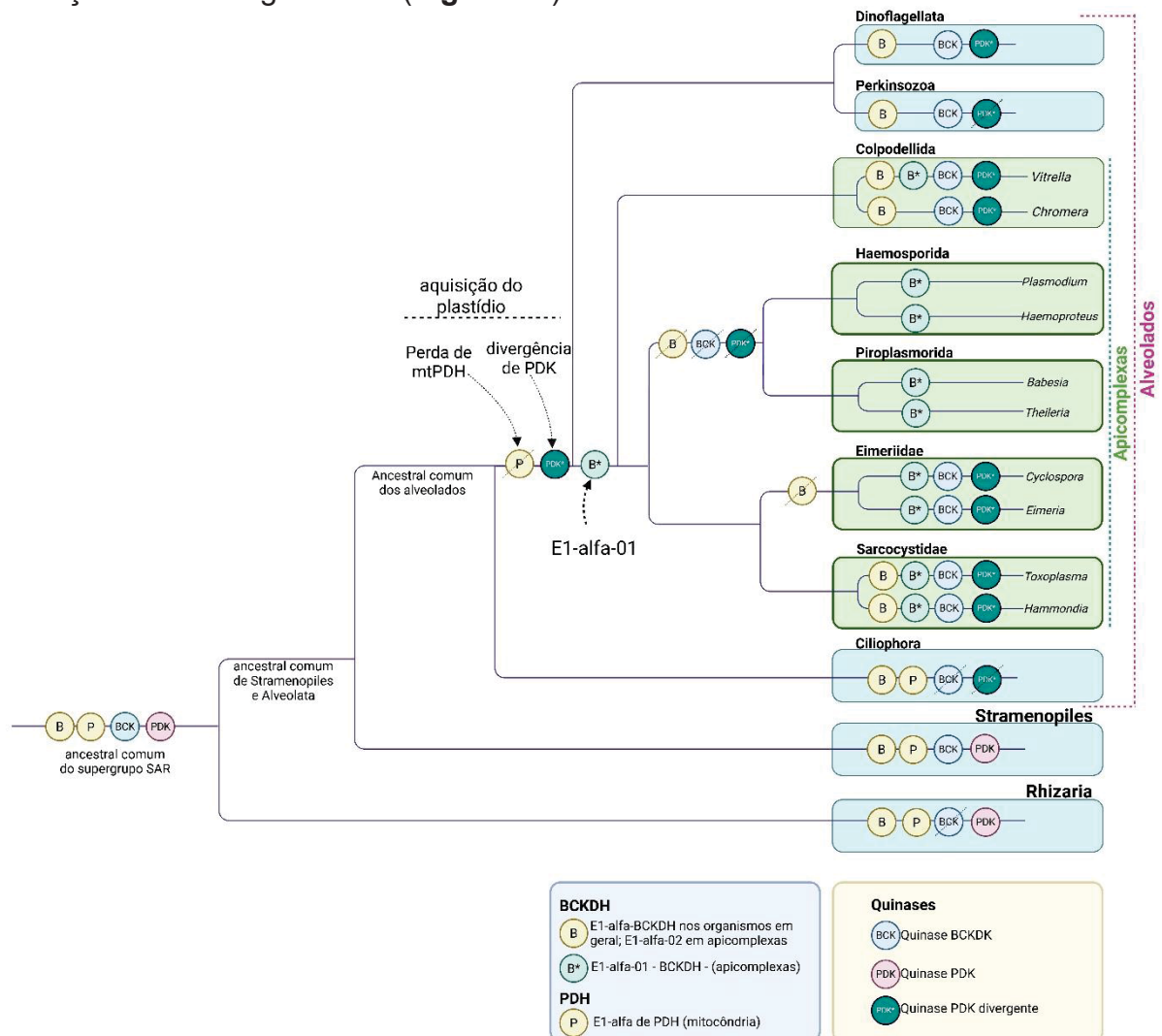


Figura 29. Distribuição dos complexos desidrogenases mitocondriais BCKDH/PDH e das quinases BCKDK/PDK entre os organismos do supergrupo SAR.

É um consenso na literatura que os apicomplexos perderam o complexo PDH mitocondrial, entretanto ainda restam dúvidas em relação a qual momento evolutivo isso ocorreu (MOGI; KITA, 2010). Os nossos dados indicam que o último ancestral comum dos alveolados possuía o complexo PDH mitocondrial (mtPDH), o qual ainda está presente em Ciliophora. Após o evento evolutivo de divergência evolutiva que separou o ancestral do grupo Ciliophora, do ancestral que deu origem aos apicomplexos, dinoflagelados e Perkinsozoa, ocorreu a perda desse complexo desidrogenase, sendo que nesses organismos ocorre a presença de plastídios.

Nossos dados evolutivos também indicam que de forma concomitante à perda do mtPDH, ocorreu a divergência de uma quinase do tipo *PDK*, em um grupo enzimático divergente das quinases PDK encontradas nos demais organismos, algo observado também no resultado apresentado na **Figura 28**, quando foi analisado a história evolutiva das quinases BCKDK e PDK.

Dinoflagellata e Perkinsozoa são grupos filogeneticamente próximos, e derivados do mesmo ancestral comum e divergiram ainda na base da evolução dos alveolados (RUECKERT; PIPALIYA; DACKS, 2019), porém enquanto encontramos a quinase PDK junto aos dinoflagelados, não identificamos um homólogo dessa enzima em Perkinsozoa. Dessa forma, em Perkinsozoa já pode ter ocorrido um evento de perda dessa enzima, porém o ancestral comum de ambos os clados já continha essa enzima, o que nos permitiu pontuar a origem de PDK em um ponto anterior ao surgimento do ancestral desses dois grupos de organismos.

Além disso, de maneira interessante, nos apicomplexos, ou ambas as quinases estão ausentes, como em Haemosporida e Piroplasmorida, ou ambas estão presentes, como em Eimeriidae e Sarcocystidae. Essa característica pode estar relacionada à própria história evolutiva dos grupos, com a perda conjunta de quinases em organismos que se adaptaram à infecção de células sanguíneas, como o caso de Haemosporida e Piroplasmorida (PACHECO; ESCALANTE, 2023; RAZAVI *et al.*, 2023), diferente da infecção de Eimeriidae e Sarcocystidae voltada a tecidos musculares, nervosos e intestinais (BANGOURA; BHUIYA; KILPATRICK, 2022; WOHLFERT; BLADER; WILSON, 2017).

Além disso, em todos os apicomplexos, ocorre uma subunidade E1-alfa de BCKDH voltada à conversão do piruvato, porém somente em Sarcocystidae ocorre a

subunidade E1-alfa-02, que em *Toxoplasma* identificamos como a proteína TGME49_292100.

Talvez seja possível que a presença de 02 proteínas E1-alfa para o complexo BCKDH, bem como a presença das 02 quinases no grupo Sarcocystidae (que inclui *Toxoplasma*) possa conferir uma flexibilidade metabólica e adaptativa muito maior do que a verificada nos grupos Haemosporida (que inclui o gênero *Plasmodium*, causador da malária) e Piroplasmida (com os gêneros *Babesia* e *Theileria*), e talvez poderia estar associada à capacidade de formação de cistos teciduais e de oocistos em *Toxoplasma*, que não é verificada em *Plasmodium* por exemplo. Além disso, o uso de inibidores de quinases, como o DCA (ácido dicloroacético), pode ter uma importância biológica relevante para o tratamento da toxoplasmose, como já reportado na literatura (FERRARINI *et al.*, 2021), porém, em contrapartida, poderia ter efeitos limitados para o tratamento da malária, devido à ausência das quinases BCKDK e PDK nesses parasitos.

A identificação de uma nova proteína para a subunidade E1-alfa de BCKDH em *Toxoplasma* é um avanço importante para uma melhor compreensão em relação ao funcionamento desse complexo desidrogenase nos parasitos. Além disso, a identificação da história evolutiva de ambas as quinases, indicando que a quinase PDK dos parasitos pertence a um ramo evolutivo distinto das quinases PDKs de outros organismos também pode reforçar a possibilidade dessa quinase atuar na regulação do complexo BCKDH dos parasitos. Dessa forma, isso motivou a realizar testes relacionados à expressão recombinante de ambas as enzimas e ensaios enzimáticos frente a peptídeos sintéticos relacionados à ambas as subunidades E1-alfa, visando verificar se as quinases poderiam ter uma atuação enzimática preferencial sobre algum desses possíveis alvos biológicos. Além disso, a partir da purificação das enzimas recombinantes seria possível identificar se essas quinases seriam os alvos biológicos de DCA, que inibe o crescimento de *Toxoplasma in vitro* (FERRARINI *et al.*, 2021).

5.7 Expressão recombinante de PDK (sequência completa) em sistema procarioto

Diferentes cepas de *E. coli* (DE3) e metodologias de expressão foram empregadas para a expressão recombinante da proteína TgPDK (~82 kDa). O que incluiu as cepas Δ -Slyd, BL21-Star e Artic Express. Foram realizadas análises da expressão das proteínas recombinantes usando extratos totais, fração solúvel e fração insolúvel por eletroforese em gel SDS, seguida de *Western Blot*.

A análise dos perfis de eletroforese não indicou a expressão da proteína TgPDK (em sua sequência completa) em nenhuma das condições testadas para a cepa Δ -SLyD (**Figura 30**).

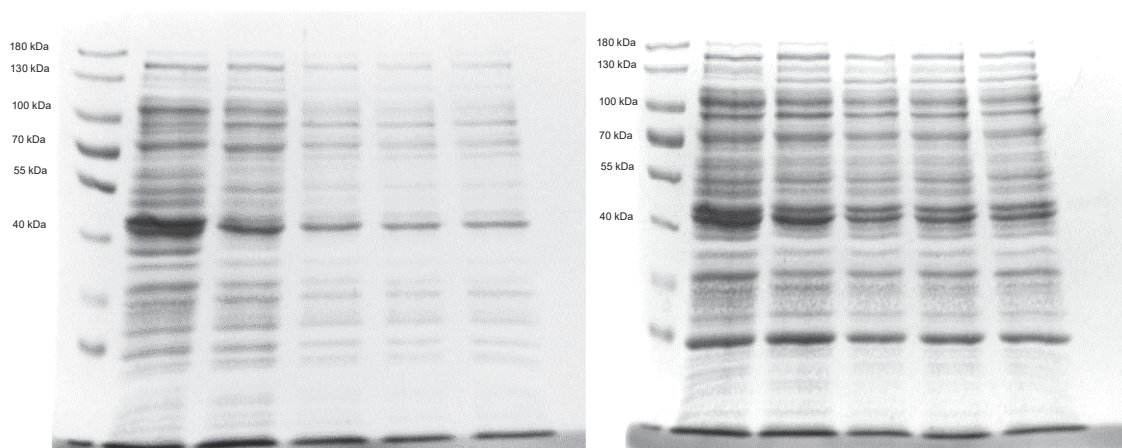


Figura 30. Ensaio de Expressão de TgPDK (~ 82 kDa), na cepa *E. coli* Δ -SLyD. A. Expressão a 20°C, por 16 horas. Géis contendo extrato solúvel, contendo as condições controle (não induzido), e as seguintes concentrações de IPTG (0,1, 0,5, 1,0 e 2,0 mM). **B.** Expressão a 37°C, por 04 horas. Extrato solúvel, contendo as condições controle (não induzido), e as seguintes concentrações de IPTG (0,1, 0,5, 1,0 e 2,0 mM). Géis corados com Azul de Comassie. Marcador de peso molecular Page Ruler Protein Ladder (Thermo).

A expressão da proteína PDK de *Arabidopsis thaliana* em outros estudos (TOVAR-MÉNDEZ *et al.*, 2005) foi alcançada na cepa BL21-Star utilizando um meio de cultura mais rico (Terrific Broth). Por isso, tentamos também nessa cepa, e testamos diferentes temperaturas, 18° C e 25°C, para o tempo de expressão de 16 horas, e as temperaturas de 30 e 37° para o tempo de expressão de 04 horas. A indução de expressão foi realizada com a adição de IPTG (0,5 mM e 1,0 mM) (**Figuras 31 e 32**).

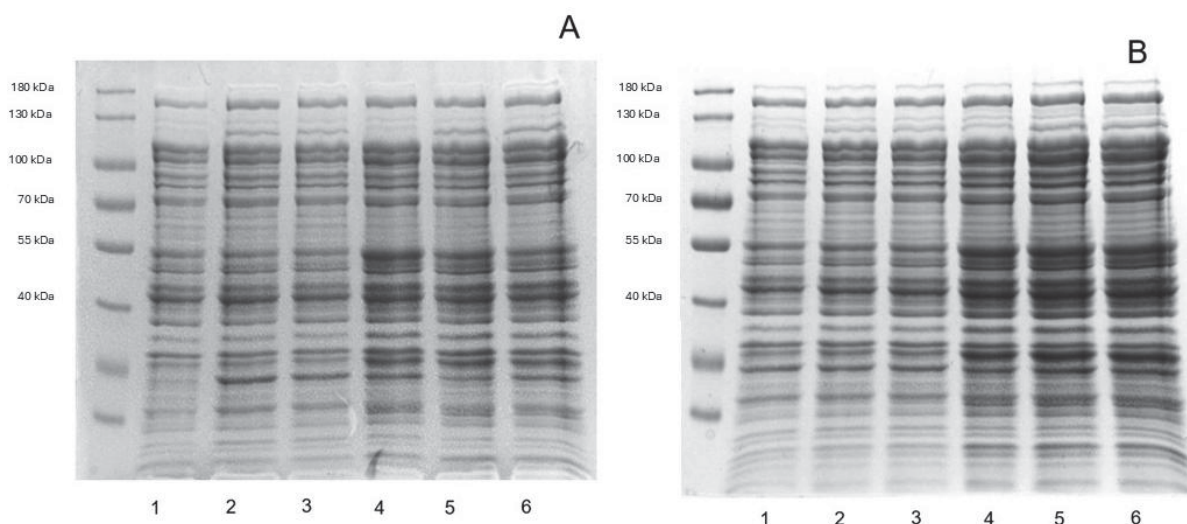


Figura 31. Ensaio de Expressão de TgPDK (~82 kDa), na cepa *E. coli* BL21 Star (Extrato solúvel), meio de cultura Terrific Broth. A. Teste de expressão conduzido a 18 °C. 1) Controle sem IPTG. 2) Indução a 0,5 mM IPTG. 3) Indução a 1,0 mM IPTG. Condições 1 a 3 com tempo de expressão de 04 horas. 4) Controle sem IPTG. 5) Indução a 0,5 mM IPTG. 6) Indução a 1,0 mM IPTG (todas por 16 horas). **B.** Teste de expressão conduzido a 25 °C. 1) Controle sem IPTG. 2) Indução a 0,5 mM IPTG. 3) Indução a 1,0 mM IPTG. Condições 1 a 3 com tempo de expressão de 04 horas. 4) Controle sem IPTG. 5) Indução a 0,5 mM IPTG. 6) Indução a 1,0 mM IPTG. Todas as condições com cultivo por 16 horas.

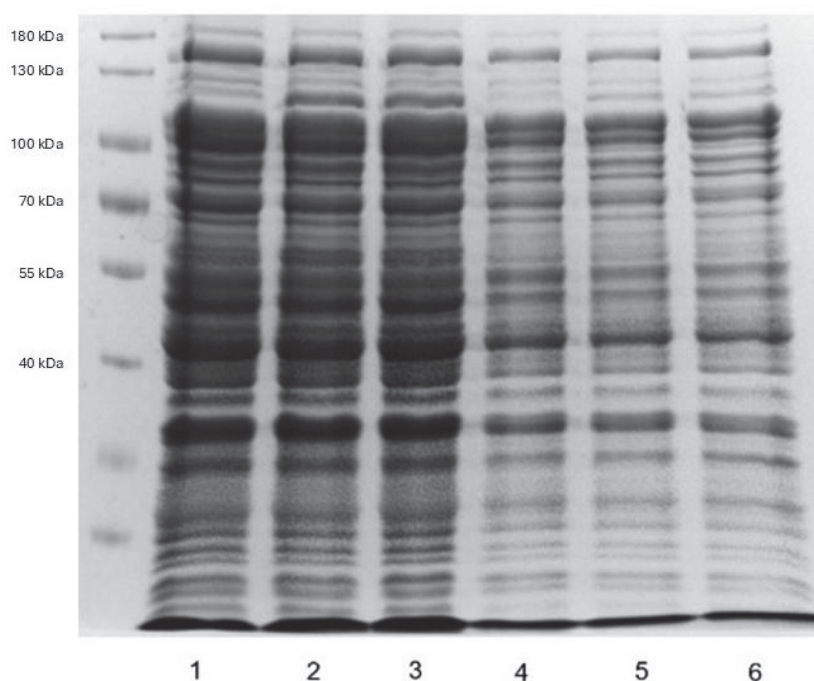


Figura 32. Expressão de TgPDK em *E. coli* BL21 Star, meio Terrific Broth com as temperaturas de expressão de 30 e 37 °C. 1 a 3: temperatura de expressão a 30 °C controle não induzido, indução com IPTG 0,5 mM e indução com IPTG 1,0 mM, respectivamente. 4 a 6: Temperatura de expressão a 37 °C, controle não induzido, indução com IPTG 0,5 mM e indução com IPTG 1,0 mM, respectivamente.

Analisando-se os géis de eletroforese dos extratos dessas bactérias também não observamos a indução da expressão da proteína-alvo. Dado que proteínas mais complexas podem requerer chaperonas para a sua correta expressão e enovelamento, então optamos por realizar testes também com a cepa Arctic Express. Essa linhagem bacteriana apresenta maior capacidade de expressão devido a presença das chaperonas Cpn10 e Cpn60, que facilitam o correto enovelamento de proteínas recombinantes, bem como proporcionam maior rendimento de proteínas solúveis (Agilent.com). Essa cepa bacteriana é adequada para cultivos em baixas temperaturas, e com isso realizamos testes de expressão a 12°C, por 16 horas, com uso de meio LB, e indução com IPTG na concentração final de 1 mM (**Figura 33**).

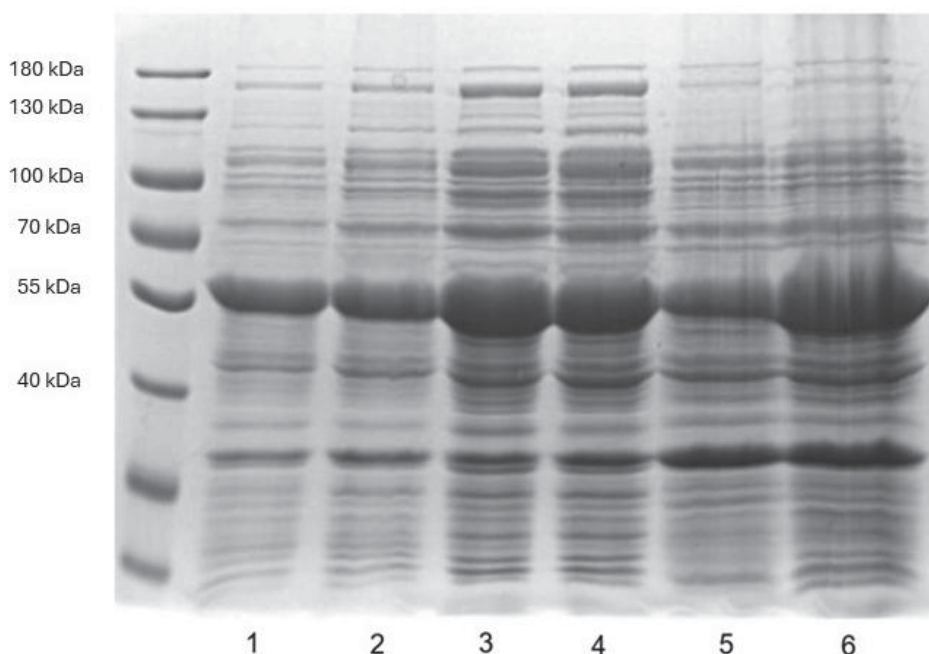


Figura 33. Expressão de TgPDK em *E. coli* cepa Arctic Express. Expressão conduzida a 12°C, por 16 horas. 1) Extrato total não induzido 2) Extrato total induzido. 3) Extrato Solúvel não induzido. 4) Extrato Solúvel induzido. 5) Extrato insolúvel não induzido. 6) Extrato insolúvel induzido. Induções realizadas com a adição de 1 mM de IPTG ao meio LB. Marcador de peso molecular Page Ruler Protein Ladder (Thermo).

Da mesma forma que nos testes anteriores, não obtivemos a indução da expressão da proteína TgPDK com essa linhagem bacteriana, pois não observamos bandas diferenciais entre os testes de indução e o controle. Mesmo realizando-se *Western Blot* com anticorpo anti-his, nenhum indício da expressão da proteína recombinante foi detectado, confirmando o que foi observado pelos géis corados com Azul de Comassie (dados não mostrados).

5.8 Expressão da proteína TgBCKDK (sequência completa) em sistema procarioto

Obtivemos os melhores resultados de expressão de TgBCKDK com o uso da linhagem *E. coli* Nico21 (DE3), e indução a 20°C, por 16 horas. Nesse caso, foi observada a expressão de uma proteína próxima ao peso molecular esperado (~56 kDa) após a adição de IPTG (frações induzidas), mas com intensidade semelhante ao observado na fração sem IPTG, (fração não induzida) (**Figura 34, A**), caracterizando uma expressão basal dessa proteína mesmo na ausência do agente indutor. As análises por *Western Blot* confirmaram a presença da proteína-alvo em todas as frações analisadas (**Figura 34, B**).

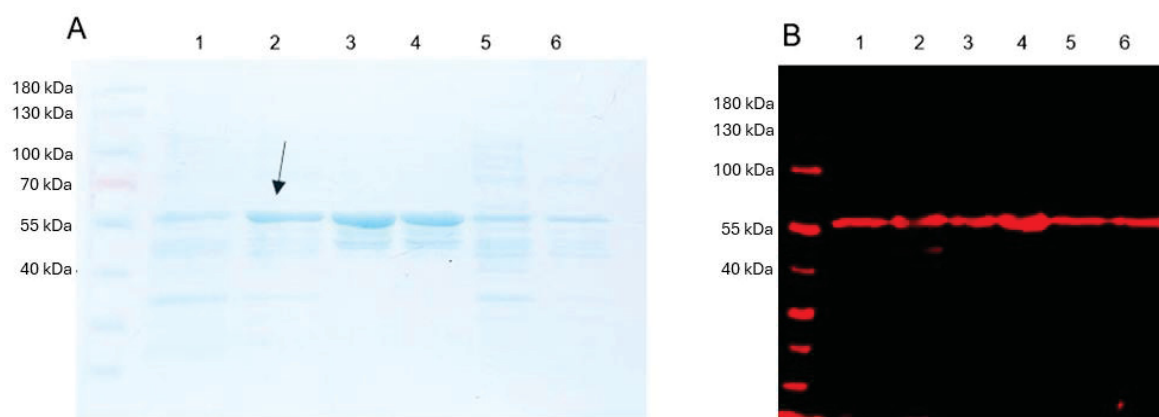


Figura 34. Expressão recombinante de TgBCKDK (~56kDa) em *E. coli* Nico21 a 20°C. **A.** Gel SDS-Page 10%, corado com Azul de Coomassie. 1) Extrato total, não induzido. 2) Extrato total, induzido. 3) Extrato solúvel, condição não induzido, purificado manualmente com resina de níquel-NTA. 4) Extrato solúvel, condição induzido, purificado manualmente com resina de níquel-NTA, 5) Extrato solúvel, condição não induzido. 6 – Extrato solúvel, condição induzido. **B.** Membrana de Western Blot, com marcação anti-His. 1) Extrato total não induzido. 2) Extrato total induzido. 3) Extrato solúvel, condição não induzido, purificado em bancada com resina de níquel-NTA. 4) Extrato solúvel, condição induzido, purificado manualmente com resina de níquel-NTA, 5) Extrato solúvel, condição não induzido. 6) Extrato solúvel, condição induzido. Seta indica expressão da proteína recombinante. Marcador de peso molecular Page Ruler Protein Ladder (Thermo).

5.9 Cromatografia por afinidade em sistema de cromatografia Äkta

A partir da confirmação da expressão recombinante de TgBCKDK, utilizamos um volume maior de cultivo para as metodologias de cromatografia de afinidade por sistema Äkta (conforme metodologia reportada no item 4.5). Após as etapas de cromatografia verificamos a presença de bandas adicionais nas diferentes frações

coletadas (**Figura 35**), o que poderia ser indicativo de degradação da proteína recombinante.

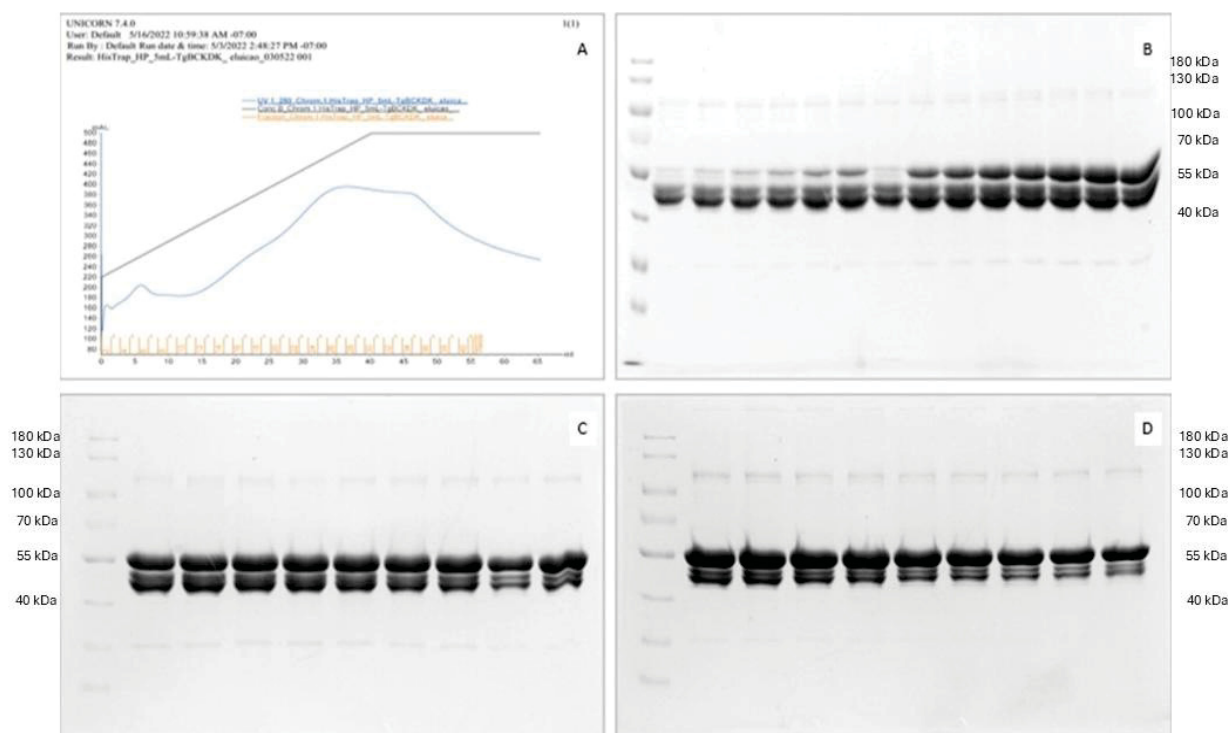


Figura 35. Purificação de TgBCKDK com o sistema de afinidade Äkta. A. Dados de absorvância das diferentes frações. B. Frações B10 a B23. C. Frações B24 a B32. D. Frações B33 a B41. A primeira coluna dos géis de eletroforese (B, C e D), refere-se ao marcador de peso molecular Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo).

Determinadas construções proteicas, quando expressas de forma recombinante, podem apresentar baixa estabilidade, degradação e precipitação (BOIVIN; KOZAK; MEIJERS, 2013). Essas condições podem ser derivadas da presença de sítios de clivagem ou regiões desestruturadas, que levam a um menor nível de estabilidade estrutural (TARCZEWSKA; GREB-MARKIEWICZ, 2019). Dessa forma, a presença das bandas adicionais verificadas a partir da cromatografia poderia estar relacionada à algumas dessas condições e, para uma melhor purificação, selecionamos algumas frações para as metodologias de cromatografia de exclusão de tamanho e cromatografia de troca iônica.

5.10 Cromatografia por exclusão de tamanho e troca iônica

As metodologias de cromatografia por exclusão de tamanho podem auxiliar na purificação de biomoléculas de diferentes pesos moleculares, para a obtenção de frações mais purificadas, e preservando as suas funções biológicas e enzimáticas (HALL, 2018). Conforme metodologia reportada no item 4.9, utilizamos a fração B27 como amostra para essa técnica. Conforme observado na **Figura 36**, não foi possível obter frações enriquecidas contendo somente a proteína recombinante em seu tamanho esperado. Entretanto, observamos a presença de bandas adicionais ainda persistentes nas amostras analisadas, o que também pode ser relacionado a aspectos estruturais inerentes à essa proteína recombinante.

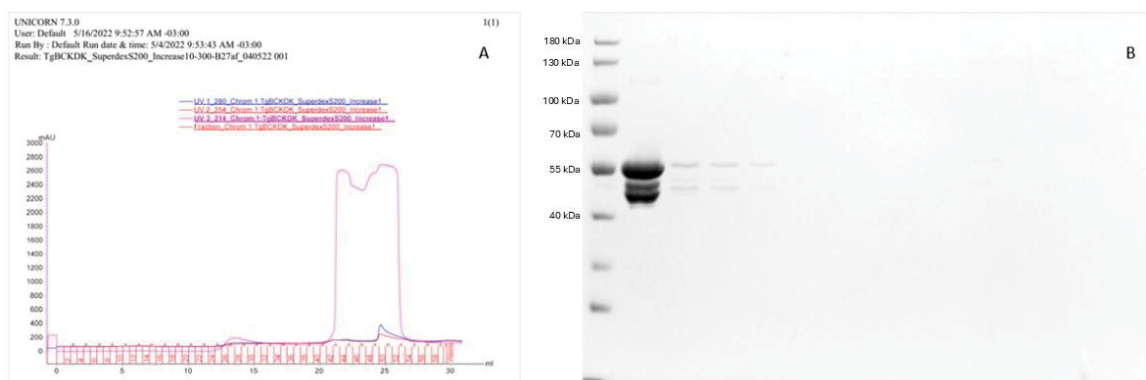


Figura 36. Purificação por Cromatografia de exclusão de tamanho de TgBCKDK. **A.** Dados de absorbância das diferentes frações. **B.** Gel de SDS-Page (10%), corado com Azul de Comassie. Coluna 1: marcador de peso molecular Page Ruler. Coluna 2: Amostra da fração B27 utilizada no experimento (controle). Colunas 3 a 10: Análise das frações coletadas a partir da cromatografia de exclusão de tamanho.

Com o objetivo de superar os obstáculos observados na purificação de TgBCKDK (tanto na purificação por afinidade, quanto por exclusão de tamanho), selecionamos algumas frações para metodologia de cromatografia de troca iônica. Essa técnica se baseia nas cargas da superfície da proteína e que podem interagir com resinas cromatográficas de cargas complementares. A partir disso, as proteínas podem ser separadas de possíveis contaminantes através de suas interações entre a fase estacionária (coluna cromatográfica) e a fase móvel (que pode ser composta por uma solução salina, em gradiente, que compete com os sítios que interagem das proteínas e a fase estacionária), permitindo a obtenção de frações mais purificadas (CUMMINS; ROCHFORT; O'CONNOR, 2017).

Mesmo com o uso dessa técnica, não conseguimos alcançar a purificação dessa proteína recombinante, sendo possível observar um sinal muito fraco da proteína-alvo seguido de bandas adicionais em algumas frações (**Figura 37, B, setas**).

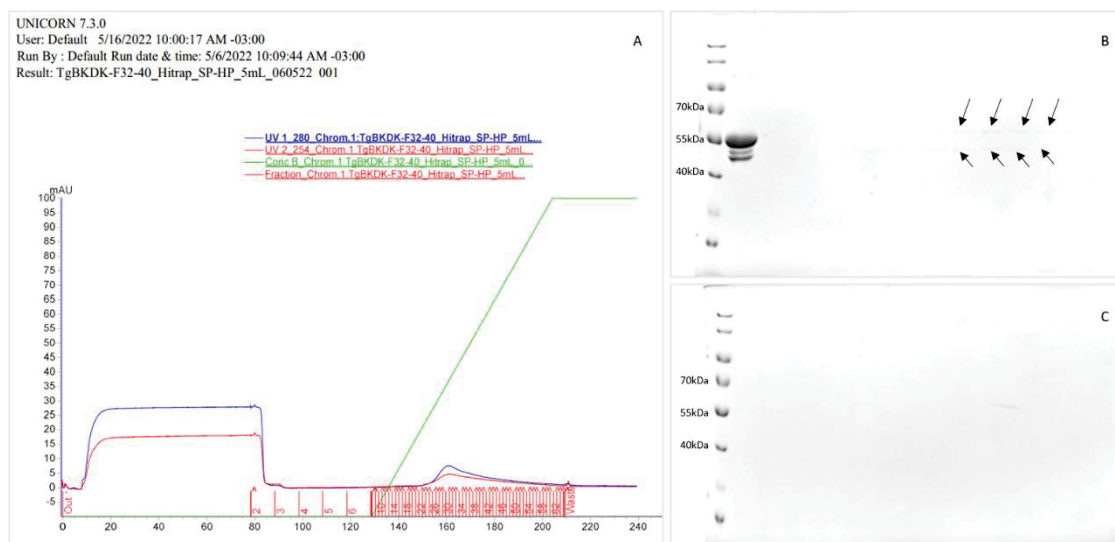


Figura 37. Purificação por Troca Iônica de TgBCKDK. A. Dados de absorvância das diferentes frações. **B e C.** Géis SDS-Page (10%), corados com Azul de Comassie. **B.** 1: marcador de peso molecular Page Ruler. 2: Amostra pré-coluna das frações B32 a B40 utilizadas no experimento. Setas indicam uma presença muito fraca de proteínas, mas ainda contendo as 02 bandas adicionais. **C.** 1: Marcador de peso molecular Page Ruler Protein Ladder (Thermo). Demais poços correspondem a amostras das diferentes frações coletadas.

Proteínas recombinantes podem ser sensíveis às concentrações de sais presentes em tampões de purificação, afetando a sua estabilidade, conformação e até mesmo levando à precipitação em algumas situações (MAITY; BAIDYA; REDDY, 2022). Possivelmente, os resultados observados estejam relacionados à essas condições reportadas na literatura, onde o tampão inicial da corrida cromatográfica é de baixa concentração salina (50 mM de cloreto de sódio), podendo ter levado a proteína à precipitação dentro da coluna do equipamento, impedindo a sua separação, mesmo com o uso de um gradiente salino que a atingir 1 molar de cloreto de sódio ao final da corrida cromatográfica.

5.11 Diálise das proteínas

As frações obtidas pela cromatografia de afinidade geralmente apresentam altas concentrações de imidazol, que podem chegar até 500 mM. A presença de imidazol em proteínas eluídas pode interferir em suas atividades bioquímicas (GORT; MALOY, 1998), dessa forma é recomendado o uso de metodologia de diálise para a redução da concentração desse soluto nas amostras a serem utilizadas em testes bioquímicos.

Para a diálise de proteínas, geralmente é utilizado uma membrana semipermeável capaz de permitir a difusão de pequenos solutos, porém prevenindo que grandes moléculas sejam carregadas, permitindo a redução das concentrações de sais ou outros solutos presentes nas amostras de interesse (SMITH, 2010).

Entretanto, do mesmo modo que o observado nos resultados anteriores, o uso de condições de diálise, tanto para remover o imidazol, quanto para reduzir a concentração de cloreto de sódio das frações, resultou na imediata precipitação das proteínas, após poucos segundos, formando um precipitado visível dentro da membrana de diálise. Esse resultado, juntamente com o que observamos na metodologia de purificação por troca iônica, nos leva a concluir que essa proteína é muito instável em solução com baixa concentração de sais, requerendo sempre a presença constante de tampões com alta carga salina. Ou ainda, a intrínseca tendência a formação dímeros nessa família de proteínas quinases (ANWAR et al., 2021), podem levar a uma agregação desordenada em condições de baixo sal, levando a proteína à precipitação.

5.12 Modelagens *in silico* de TgBCKDK e TgPDK

Devido à ausência de expressão de TgPDK e degradação de TgBCKDK que inviabilizou a purificação das proteínas recombinantes, tentamos buscar compreender melhor a estrutura conformacional dessas enzimas, buscando por sítios com alta instabilidade ou sujeitos à clivagem, que poderiam estar comprometendo as etapas de expressão e de purificação de ambas as enzimas.

Atualmente diferentes ferramentas de inteligência artificial já estão disponíveis para a modelagem *in silico* de proteínas como o *AlphaFold*, que realiza a predição conformacional de proteínas de interesse a partir de dados já validados, depositados em outros dados de dados (GOMES; GOMES; BERNARDI, 2022). Essa ferramenta também pode ser útil para a busca de regiões desestruturadas e que podem conter sítios de clivagem ou processamento. Na estrutura tridimensional reportada pelo *AlphaFold*, as regiões possivelmente desestruturadas são reportadas como regiões de baixa confiança (*low confidence regions*), mas que podem ser sobrepostas com sucesso usando estruturas já conhecidas para confirmação dessa predição (RUFF; PAPPU, 2021).

Dessa forma, submetemos a sequência completa de aminoácidos referentes às proteínas TgBCKDK e TgPDK à análise pela ferramenta AlphaFold, tendo como resultados os dados reportados na **Figura 38**.

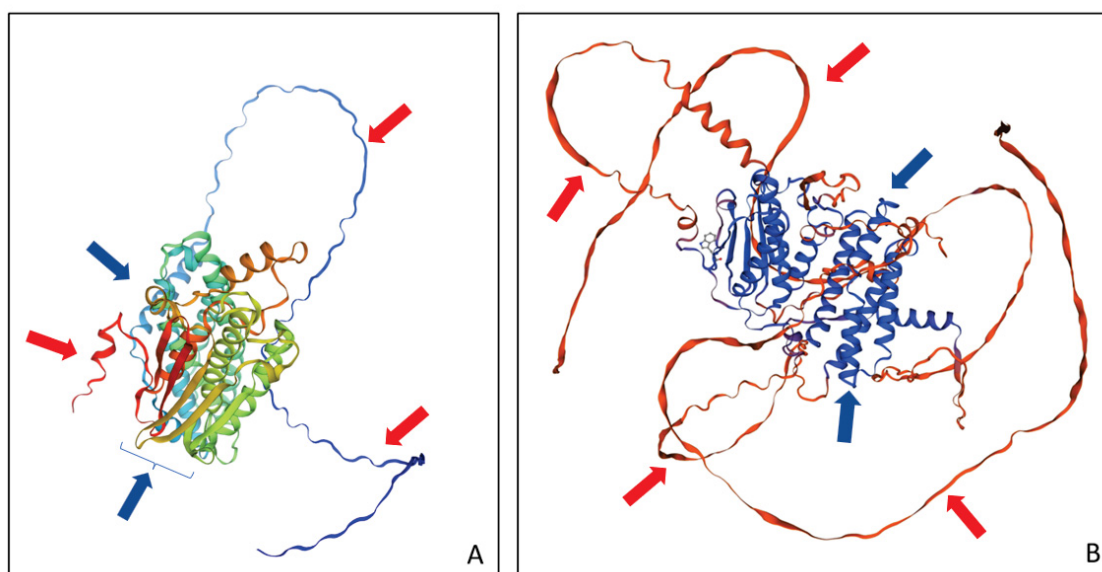


Figura 38. Modelagens *in silico* das proteínas TgBCKDK e TgPDK com o uso da plataforma AlphaFold. A e B: Proteínas TgBCKDK e TgPDK, respectivamente. É possível observar uma região mais estruturada na parte central da proteína (setas azuis), e a presença de regiões desestruturadas nas regiões N e C-terminal de cada proteína (setas vermelhas).

Com os dados de modelagem, foi possível observar extensas regiões desestruturadas em ambas as proteínas, tanto das regiões N- como C-terminal, porém como uma proeminência maior dessas regiões verificada junto à proteína TgPDK.

Entretanto, dados de modelagem *in silico* não devem ser avaliados isoladamente, sendo importante a busca de informações também em outras bases de dados.

Além dos dados fornecidos pelo *Alphafold*, realizamos modelagem tridimensional com o uso da plataforma Swiss-Model, com a simulação tanto das conformações relacionadas à monômeros, quanto na forma de dímeros (estrutura conformacional mais característica desse grupo de proteínas) (ANWAR et al., 2021) e observação das estruturas pelo software Chimera (versão 1.17.3), (Figuras 39 e 40).

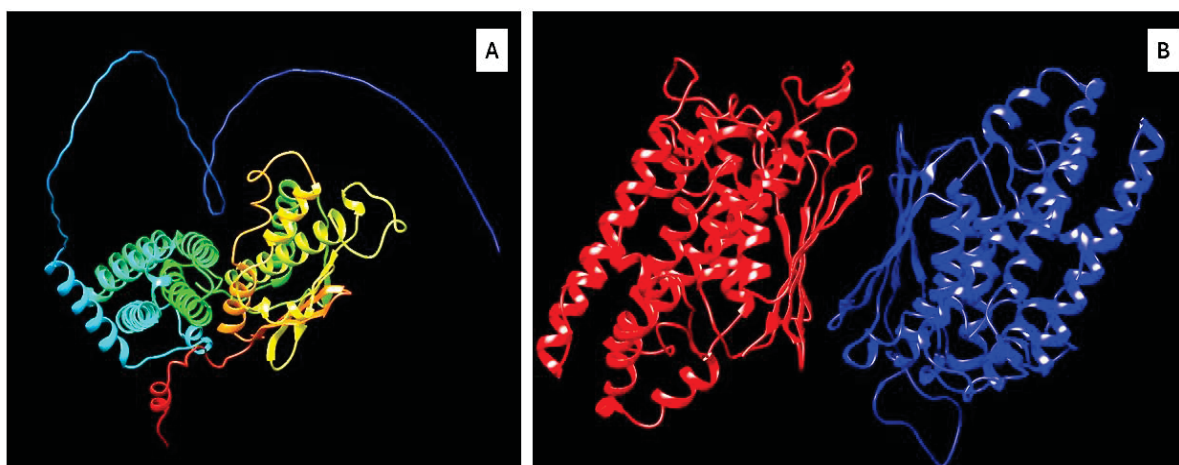


Figura 39. Projeção conformacional *in silico* para a enzima TgBCKDK (sequência completa) pela plataforma Swiss-Model. A e B: Estrutura na forma de monômero e dímero, respectivamente.

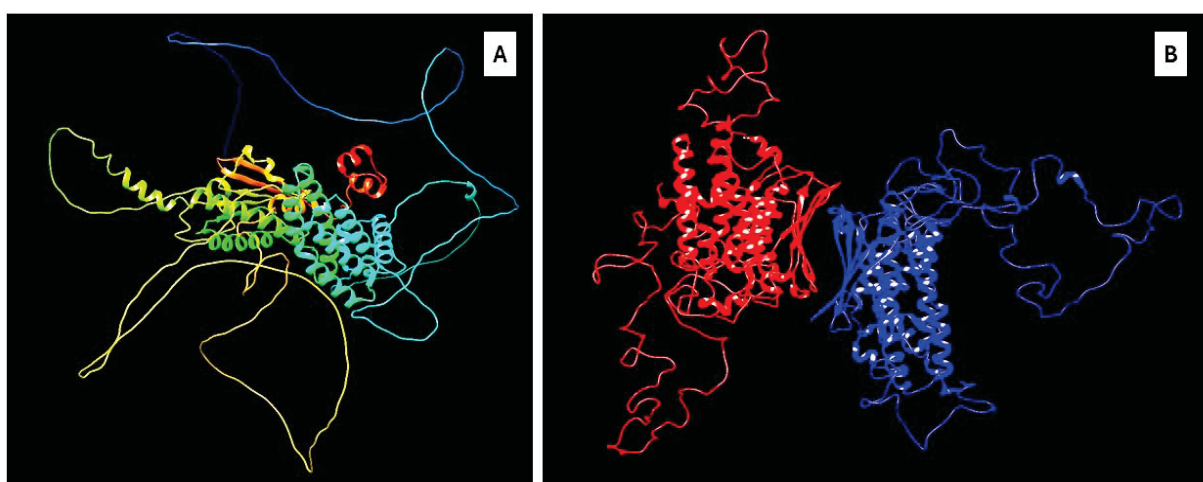


Figura 40. Projeção conformacional *in silico* para a enzima TgPDK (sequência completa) pela plataforma Swiss-Model. A e B: Estrutura na forma de monômero e dímero, respectivamente.

Os dados obtidos pela plataforma Swiss-Model também confirmaram a presença de regiões desestruturadas em ambas as proteínas, estando em concordância com os dados prévios já obtidos com a plataforma AlphaFold.

Além das análises estruturais, realizamos a busca pelas regiões de domínios de ambas as enzimas com o uso da ferramenta *Interpro*. Essa ferramenta *online Interpro* combina informações de 13 bancos de dados e permite a busca em relação aos sítios conservados e das regiões funcionais presentes em proteínas de interesse (PAYSAN-LAFOSSE *et al.*, 2023). Dessa forma, realizamos a submissão da sequência de resíduos referentes à ambas as enzimas à essa plataforma (**Figuras 41 e 42**).

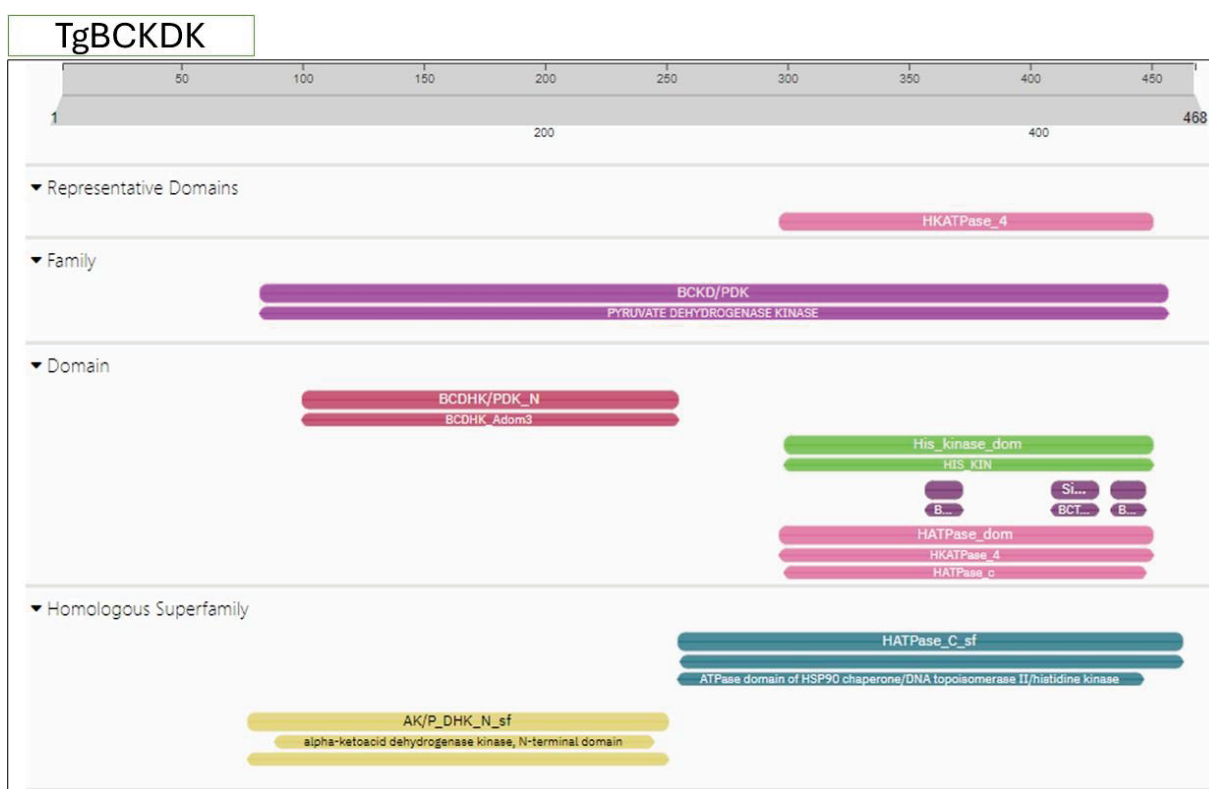


Figura 41. Regiões de domínios da sequência completa de TgBCKDK. Os retângulos coloridos representam as regiões de domínios da proteína de interesse. Dados obtidos com o uso da plataforma online Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

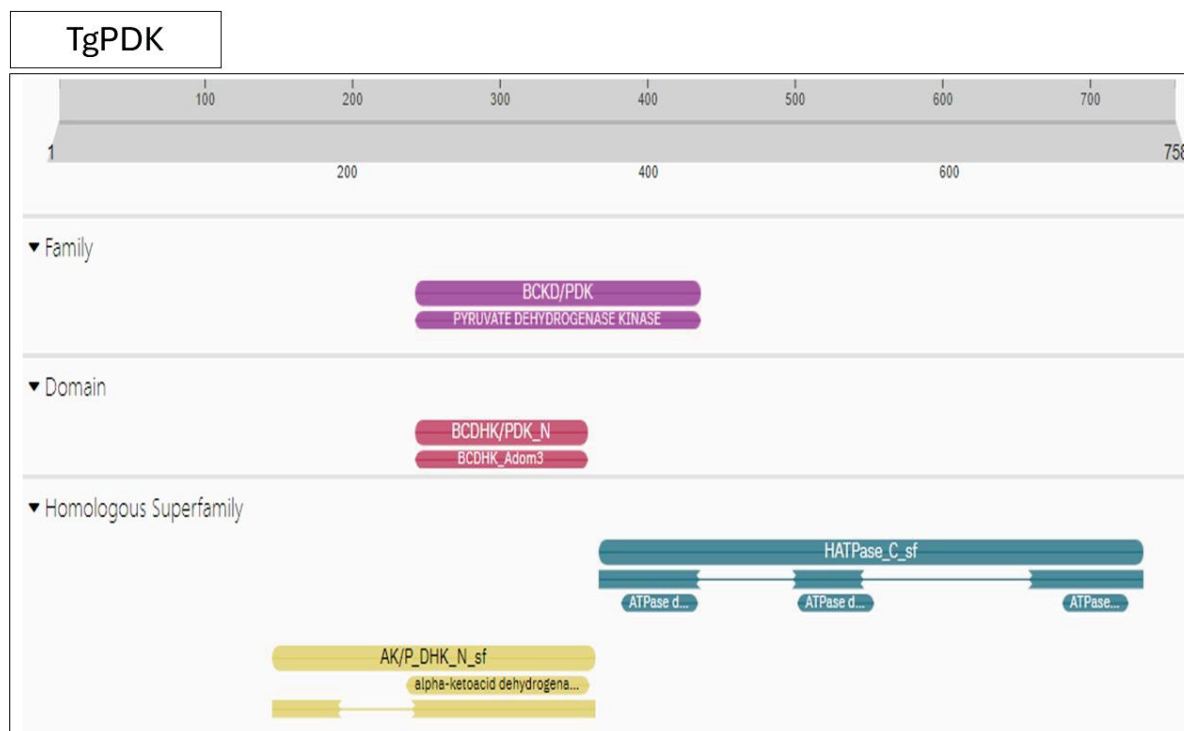


Figura 42. Regiões de domínios da sequência completa de TgPDK. Os retângulos coloridos representam as regiões de domínios da proteína de interesse. Dados obtidos com o uso da plataforma online Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

A partir dos dados obtidos com o uso dessa ferramenta, foi possível observar a organização típica em ambas as enzimas, constituída pelos domínios BCDHK_Adom (descrito como região regulatória) e região ATPase (responsável pela clivagem do ATP), estrutura que é típica para as quinases do grupo PDHK (THELEN; MIERNYK; RANDALL, 2000). Dessa forma, foi possível a elaboração das novas estratégias de clonagem, para a expressão de proteínas recombinantes contendo apenas as regiões de domínios.

5.13 PCR e clonagem das sequências estáveis de TgBCKDK e TgPDK em vetores do sistema Gateway

A partir dos dados obtidos com as análises a nível de domínios e estrutura tridimensional, procedemos então a clonagem das regiões mais estáveis de cada proteína, mantendo-se as regiões dos domínios, com o intuito de se obter proteínas com atividade catalítica preservada e mais estáveis às metodologias de expressão e purificação.

Para se alcançar esses objetivos, oligonucleotídeos foram sintetizadas e utilizados para a clonagem das regiões de interesse (conforme metodologia reportada no item 4.14). Tivemos sucesso tanto na amplificação das regiões interesse, quanto nas etapas de recombinação *Gateway*, com a construção do vetor de entrada pDNOR-221, quanto do vetor de destino pDEST-17, como pode ser observação na **Figura 43**.

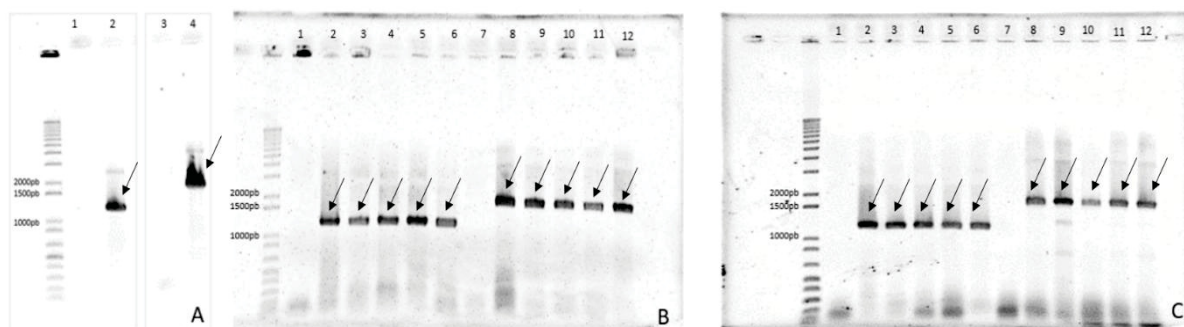


Figura 43. PCRs de confirmação de amplificação das regiões-alvo de TgBCKDK e TgPDK. A. 1 e 3: Controles negativos. 2 e 4: Amplificação de TgBCKDK e TgPDK, respectivamente, com os primers Gateway. B. Confirmação dos clones positivos para em Top10, contendo vetores pDNOR 221 para TgBCKDK e TgPDK. B: 1 e 7 – controles negativos. B2 e B8: controle positivo: amplificação das regiões originais contidas nos vetores sintéticos. B3 a B6 e B9 a B12, teste de 04 colônias para TgBCKDK e TgPDK. C. Confirmação dos clones positivos para em Top10, contendo vetores pDEST17 para TgBCKDK e TgPDK. C: 1 e 7 – controles negativos. C2 e C8: controle positivo: amplificação das regiões originais contidas nos vetores sintéticos, para TgBCKDK e TgPDK, respectivamente. C3 a C6 e C9 a C12, teste de 04 colônias para TgBCKDK e TgPDK, respectivamente. Setas indicam a amplificação das regiões de interesse, confirmando o sucesso das técnicas.

Os produtos de amplificação gerados são condizentes com os valores esperados para a amplificação de TgBCKDK (1.232 pb) e TgPDK (1.843 pb), com o uso desses oligonucleotídeos.

5.14 Transformação bacteriana e expressão da região de domínios de TgBCKDK e TgPDK

Para a expressão das novas construções utilizamos *E. coli* plysS (DE3), essa cepa tem a capacidade de um controle maior na redução da expressão basal de proteínas recombinantes, bem como é recomendada para a expressão de proteínas potencialmente tóxicas (Thermo). Essas cepas foram transformadas e as colônias foram confirmadas por PCR. Ao realizarmos as etapas de expressão tradicional, utilizando meio LB e indução por IPTG (1 mM), foi observada uma baixa expressão para ambas as proteínas, além de novamente a presença de expressão basal em

relação à proteína TgBCKDK (~47 kDa), mesmo na ausência de agente indutor nas condições controle.

Devido a esses resultados, passamos a buscar métodos alternativos de expressão, para uma possível repressão da expressão basal e, possivelmente em prol de uma otimização do rendimento total das proteínas de interesse. Dessa forma, realizamos testes comparativos envolvendo a expressão tradicional utilizando IPTG, em comparação com meios de cultura autoinduzidos, como proposto por Studier (2005), contendo diferentes proporções de glicose (agente repressor) e lactose (agente indutor), conforme metodologia detalhada reportada no item 4.16.

Em relação à expressão da região de domínios da enzima TgBCKDK, verificamos a expressão tanto nas condições controle (não-induzida) e induzida (IPTG), sendo que com o uso de glicose 0,1% parte da expressão basal passou a ser reprimida, e desaparecendo totalmente nas concentrações mais altas de glicose. O uso de lactose promoveu a expressão da proteína de interesse em níveis superiores ao observado na condição com IPTG (**Figura 44, A**). Isso indica que o uso de meio autoinduzido pode ser uma alternativa a ser utilizada com essa proteína, aumentando o seu rendimento, e possivelmente resultando em proteínas mais estáveis e solúveis. Porém, o mesmo não ocorreu para TgPDK (~68 kDa) (**Figura 44, B**), onde não foi verificada a presença de expressão basal na condição controle (não-induzida, poço 1). As condições com lactose promoveram um aumento na expressão total da proteína de interesse, no entanto, foram observadas degradações ou versões truncadas da enzima. Dessa forma, para a proteína TgPDK passamos a manter a expressão tradicional, que envolve o uso de IPTG como agente indutor.

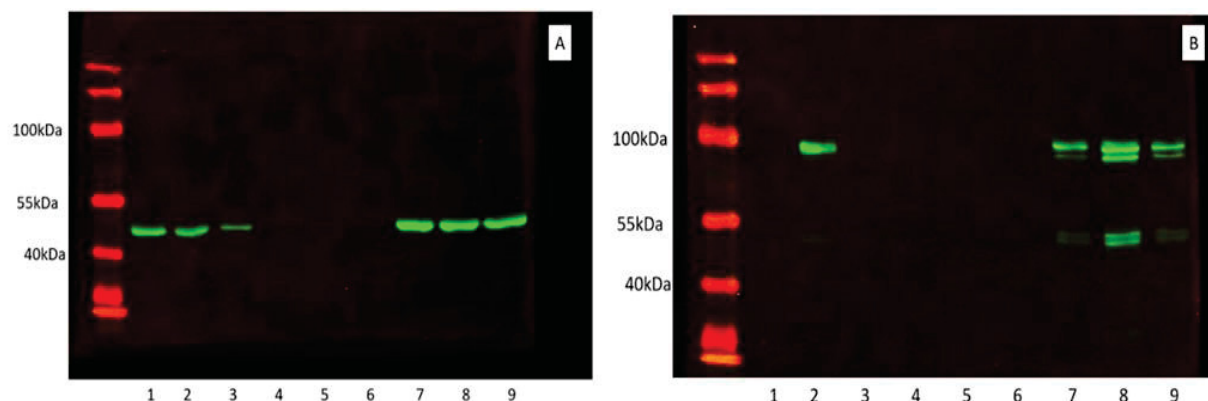


Figura 44. Expressão das novas construções de TgBCKDK e TgPDK. A. Expressão de TgBCKDK. B. Expressão de TgPDK. Condições: 1 (controle); 2: indução por IPTG (1 mM); 3: glicose 0,1%; 4: glicose 0,3%; 5: glicose 0,5%; 6: glicose 1%; 7 a 9: glicose 0,1% com lactose 0,2, 0,4 ou 0,6%, respectivamente. Todos as condições utilizando somente a fração solúvel.

5.15 Etapas de purificação de TgBCKDK (versão truncada)

Como pode ser observado na **Figura 45**, foi possível estabelecer um protocolo adequado para a purificação manual (sem uso do cromatógrafo ÄKTA) da proteína TgBCKDK, utilizando-se a expressão com meio autoinduzido (contendo glicose 0,1% e lactose 0,2%) (STUDIER, 2005). O uso do protocolo de purificação manual foi eficiente para atingir a pureza da proteína a partir da eluição com concentração igual ou maior a 200 mM de imidazol.

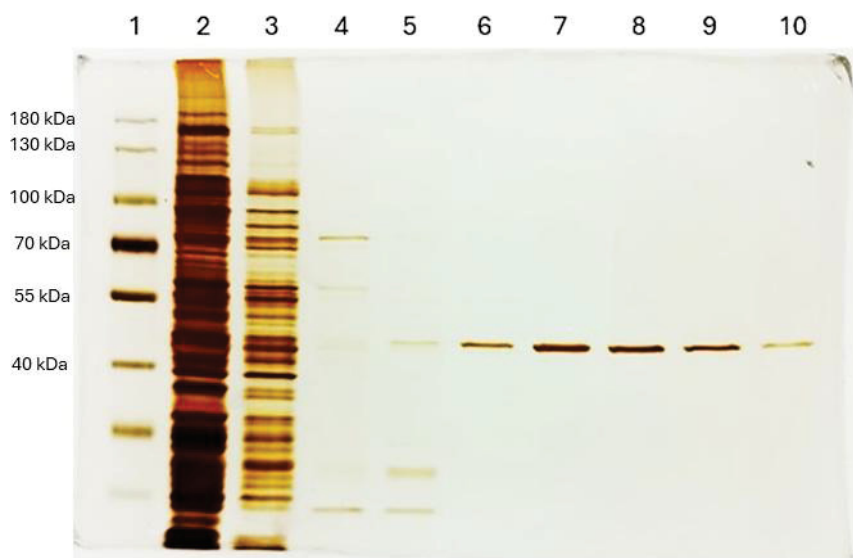


Figura 45. Purificação de bancada para a proteína TgBCKDK (~47 kDa). Gel SDS-PAGE (10%), corado por solução de prata. 1. Marcador de peso molecular Page Ruler Protein Ladder (Thermo). 2. Flow-through. 3 a 10. Solução de tampão contendo 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH, contendo diferentes concentrações de imidazol: 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 400 mM, respectivamente.

A partir das condições estabelecidas manualmente, testamos o escalonamento tanto da expressão quanto da purificação com o uso de sistema Äkta. Entretanto, como pode ser visualizado na **Figura 46**, o uso desse sistema automatizado não foi eficiente devido à presença persistente de proteínas contaminantes, inviabilizando o uso desse método de purificação para a obtenção de frações purificadas contendo a proteína de interesse para o uso em testes bioquímicos.

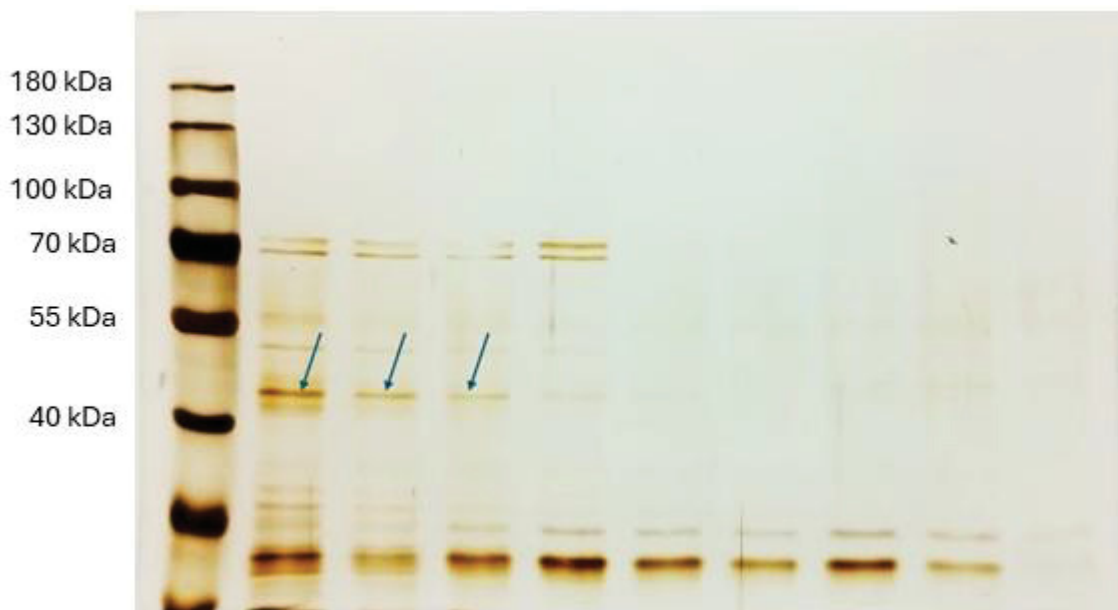


Figura 46. Purificação por sistema de cromatografia Äkta de TgBCKDK. Gel SDS-Page 10%, corado com solução de prata. Proteína-alvo sendo eluída com muitos contaminantes. Setas indicam a proteína-alvo. Marcador de peso molecular Page Ruler Protein Ladder (Thermo).

Dessa forma, a purificação manual, apesar de ser metodologicamente mais trabalhosa, foi a melhor estratégia capaz de produzir proteína purificada o suficiente para o desenvolvimento dos ensaios bioquímicos. De acordo com a literatura, a presença de proteínas contaminantes é um problema constante na purificação desse grupo de proteínas (ZHANG, WEN et al., 2018). Quanto ao protocolo de purificação da BCKDK recombinante, observou-se que a proteína truncada pode ser expressa e purificada de forma solúvel e estável, o que contrasta com os resultados obtidos anteriormente para a proteína em sua sequência completa, que, embora expressa na fração solúvel, se apresentava de forma muito instável, gerando degradações durante os processos de purificação.

5.16 Etapas de purificação de TgPDK (versão truncada)

De modo semelhante ao realizado para a proteína TgBCKDK, realizamos purificação manual (de bancada) e por sistema de cromatografia Äkta para a proteína TgPDK. Entretanto, mesmo com o uso de diferentes estratégias, a purificação dessa proteína não foi possível (**Figuras 47 e 48**).

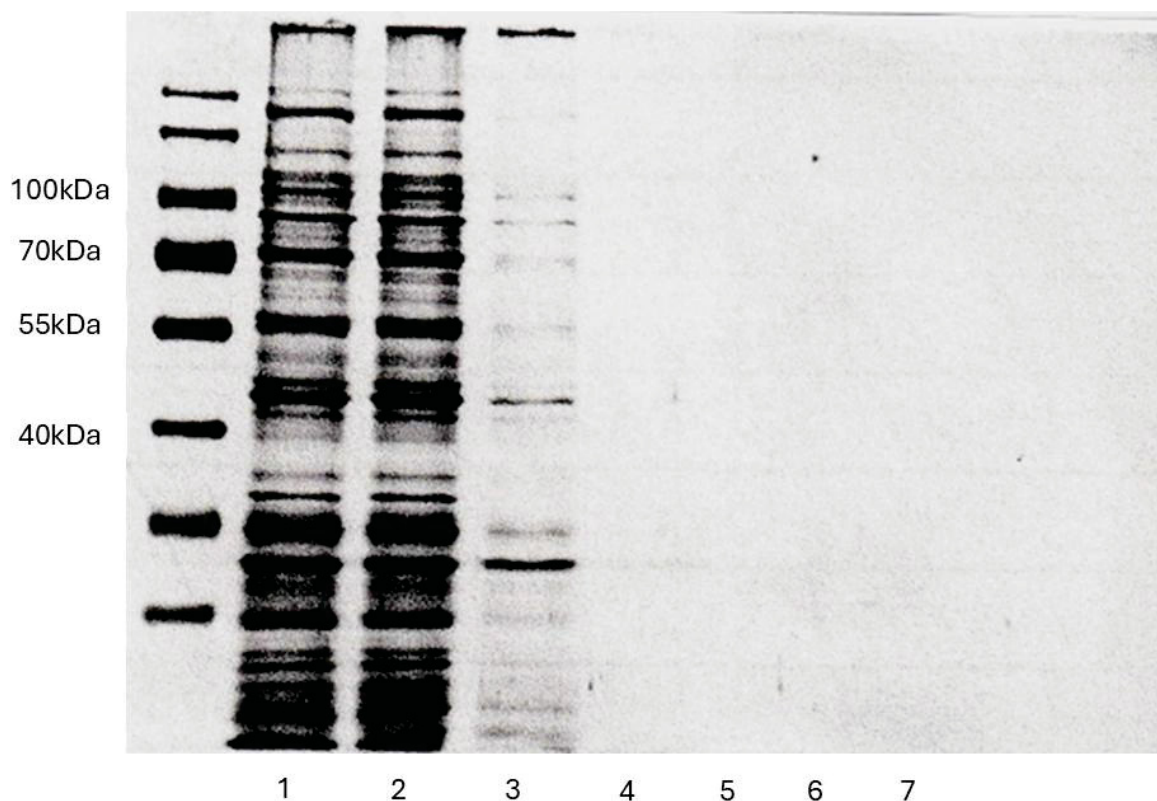


Figura 47. Purificação de bancada para a proteína PDK (~68 kDa). Gel SDS-PAGE (10%), corado por solução de prata. 1. Flow-through. 2 a 7. Solução de tampão contendo 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH, contendo diferentes concentrações de imidazol: 30, 50, 100, 150, 200 e 250 mM, respectivamente. Marcador de peso molecular Page Ruler Protein Ladder (Thermo).

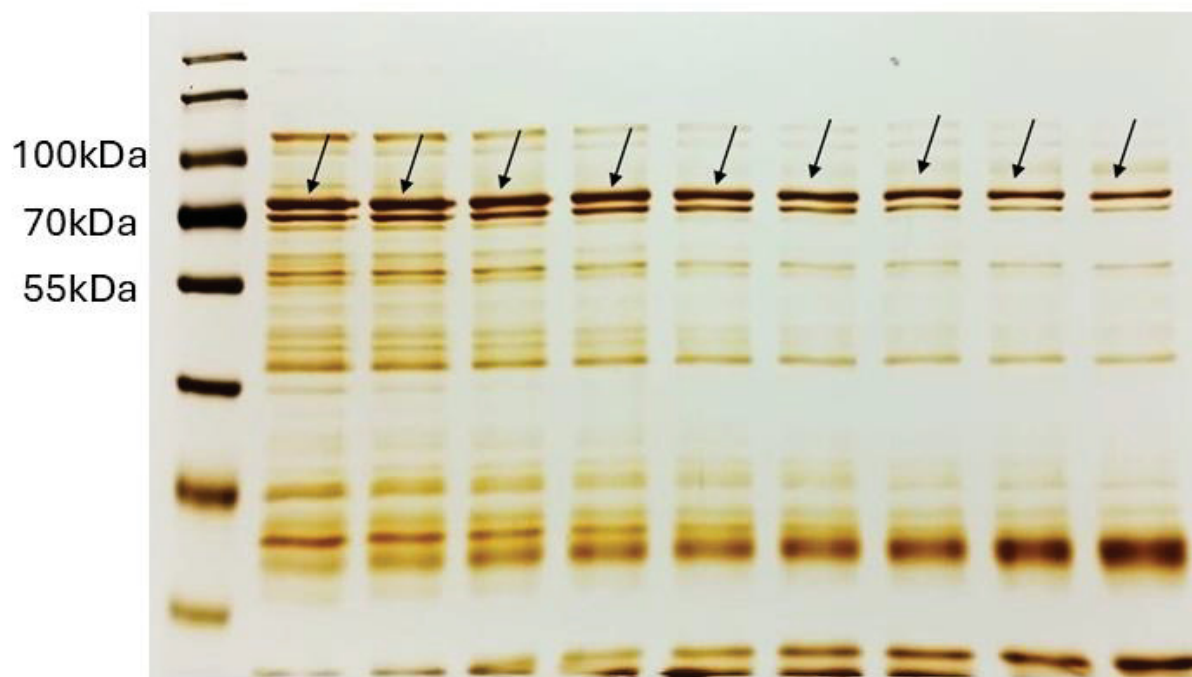


Figura 48. Purificação por sistema de cromatografia Äkta de TgPDK (~68 kDa). Gel SDS-Page 10%, corado com solução de prata. Proteína-alvo sendo eluída com muitos contaminantes. Setas indicam a proteína-alvo. Marcador de peso molecular Page Ruler Protein Ladder (Thermo).

Não foi possível estabelecer um protocolo adequado para a purificação dessa enzima, sendo que na purificação de bancada, essa proteína estava sendo eluída mesmo em baixas concentrações de imidazol, juntamente com os demais contaminantes presentes na amostra. Do mesmo modo, também foi observado a partir da cromatografia automatizada, utilizando o sistema Äkta. Esse dado também se relaciona com a literatura, dado que esse grupo de enzimas tende a se associar em dímeros (THELEN; MIERNYK; RANDALL, 2000), o que pode ter dificultado a sua purificação.

Com as sucessivas dificuldades na purificação dessa enzima, passamos a concentrar nossos esforços na proteína TgBCKDK, dado que a purificação já havia sido alcançada.

5.17 Ensaio de cinética enzimática para TgBCKDK

A partir da obtenção das frações purificadas de TgBCKDK, que foram previamente dializadas para a remoção do imidazol (conforme item 4.18), foi possível estabelecer testes enzimáticos com essa enzima.

Testamos previamente diferentes tempos de incubação da enzima frente ao substrato ATP e na presença de peptídeos, conforme metodologia do item 4.19, entretanto somente podemos aferir diferenças estatísticas após 06 horas de ensaio, conforme reportamos na **Figura 49**. Dados da literatura também indicam a necessidade de ensaios envolvendo várias horas de incubação para uma melhor verificação da atividade enzimática desse grupo de enzimas (ZHANG, WEN et al., 2018).

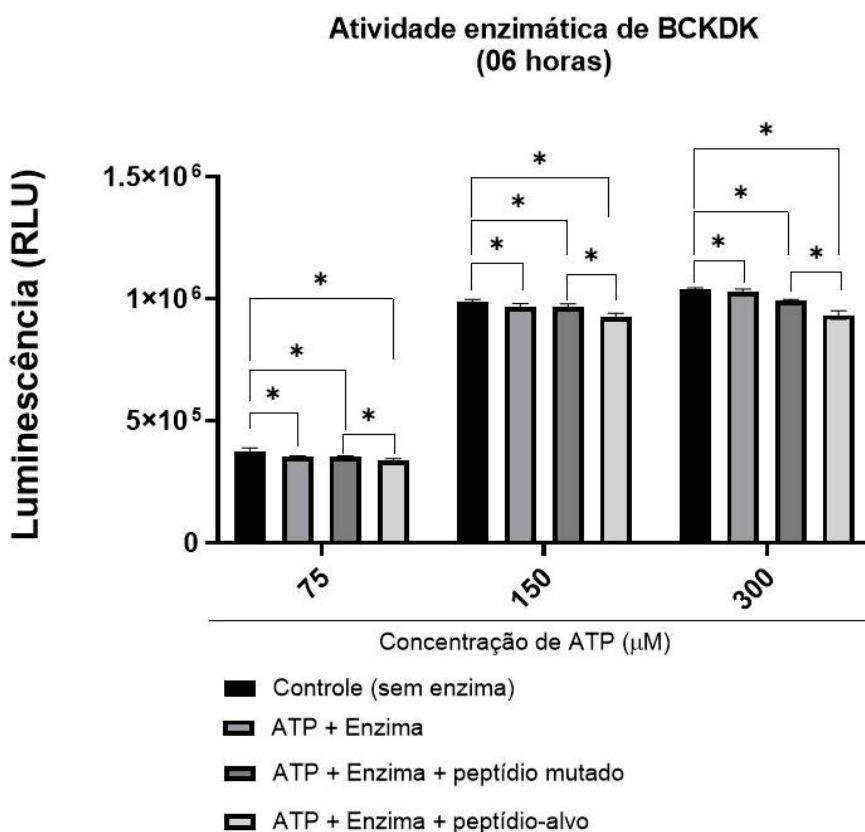


Figura 49. Ensaio de atividade cinética de TgBCKDK. Os asteriscos (*) indicam diferença estatística $p < 0,05$, através de teste de ANOVA, seguido por teste de Tukey.

Inicialmente, para os testes enzimáticos, utilizamos peptídeo-alvo relacionado à sequência de E1-alfa-01 (TYRVGHHSTSDDSFQYR) e como controle um peptídeo mutado no sítio de fosforilação relacionada à Ser-293 (TYRVGHHATSDDSFQYR). Esse sítio de serina é descrito como o principal sítio de fosforilação em outros modelos biológicos, onde mutações nesse sítio devem impedir ou reduzir a atividade de fosforilação das quinases sobre esse substrato-alvo (HUANG *et al.*, 2010).

Os ensaios de atividade enzimática indicam que a enzima apresenta atividade enzimática basal, mesmo na ausência de peptídeos, o que possivelmente se correlaciona com a capacidade intrínseca desse grupo de proteínas relacionada à autofosforilação (THELEN; MIERNYK; RANDALL, 2000).

A presença do peptídeo-alvo aumenta a atividade ATPase da enzima em relação às demais condições controle, o que inclui os testes com o peptídeo-mutado, reforçando a hipótese de que E1-alfa-01 é um alvo biológico provável para a atuação dessa enzima.

Apesar disso, a presença do peptídeo mutado também aumentou a atividade catalítica da enzima sobre o ATP, o que poderia estar relacionado à presença de algum sítio secundário de serina que também poderia ser fosforilado, ou ainda, apenas um aumento da atividade basal da enzima, de forma inespecífica, porém sem a transferência adequada do grupamento fosfato para uma região-alvo.

Nossos dados de filogenia indicaram a existência de uma possível nova subunidade E1-alfa para o complexo BCKDH, que denominamos E1-alfa-02. Essa proteína é reportada no banco de dados com a identificação TGME49_292100 (<https://toxodb.org/>). Dessa forma, realizamos novos testes de atividade enzimática utilizando um novo peptídeo sintético (peptídeo 02), relacionado à essa nova proteína (conforme metodologia do item 4.19) (**Figura 50**).

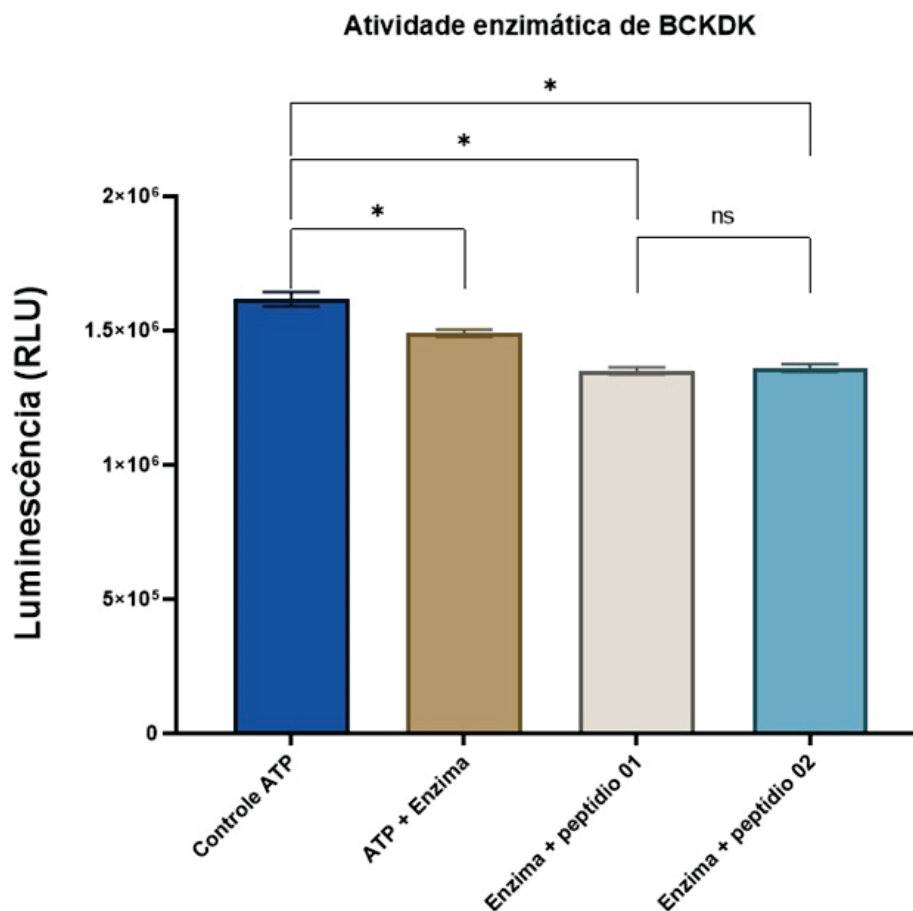


Figura 50. Ensaio enzimático com proteína TgBCKDK recombinante frente a peptídeos-alvo sintéticos. Concentração de ATP (150 μ M). Peptídeo 01: região de fosforilação de E1-alfa-01 do complexo BCKDH. Peptídeo 02: região de fosforilação de uma possível nova subunidade E1-alfa para o complexo BCKDH (E1-alfa-02). Asteriscos representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Nossos dados indicaram novamente atividade basal de TgBCKDK frente ao ATP, porém essa atividade é aumentada na presença de ambos os peptídeos sintéticos. A ausência de diferença estatística na atividade enzimática frente aos 02 peptídeos correspondentes ao sítio conservado de fosforilação de E1-lafa 01 e E1-alfa 02, sugere que é possível que a enzima TgBCKDK possa ter mais um alvo biológico no metabolismo de *Toxoplasma gondii*, relacionado à nova subunidade E1-alfa do complexo BCKDH que encontramos nas abordagens filogenéticas.

Ainda existe uma lacuna científica em relação a possível alvo biológico de DCA no metabolismo dos parasitos. Dados da literatura também especularam sobre a possibilidade da enzima TgBCKDK se constituir em um alvo biológico provável para

esse fármaco (FERRARINI *et al.*, 2021), porém sem a realização efetiva de testes enzimáticos.

Devido a isso, realizamos ensaios *in vitro* para verificar a possível inibição de TgBCKDK, na presença dos peptídeos-alvo, frente ao agente inibidor DCA, em diferentes concentrações. Os dados de atividade enzimática foram normalizados com o uso do software GraphPad Prism, para o cálculo do IC50 para cada condição, utilizando-se a equação de *Hill* para o cálculo da concentração inibitória de 50% frente à atividade ATPase basal da enzima (**Figura 51**).

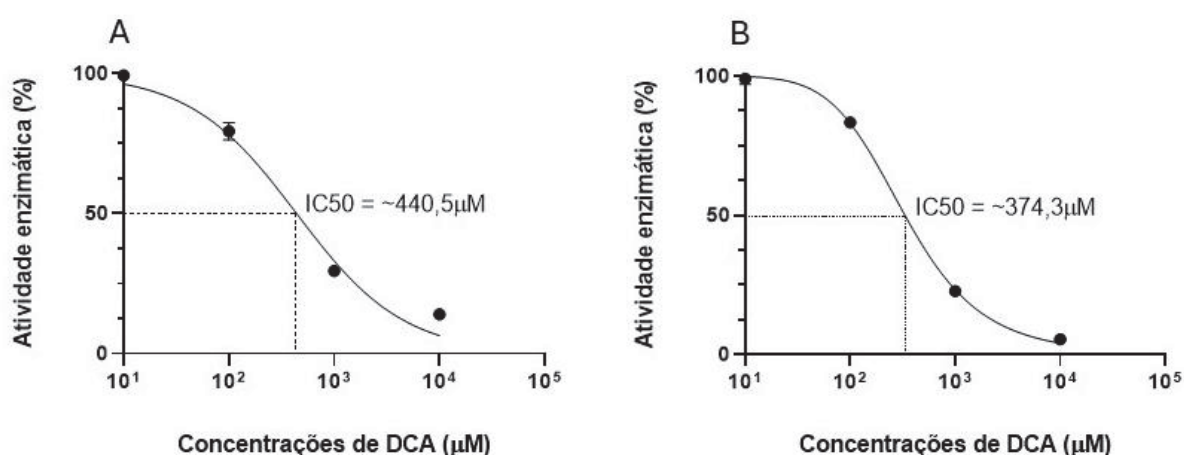


Figura 51. Atividade inibitória de DCA frente a quinase TgBCKDK. A e B: Condições utilizando-se os peptídeos-alvo 01 e 02, respectivamente.

Os resultados indicaram que DCA inibiu a atividade enzimática de TgBCKDK, com valores de IC50 relativamente próximos, entre 440,5 µM (na presença do peptídeo 01, relacionado à E1-alfa-01) e 374,3 µM (na presença do peptídeo 02, relacionado à E1-alfa-02).

Os dados nos permitiram também o cálculo da velocidade máxima de TgBCKDK frente a cada um dos peptídeos-alvo, assim como em relação às concentrações de DCA, possibilitando o cálculo do *Km aparente* da enzima em cada uma das condições testadas, através do uso do GraphPad Prism (**Quadro 1**).

Quadro 1. Dados enzimáticos de TgBCKDK frente aos peptídeos-alvo e na presença do inibidor DCA

	Condições	<i>Km</i> aparente (μM)	Velocidade ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
	controle (sem peptídeo)	233,3	0,073370
	DCA (μM)		
Peptídeo-alvo 01	0	210,1	0,134700
	10	538,17	0,070485
	100	702,57	0,056893
	1000	1.968,33	0,022898
	10000	3.782,66	0,012334
	DCA (μM)		
Peptídeo-alvo 02	0	182,7	0,129900
	10	416,34	0,076311
	100	646,48	0,054261
	1000	2.310,31	0,017566
	10000	10.066,96	0,004230

Nossos dados indicam que a presença dos peptídeos-alvo aumenta a velocidade enzimática de TgBCKDK, reduzindo o valor de *Km* em relação à condição controle. Por outro lado, a presença de DCA reduz a velocidade enzimática de forma dose-dependente, com o aumento do valor de *Km* conforme o aumento da concentração desse agente inibidor. O aumento de *Km* verificado geralmente está associado à inibição do tipo competitiva, dado que uma maior concentração de substrato (no caso ATP) poderia ser necessária para aumentar a atividade da enzima na presença dessa droga (ROBIN; REUVENI; URBACH, 2018). DCA se liga no sítio regulatório desse grupo de quinases, que é distinto do sítio ATPase. Entretanto, o bloqueio desse sítio promove alterações conformacionais em toda a enzima, alterando a afinidade do sítio ATPase, o que reduz significativamente a atuação enzimática (KLYUYEVA; TUGANOVA; POPOV, 2008).

5.18 Análises *in silico* dos sítios de interação de DCA frente à quinases BCKDK e PDK

A partir dos testes enzimáticos que indicaram que DCA inibe a atividade enzimática da quinase BCKDK, realizamos abordagens *in silico*, para evidenciar os sítios de interação dessa droga sobre ambas as quinases TgBCKDK e TgPDK de *T. gondii* (**Figura 52 e 53**). Utilizamos como referência os dados já depositados na plataforma PDB, onde constam os sítios de interação de DCA em relação à quinase PDK de humanos (<https://www.rcsb.org/structure/2Q8H>), e metodologia descrita anteriormente no item 4.13.

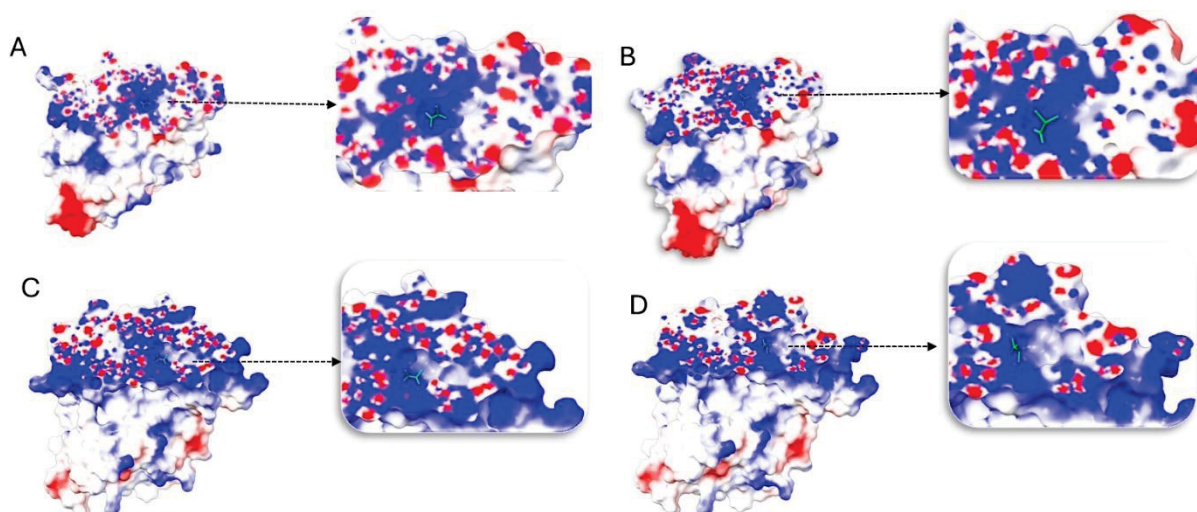


Figura 52. Docking molecular das quinases TgBCKDK e TgPDK frente a diferentes ligantes. A e B: Proteína TgBCKDK em relação ao ligantes piruvato e DCA, respectivamente. C e D: Proteína TgPDK em relação ao ligantes piruvato e DCA, respectivamente. Ligantes representados em verde. O modelo de nuvem eletrônica apresenta regiões com densidade eletrônica positiva em azul e negativa em vermelho. Regiões neutras hidrofóbicas são brancas.

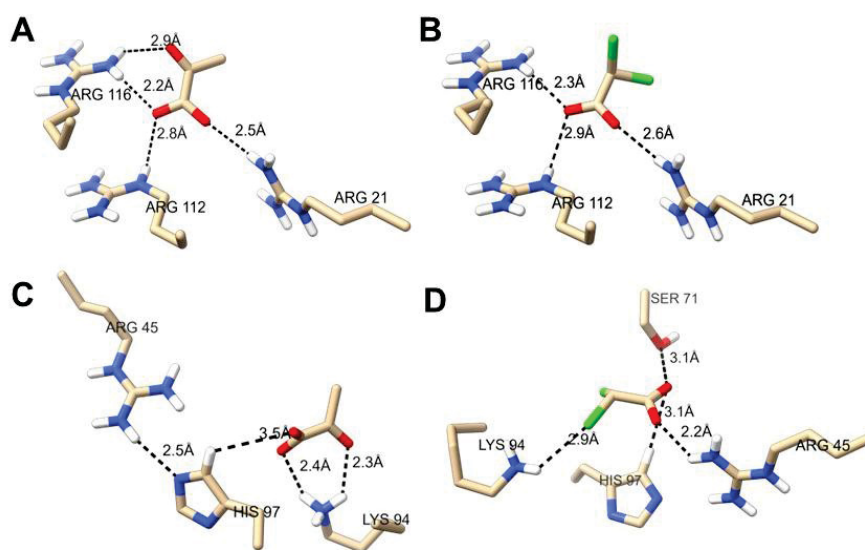


Figura 53. Sítios de interação entre diferentes ligantes e as quinases TgBCKDK e TgPDK. e B: Proteína TgBCKDK em relação ao ligantes piruvato e DCA, respectivamente. C e D: Proteína TgPDK em relação ao ligantes piruvato e DCA, respectivamente.

Para a quinase BCKDK, os resíduos de interação com DCA são semelhantes aos sítios de interação com piruvato, ocorrendo nos aminoácidos arginina 21, 112 e 116. As energias livres de ligação (ΔG), calculadas *in silico*, para a interação entre BCKDK e os ligantes piruvato e DCA foram idênticas, e estimadas em -3,9 kJ/mol, o que indica uma ligação termodinamicamente favorável.

Para PDK, ocorre interação de DCA junto aos sítios de lisina 94, histidina 97, arginina 45 (semelhante aos sítios de interação com piruvato), além da serina na posição 71. A partir das observações dos resultados *in silico*, é possível observar que DCA interage com os mesmos sítios de interação com piruvato. Do mesmo modo que o verificado *in silico* para BCKDK, as energias livres de ligação entre a quinase PDK e os ligantes DCA e piruvato foram de -4,3 e -4,6 kJ/mol, respectivamente, também indicando uma interação favorável entre essas moléculas e a enzima.

5.19 Ensaio de imunoprecipitação (IP) e análises de espectrometria de massas

As técnicas de imunoprecipitação, associadas a técnicas de espectrometria de massas, apresentam grande utilidade para o estudo de interações proteína-proteína

nos sistemas biológicos, permitindo a identificação de redes de interação entre diferentes proteínas, que podem atuar em diferentes vias metabólicas (LIN; ALI; LAI, 2024).

Realizamos ensaios de imunoprecipitação (IP) a partir de parasitos *T. gondii* cepa RH $\Delta h x g p r t \Delta k u 8 0$ (controle, sem etiqueta) e parasitas da mesma linhagem contendo etiqueta 3x.HA para as proteínas TgPDK e TgBCKDK (conforme metodologia descrita no item 3.17). O perfil proteico adquirido através da IP foi analisado por eletroforese em Gel SDS-PAGE 10%, seguido por *Western Blot* além de espectrometria de massas, **Figura 54**.

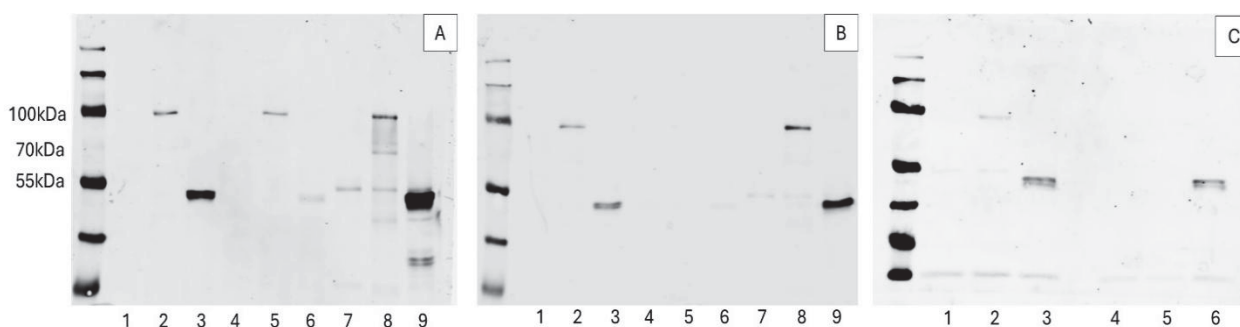


Figura 54. Imunoprecipitação (IP) dos complexos proteicos associadas a PDK e BCKDK no metabolismo dos parasitos e análise por *Western Blot*. A: IP utilizando-se tampão contendo 150 mM de cloreto de sódio (Tampão 01). B: IP utilizando-se tampão contendo 300 mM de cloreto de sódio (Tampão 02). O eixo de A e B representa as diferentes condições: 1, 2 e 3 – Fração solúvel dos parasitos (controle, PDK.HA e BCKDK.HA, respectivamente; 4, 5 e 6 – Fração não-ligada (*flow-through*) das condições controle, PDK.HA e BCKDH.HA, respectivamente; 7, 8 e 9 – Fração contendo os eluidos das condições controle, PDK.HA e BCKDH.HA, respectivamente. C: 1, 2 e 3 - IP utilizando-se tampão contendo 300 mM de cloreto de sódio (Tampão 02) da fração solúvel dos extratos controle, PDK.HA e BCKDK.HA, respectivamente; 4, 5, 6 - IP utilizando-se tampão contendo 400 mM de cloreto de sódio (Tampão 03) da fração solúvel dos extratos controle, PDK.HA e BCKDK.HA, respectivamente. Marcador de peso molecular Page Ruler Protein Ladder (Thermo).

Obtivemos sucesso com o uso dos tampões para a imunoprecipitação das proteínas PDK e BCKDK, a partir de parasitos contendo tag.HA para essas proteínas-alvo (conforme metodologia do item 4.19). Em todas as condições, ocorreu uma maior ligação com a proteína TgBCKDK (~52kDa), em relação a proteína TgPDK (~82 kDa). Quando utilizamos tampão de lavagem contendo 400 mM de NaCl, apesar de ocorrer a imunoprecipitação da proteína BCKDK, ocorreu a perda da proteína PDK nas frações eluidas. A partir desse resultado, efetuamos análises por espectrometria de massas para as condições de imunoprecipitação somente com o uso dos tampões de

lavagens contendo 150 mM e 300 mM de cloreto de sódio (conforme reportado na metodologia, item 4.20).

As quinases BCKDK e PDK possuem localização mitocondrial em *Toxoplasma* (FERRARINI *et al.*, 2021), bem como essas proteínas também são restritas às mitocôndrias nos demais organismos (Atlas do Quinoma, 2024, https://www.cellimagelibrary.org/pages/kinome_atlas). Entretanto, ainda restam dúvidas se PDK e/ou BCKDK poderiam atuar regulando diretamente o complexo BCKDH dos parasitos. Dessa forma, focamos nossas análises buscando evidências em relação à essa questão biológica, focando principalmente em analisar as proteínas descritas como de localização mitocondrial, utilizando-se para isso os dados contidos nas plataformas online Uniprot e ToxoDB. Consideramos para as análises estatísticas as proteínas que apareceram em no mínimo em 02 replicatas, com mínimo de 02 peptídeos únicos, conforme metodologia já reportada pelo nosso grupo de pesquisa (INOUE *et al.*, 2022). Os dados foram filtrados inicialmente por teste t, além de testes estatísticos complementares como Kruskal-Wallis e Análise de Variância (ANOVA). Foram considerados válidos os resultados com $p < 0,05$, **Quadro 2, Figuras 55 e 56** e Dados em **Anexo IV**.

Quadro 2. Proteínas mitocondriais enriquecidas a partir da imunoprecipitação com o uso dos tampões contendo 150 e 300 mM de cloreto de sódio

Tampão	Protein IDs	Proteína	Média peptídeos RH	Média peptídeos BCKDK.HA	Média peptídeos PDK.HA	Replicatas RH	Replicatas BCKDK.HA	Replicatas PDK.HA	Média LFQ RH	Média LFQ BCKDK.HA	Média LFQ PDK.HA
150 mM de cloreto de sódio (tampão 01)	A0A125YPJ8	BCKDK	0,0	21,3	0,0	0	3	0	-	2,80E+09	-
	S8EUE1	PDK	0,0	0,0	15,7	0	0	3	-	-	4,53E+08
	A0A125YJJ9	Componente E2 - BCKDH	2,0	2,7	2,0	2	3	3	4,62E+06	6,66E+06	6,52E+06
300 mM de cloreto de sódio (tampão 02)	A0A125YPJ8	BCKDK	4,0	29,7	0,0	1	3	0	8,12E+06	1,42E+10	-
	S8EUE1	PDK	0,0	0,0	18,3	0	0	3	-	-	6,82E+08
	A0A125YLS6	ADP/ATP translocase	8,3	15,0	10,7	3	3	3	2,76E+07	5,14E+07	3,28E+07
	A0A125YYP6	Heat shock protein	3,0	8,3	7,3	3	3	3	7,27E+06	1,30E+07	1,22E+07
	A0A125YJJ9	Componente E2 - BCKDH	2,0	3,3	4,7	2	3	3	5,44E+06	8,82E+06	1,18E+07
	A0A125YS60	Succinate-CoA ligase subunit alpha	0,0	2,3	2,7	0	3	3	-	9,58E+06	9,37E+06
	A0A125YHZ4	Succinate-CoA ligase subunit beta	1,0	4,7	3,0	0	3	3	-	7,31E+06	8,31E+06
	A0A125YJF1	Dihydrolipoyl lysine residue succinyl transferase component of oxoglutarate dehydrogenase	0,0	2,3	2,0	0	3	2	-	6,36E+06	5,29E+06

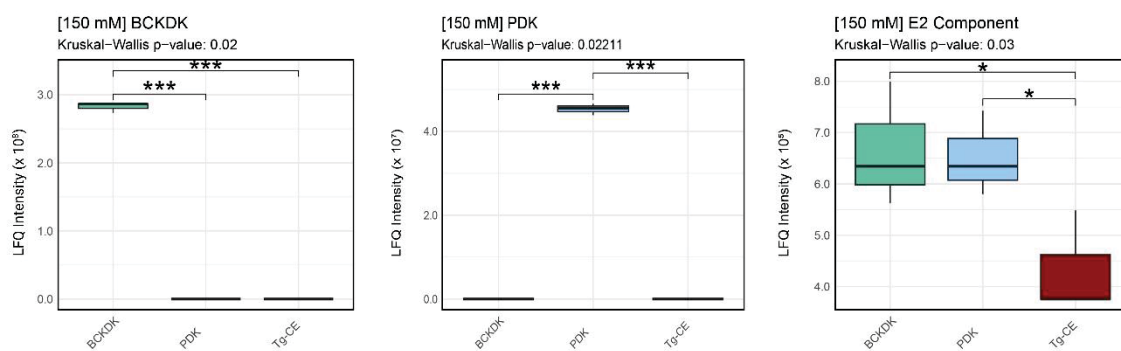


Figura 55. Análises estatísticas para a co-imunoprecipitação com o uso de tampão contendo 150 mM de cloreto de sódio. No eixo horizontal constam os dados para os parasitos etiquetados para BCKDK, PDK, ou não etiquetados (Tg-CE, extrato controle). Asteriscos (*) indicam diferença estatística $p < 0,05$.

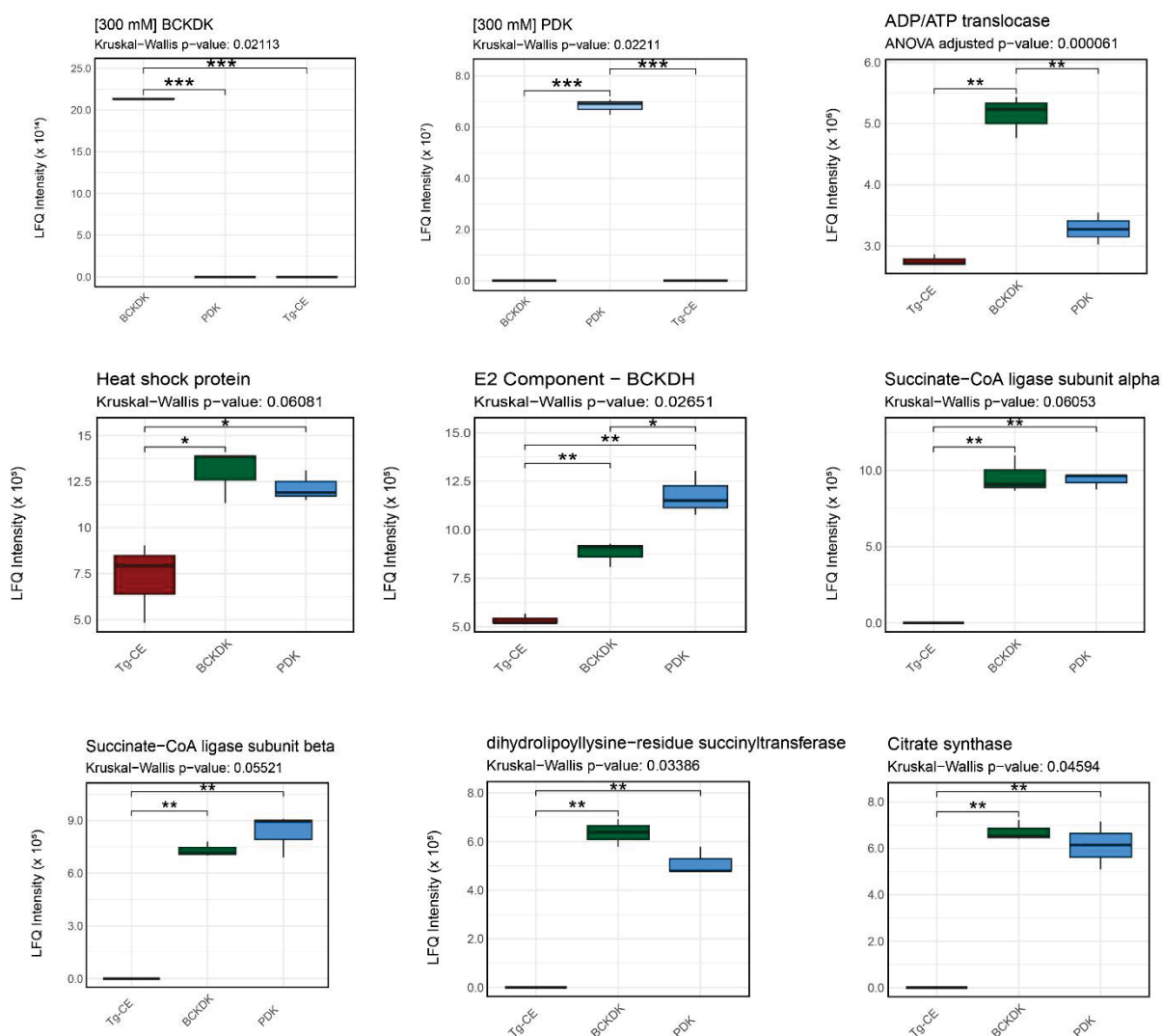


Figura 56. Análises estatísticas para a co-imunoprecipitação com o uso de tampão contendo 300 mM de cloreto de sódio. No eixo horizontal constam os dados para os parasitos etiquetados para BCKDK, PDK, ou não etiquetados (Tg-CE, extrato controle). Asteriscos (*) indicam diferença estatística $p < 0,05$.

Os dados da espectrometria de massas indicaram que o uso dos tampões contendo 150 mM e 300 mM de cloreto de sódio (tampões 01 e 02, respectivamente), permitiu o enriquecimento das proteínas TgBCKDK e TgPDK em relação às condições controle. Na condição de 150 mM de cloreto de sódio, a única proteína mitocondrial enriquecida para ambas as quinases está relacionada ao componente E2 do complexo BCKDH, sem diferenças estatísticas em relação ao enriquecimento dessa proteína em relação às quinases.

Com o aumento da concentração salina para 300 mM também verificamos co-imunoprecipitação do componente E2 de BCKDH em relação a ambas as quinases, porém com um enriquecimento maior de E2 em relação à TgPDK, em comparação com TgBCKDK. Em ambas as condições testadas, não foi verificado co-imunoprecipitação das proteínas relacionadas à subunidade E1-alfa do complexo BCKDH.

A interação de ambas as quinases com o componente E2 de BCKDH reforça a hipótese de que ambas as enzimas poderiam realizar a regulação do complexo BCKDH. O componente E2 se estrutura como eixo central, onde as demais proteínas realizam o ancoramento, para a estruturação do complexo desidrogenase ((HEVLER *et al.*, 2023). As quinases BCKDK ou PDK se ancoram na região L2 (próxima à região N-terminal) do componente E2 (STACPOOLE, 2017), enquanto a subunidade E1-alfa realiza ancoramento na região E1 (porção C-terminal) dessa proteína (KOROTCHKINA; PATEL, 2008), regiões espacialmente distintas.

A partir das análises de imunoprecipitação com tampão contendo 300 mM de cloreto de sódio, também encontramos outras 06 proteínas enriquecidas. A proteína ADP/ATP translocase é descrita como essencial para o metabolismo dos taquizoítas, atuando na exportação do ATP produzido na mitocôndria e importação do ADP citoplasmático (QIAN *et al.*, 2023). A proteína identificada como heat shock protein (A0A125YYP6) é expressa constitutivamente em taquizoítas e bradizoítas, estando aumentada em diferentes condições de estresse, tanto de temperatura como potencial osmótico, além de possível ação como chaperonas, atuando no correto enovelamento de proteínas mitocondriais (DE MIGUEL; ECHEVERRIA; ANGEL, 2005).

As enzimas citrato sintase, dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase (componente E2 de complexo KGDH), e as subunidades da enzima succinil-CoA ligase possuem atuação em diferentes etapas do ciclo de Krebs. A enzima citrato sintase participa da primeira etapa do ciclo de Krebs, catalisando a conversão do acetil-CoA em citrato, com a produção de NADH, FADH e ATP (CHHIMPA *et al.*, 2023). A ocorrência de mutações nessa enzima leva ao decréscimo da produção de ATP pela célula, além da forte redução da proliferação de taquizoítas em estudos *in vitro* e *in vivo* (LYU *et al.*, 2024). O complexo KGDH apresenta um papel central na regulação do metabolismo mitocondrial, atuando na conversão de alfa-cetoglurato, com a produção de succinil-CoA e NADH no processo. Esse complexo atua também em vias associadas à sinalização celular e controle dos níveis de cálcio intracelular (HANSEN; GIBSON, 2022). A enzima succinil-CoA ligase, enzima composta pelas subunidades alfa e beta, utiliza como substrato a molécula succinil-CoA, gerando como produtos succinato, coenzima-A, além de ATP e GTP (VAN HOVE *et al.*, 2010).

Apesar dessas 05 proteínas adicionais citadas acima também estarem enriquecidas no extrato solúvel dos parasitas etiquetados para ambas as quinases, não há evidências na literatura sobre a participação de proteínas quinases sobre a regulação dessas enzimas. Além disso, verificamos um maior número de proteínas contaminantes na condição de 300 mM, em relação ao uso de tampão contendo 150 mM de cloreto de sódio, o que poderia nos indicar que testes futuros poderiam empregar concentrações intermediárias de tampões contendo entre 150 e 300 mM de cloreto de sódio, para uma redução de contaminantes e possivelmente um aumento das interações proteína-proteína.

6. DISCUSSÃO

O metabolismo energético de *Toxoplasma gondii*, e de outros apicomplexas, tem sido alvo de diversas investigações e discussões acadêmicas ao longo do tempo, visando elucidar as particularidades bioquímicas desse grupo de organismos, que os tornam essencialmente únicos e muito divergentes em relação a outros eucariotos (SEEBER; LIMENITAKIS; SOLDATI-FAVRE, 2008), desde a maior dependência da glicólise como fonte de energia (SHUKLA *et al.*, 2018), até a ausência de um complexo PDH mitocondrial nesse grupo de organismos (JACOT *et al.*, 2016).

Além disso, outra característica marcante dos apicomplexas está relacionada à presença do apicoplasto, organela adquirida por endossimbiose secundária de um ancestral relacionado às algas (STRIEPEN, 2011), e que contém um complexo PDH, capaz de metabolizar o piruvato em acetil-CoA, o qual é utilizado como substrato para a produção de ácidos graxos (ELAHI; PRIGGE, 2023).

A literatura científica aponta que na ausência de um complexo PDH na mitocôndria desses organismos, o complexo BCKDH (originalmente voltado à degradação de aminoácidos) assumiu o papel de conversão do piruvato, tendo ampla preferência pelo piruvato frente aos aminoácidos, sendo classificado como um complexo *PDH-like*, mas que ainda mantém uma atividade residual na degradação de aminoácidos (OPPENHEIM *et al.*, 2014).

Essa é uma situação peculiar, dado que a grande maioria dos organismos possuem complexos desidrogenases voltados ao metabolismo do piruvato (complexo PDH) ou aos aminoácidos (complexo BCKDH), e não um complexo único sendo responsável por vias bioquímicas tão distintas. Além dessa questão, é reportado que em *Toxoplasma* a via de degradação dos aminoácidos está totalmente funcional, com a presença da enzima BCAT, que metaboliza a primeira etapa da desaminação de aminoácidos, cujos subprodutos são utilizados de forma “canônica” por complexos do tipo *BCKDH* nas demais espécies (LIMENITAKIS *et al.*, 2013).

Dado que *Toxoplasma* mantém metabolismo mitocondrial tanto sobre o piruvato quanto sobre os aminoácidos, e que a subunidade E1-alfa de BCKDH já descrita na literatura está voltada ao metabolismo do piruvato, realizamos análises filogenéticas, com o uso das ferramentas *Blast*, *Uniprot* e *OrthoDB*, buscando por sequências de

proteínas similares à subunidade E1-alfa de BCKDH. Nossas análises indicaram a presença de uma nova proteína, que denominamos como E1-alfa-02, que apesar de ser identificada pelos bancos de dados, não há informações na literatura que apontem a sua função biológica junto ao metabolismo de *Toxoplasma gondii*, nem a sua história evolutiva. O que nos levou a aprofundar ainda mais as buscas para possíveis ortólogos de ambas as proteínas junto ao supergrupo SAR (Stramenopiles, Alveolata e Rhizaria), grupo filogenético ao qual pertence *T. gondii* (SIMPSON; EGLIT, 2016), de forma a reconstruir a história evolutiva dessas proteínas.

Nossas análises evidenciaram que a proteína identificada como TGME49_292100 (E1-alfa-02) é filogeneticamente relacionada às subunidades E1-alfa dos complexos BCKDHs, contendo as regiões de domínios características desses complexos (Ævarsson et al., 1999), similares às regiões presentes na proteína TGME49_239490 (E1-alfa-01), já descrita na literatura (OPPENHEIM et al., 2014).

O levantamento de dados referentes ao perfil de expressão de enzimas presentes em *Toxoplasma* e associadas à estruturação do complexo BCKDH, revelou um aumento da expressão de E1-alfa-01 (voltada ao piruvato) durante a fase proliferativa, e isso pode estar correlacionado ao ambiente intracelular das células hospedeiras que são ricos em glicose (BLADER; KOSHY, 2014).

Entretanto, foi possível observar um perfil antagônico entre a expressão de E1-alfa-01 e das enzimas E1-alfa-02 e BCAT, tanto a partir de 44 horas de proliferação *in vitro*, quanto durante a fase de esporulação dos parasitos. Nessa fase ocorre uma redução de E1-alfa-01 e um aumento de E1-alfa-02 e da proteína BCAT (enzima que participa do pré-processamento de BCAAs), (DE MEEÛS D'ARGENTEUIL et al., 2021), o que reforça a possibilidade de E1-alfa-02 estar metabolicamente relacionada com BCAT.

Além disso, análises proteômicas de esporozoítos (fase presente nos oocistos de *Toxoplasma*) também já mostraram um predomínio da conversão de BCAAs para o fornecimento de acetil-CoA como substrato para a manutenção do ciclo de Krebs na mitocôndria, o que torna os parasitos energeticamente independentes de recursos externos nessa fase do ciclo de vida (POSSENTI et al., 2013). Dessa forma, o fato de E1-afa-02 ser mais expressa na fase de esporulação reforça a possibilidade de que

essa enzima esteja diretamente associada ao metabolismo dos BCAAs, e atue principalmente quando a disponibilidade de piruvato está restrita.

Outros dados da literatura, que reforçam a nossa hipótese, residem nos dados relacionados ao nocaute da subunidade E1-alfa de BCKDH em *T. gondii* e *Plasmodium*. Em *Plasmodium*, o nocaute gênico desencadeia fortes alterações de desenvolvimento dos parasitos, pois a infecção em modelo animal não se desenvolve e o sistema imunológico consegue eliminar totalmente os parasitos circulantes. No entanto em *Toxoplasma*, o nocaute dessa mesma subunidade torna a proliferação da fase replicativa do parasito mais lenta *in vitro*, mas não altera a dinâmica de infecção ou egresso dos parasitos (OPPENHEIM et al., 2014), o que poderia ser indicativo de que E1-alfa-02 estaria atuando como enzima compensatória nessa situação, ainda permitindo a dinâmica celular desses parasitos nocaute.

Algo que chamou atenção foi que ao analisarmos os dados de transcriptômica, depositados na plataforma ToxoDB, não foi reportado um aumento da expressão proporcional da subunidade E1-beta em razão de um aumento de E1-alfa-02 durante a fase de esporulação, o que, indiretamente indicaria a possibilidade de existir também uma outra subunidade E1-beta (possível E1-beta-02) ainda não reportada na literatura. Entretanto, apesar de nossas buscas junto às plataformas *Blast*, *OrthoDB* e *Uniprot*, utilizando-se como referência tanto a sequência já descrita para a subunidade E1-beta de *Toxoplasma*, quanto as sequências dessa subunidade reportadas para outros organismos, não encontramos nenhuma outra sequência candidata à possível subunidade E1-beta, que poderia se associar à subunidade E1-alfa-02 principalmente durante a fase de esporulação dos parasitos. Em *Arabidopsis thaliana*, onde também se verificam 02 complexos BCKDHs (ambos voltados ao metabolismo de BCAAs), ocorre a duplicação de ambas as subunidades E1-alfa e E1-beta, cada qual associada à sua subunidade específica (PENG et al., 2015), permanecendo a questão se a subunidade E1-beta de *Toxoplasma* realmente ocorre como uma proteína única, sendo expressa principalmente durante a fase proliferativa, porém se associando a E1-alfa-02 durante a fase de esporulação, ou se haveria alguma outra proteína, ainda desconhecida, e possível candidata a ser uma nova subunidade E1-beta.

É postulado na literatura que o complexo BCKDH é o mais ancestral dos complexos desidrogenases, e ao longo dos processos evolutivos sofreu processos de neofuncionalização, adquirindo a capacidade de metabolização do piruvato e dando

origem ao complexo PDH encontrado na maioria dos organismos (SCHNARRENBARGER; MARTIN, 2002). De maneira semelhante, nossos dados de filogenia também apontaram uma origem em comum da subunidade E1-alfa dos complexos desidrogenases BCKDH e PDH, como também que a subunidade E1-alfa-02 de BCKDH está presente em diferentes grupos de organismos alveolados. O surgimento da subunidade E1-alfa-01 (voltada ao metabolismo do piruvato) em um ancestral ligado aos apicomplexas, pode ter permitido um avanço evolutivo considerável a esses organismos, e pode ter possibilitado um aproveitamento mais eficiente dos compostos de carbono provenientes das células hospedeiras, o que privilegiou um modo de vida voltado ao parasitismo.

Além disso, proteínas filogeneticamente relacionadas tendem a apresentar regiões conformacionais conservadas, o que permite inferir as relações filogenéticas entre diferentes ortólogos (AGARWAL *et al.*, 2011). A sobreposição estrutural entre E1-alfa-01 e E1-alfa-02 mostrou diversas regiões de folhas-beta e alfa-hélices em comum entre as 02 proteínas. Entretanto ocorrem diferenças nas porções N-terminal de ambas as proteínas, com E1-alfa-02 apresentando região N-terminal mais extensa. Nesse sentido, é possível que, após um processo de duplicação inicial, pode ter ocorrido um processo de redução da porção N-terminal em E1-alfa-01, o que pode ter possibilitado uma atividade catalítica mais voltada à conversão do piruvato.

A partir dos dados filogenéticos, evidenciamos que dentro do clado Alveolata, somente Ciliophora, grupo muito diverso de organismos aquáticos (KULAŠ *et al.*, 2021), ainda possui o complexo PDH mitocondrial, em todos os demais grupos desse ramo evolutivo, esse complexo enzimático está ausente.

A aquisição de um plastídio, através de eventos de endossimbiose, em um ancestral ligado aos grupos Dinoflagellata, Perkinsozoa e demais apicomplexas, desencadeou profundas alterações bioquímicas, levando a reduções em diferentes vias metabólicas, refletindo também na perda do complexo PDH mitocondrial (DANNE *et al.*, 2013). Nossos dados filogenéticos além de apontarem a perda desse complexo PDH, nesse mesmo ponto evolutivo reportado pela literatura, também indicam que ocorreu um processo de divergência da quinase PDK, a qual está posicionada em um ramo evolutivo divergente em relação às quinases PDKs e BCKDKs de outros organismos, o que também ainda não foi abordado pela literatura.

A enzima PDK está normalmente associada à regulação dos complexos PDH nas mitocôndrias (WANG, XIUXIU *et al.*, 2021), e depende do reconhecimento de sítios conservados presentes em PDH, para sua atuação enzimática (AHSAN *et al.*, 2012), sem a ocorrência de interação cruzada em relação aos sítios de fosforilação encontrados em BCKDH (HEINEMANN-YERUSHALMI *et al.*, 2021).

A literatura aponta que a substituição da Ser-293 por alanina impede a fosforilação de PDK sobre peptídeos sintéticos relacionados ao complexo PDH mitocondrial de *A. thaliana* (HUANG *et al.*, 2010), bem como algumas mutações *upstream* ou *downstream* à essa serina afetam a capacidade de reconhecimento dessa quinase em relação ao seu alvo biológico (AHSAN *et al.*, 2012).

Entretanto, pouco é explorado na literatura sobre a conservação dos resíduos flanqueadores relacionadas ao sítio de serina (Ser-293) dos complexos BCKDH/PDH, bem como de sua evolução ao longo do tempo. E, dessa forma, resolvemos olhar mais detalhadamente também sobre essa questão. Durante o processo de alinhamento das sequências, referentes às subunidades E1-alfa de BCKDH e PDH dos organismos eucariotos, observamos a conservação da região central **STS** em BCKDH, sendo que essa mesma região central está presente nas duas proteínas relacionadas à subunidade E1-alfa de BCKDH em *Toxoplasma*.

Enquanto isso, na subunidade E1-alfa do complexo PDH mitocondrial dos organismos eucariotos, essa região central é composta pelos resíduos **SMSDP**. Nos plastídios (de organismos fotossintetizantes) e no apicoplasto de *Toxoplasma* e demais apicomplexas, essa região central é composta pelos resíduos **S(L/V/P)ADP**. Verificamos que somente em complexos do tipo PDH ocorre a presença de um resíduo de prolina (**P**), localizado imediatamente após o resíduo de aspartato (**D**). Esse resíduo de prolina, nessa posição, está totalmente ausente nos complexos BCKDH dos demais organismos analisados. A presença desse sítio de prolina também foi verificada como essencial para a interação da quinase PDK junto ao complexo PDH mitocondrial de *Arabidopsis thaliana* (AHSAN *et al.*, 2012), porém nesse trabalho os autores abordaram apenas aspectos enzimáticos, sem se aprofundarem nas questões evolutivas em relação a esse sítio ao longo da evolução.

Dessa forma, sugerimos que as mutações dessa região central estão diretamente ligadas à história desses complexos desidrogenases, impedindo que as quinases BCKDK e PDK interajam de forma cruzada entre os complexos.

Além disso, a substituição da treonina (**T**), aminoácido não carregado, presente em BCKDH, pela metionina (**M**), além do sítio de prolina (**P**), aminoácidos alifáticos apolares (NELSON; COX, 2017), encontrados no complexo PDH mitocondrial, podem ter alterado completamente as cargas eletrostáticas dessa região central para um perfil mais apolar, o que pode requerido o surgimento de uma quinase muito mais adaptada para interagir com esse sítio.

No complexo PDH de plastídios (o que inclui os apicoplastos), os aminoácidos leucina, valina e prolina, além da alanina (que substituiu a serina na posição 295), também são classificados como apolares (NELSON; COX, 2017), o que pode ter desencadeado uma região contínua ainda mais apolar do que a encontrada no complexo PDH mitocondrial. Além disso, os complexos PDH de plastídios são autoregulados (TOVAR-MÉNDEZ; MIERNYK; RANDALL, 2003), então sugerimos que a presença dessa região central, altamente apolar, desde os primórdios da evolução, pode ter levado ao impedimento da interação com quinases do tipo PDK, as quais foram conseqüentemente perdidas ou estavam totalmente ausentes desde os organismos ancestrais que deram origem aos plastídeos, aparecendo mais tarde na evolução somente nas alfa-proteobactérias (que deram origem às mitocôndrias).

Em estudos de localização celular em *Toxoplasma*, também não foi encontrada uma quinase PDK junto ao apicoplasto (FERRARINI *et al.*, 2021), o que possivelmente abrange a regra geral da ausência de PDK em organelas derivadas de plastídios e, possivelmente o complexo PDH do apicoplasto também possui atividade enzimática autorregulada.

Os complexos BCKDH são normalmente regulados pelas quinases BCKDK (HEINEMANN-YERUSHALMI *et al.*, 2021), o que nos indicaria que possivelmente a quinase BCKDK estaria atuando na regulação de ambas as proteínas relacionadas à subunidade E1-alfa de BCKDH em *Toxoplasma*. Nossos dados de filogenia também apontaram que a perda de um complexo PDH típico em um ancestral ligado aos apicomplexas, por consequência acarretaria a perda de um alvo biológico provável para a quinase PDK nesses organismos. Entretanto, nossas análises indicam que a

quinase PDK dos alveolados também se apresenta em um ramo evolutivo divergente em relação às quinases BCKDK e PDK de outros grupos. Dessa forma, isso nos sugere que, concomitante à perda do complexo mtPDH, também ocorreram modificações evolutivas junto à essa enzima, o que pode ter permitido o reconhecimento e a regulação das subunidades E1-alfa de BCKDH. Por isso, seria possível que em *Toxoplasma*, ambas as quinases, BCKDK e PDK, atuem sobre ambas as subunidades E1-alfa de BCKDH, podendo também serem alvos da atuação farmacológica de inibidores de quinases, como o DCA.

Diversas perdas tanto das quinases PDK e BCKDK, bem como de uma subunidade E1-alfa de BCKDH, foram verificadas em diferentes grupos filogenéticos. Em Haemosporida (gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus*), e Piroplasmorida (gêneros *Babesia* e *Theileria*) ocorre apenas a subunidade E1-alfa de BCKDH voltada à conversão do piruvato, com a perda tanto das quinases, quanto do metabolismo de BCAAs. Isso pode ser uma característica evolutiva diretamente relacionada à infecção de células sanguíneas, cujo conteúdo intracelular é rico em glicose, e em *Plasmodium* os transportadores de membrana podem realizar o transporte coordenado tanto de glicose como de frutose (GOERDELER; SEEBERGER; MOSCOVITZ, 2021). Nesse sentido, nossos dados também corroboram com outros estudos que pontuam uma gradual redução das vias metabólicas em apicomplexas, com perdas de vias bioquímicas e até mesmo reduções estruturais na mitocôndria (MATHUR; WAKEMAN; KEELING, 2021).

Em contraste com a situação verificada em *Plasmodium*, na família Sarcocystidae, onde analisamos os gêneros *Toxoplasma* e *Hammondia*, existe tanto as quinases PDK e BCKDK quanto as 02 proteínas relacionadas à subunidade E1-alfa de BCKDH, um indicativo de que nesses parasitos possa existir uma maior adaptabilidade em virtude de flexibilidade metabólica, visto que já foi descrito que em *Toxoplasma* essa capacidade adaptativa permite rápidas alterações metabólicas frente a condições de estresse e disponibilidade limitada de recursos (WALSH *et al.*, 2022).

A demonstração prévia dos efeitos de DCA na replicação de *Toxoplasma* em estudos *in vitro*, juntamente com a identificação da presença das quinases BCKDK e PDK na mitocôndria como potenciais alvos dessa droga (FERRARINI *et al.*, 2021), aliada aos resultados de filogenia obtidos nesse trabalho, que indicam a presença de

E1-alfa-02, nos motivou à realização de diferentes abordagens bioquímicas e *in silico* para elucidar melhor essa questão biológica. Nesse sentido, optamos por realizar ensaios bioquímicos utilizando ambas as quinases, expressas de forma recombinante, e avaliar se os peptídeos sintéticos relacionados às 02 subunidades E1-alfa do complexo BCKDH, poderiam ser diferentemente fosforilados pelas quinases utilizando ensaios bioquímicos e abordagens *in silico* em conjunto com o uso do inibidor DCA.

Apesar dos ensaios em diferentes cepas bacterianas, e em diferentes condições e meios de cultivo, a expressão recombinante de ambas as enzimas utilizando suas sequências completas foi inviável. No caso de TgPDK não houve a expressão em nenhuma das condições testadas. Enquanto no caso de TgBCKDK foi possível alcançar a expressão da proteína recombinante, porém mostrou-se muito instável, dificultando o processo de purificação.

Isso parece ser comum para as PDKs de outros organismos, pois na literatura é reportado grande dificuldade para a expressão e purificação desse grupo de proteínas, resultando em enzimas totalmente insolúveis ou presentes em corpos de inclusão, que requerem passos laboriosos para a purificação da proteína de interesse (DAHIYA *et al.*, 2019), até a expressão de proteínas instáveis e sujeitas à degradação durante as etapas de purificação (ZHANG, WEN *et al.*, 2018). Dessa forma, a impossibilidade de expressão de TgPDK e a instabilidade de purificação de TgBCKDK está coerente com o que já está reportado na literatura.

As metodologias de troca iônica e exclusão por tamanho, que foram realizadas com o objetivo de produzir frações mais purificadas de TgBCKDK, com a exclusão das formas degradadas, falharam em produzir frações com a proteína purificada. Da mesma forma, as tentativas de diálise, para troca dos tampões de alta concentração salina para tampões com menor concentração de sais, promoveram a súbita precipitação da proteína de interesse. Esse fenômeno pode estar intrinsecamente relacionado à formação de dímeros nessa família de proteínas (ANWAR *et al.*, 2021), o que pode explicar a necessidade de manutenção dessas proteínas em tampões com alta carga salina, com o intuito de se evitar a precipitação, como os tampões já reportados na literatura que utilizam cloreto de sódio a 300 mM (TOVAR-MÉNDEZ *et al.*, 2005).

Através das análises estruturais das proteínas-alvo, realizadas por ferramentas *in silico*, como AlphaFold e da plataforma Interpro, foi possível observar a presença de regiões intrinsecamente desestruturadas tanto em TgPDK quanto em TgBCKDK. Regiões intrinsecamente desestruturadas são segmentos polipeptídicos que contêm uma grande quantidade de aminoácidos polares, impedindo que ocorra um enovelamento proteico nessas regiões, tornando-as altamente flexíveis, e com uma grande variedade de conformações possíveis, desde altamente lineares, até totalmente compactas (BABU, 2016). Assim, a purificação de proteínas recombinantes contendo regiões desestruturadas torna-se um verdadeiro desafio, dado que essas regiões favorecem a formação de agregados proteicos, bem como são sítios altamente sensíveis à atuação de proteases (TARCZEWSKA; GREB-MARKIEWICZ, 2019).

Dessa forma, optamos pela expressão recombinante da sequência correspondente as regiões mais estruturadas, contendo as regiões de domínios (BCKDH_Adom e região ATPase) de ambas as enzimas, permitindo assim a atividade enzimática desse grupo de proteínas (THELEN; MIERNYK; RANDALL, 2000).

A partir da clonagem dessas regiões mais estáveis, obtivemos sucesso na expressão recombinante tanto para TgBCKDK quanto para TgPDK em *E. coli* BL21-pLysS (DE3). Essa cepa bacteriana é adequada para a expressão de proteínas potencialmente tóxicas, bem como expressa constitutivamente a lisozima T7, que tende a reduzir a expressão basal (Thermo).

Entretanto, durante os testes de expressão recombinante de TgBCKDK, observamos a expressão dessa proteína mesmo na ausência do agente indutor (IPTG). Enquanto isso, para a proteína TgPDK, a expressão estava ocorrendo apenas na presença do agente indutor (IPTG), nos chamando a atenção para tentar compreender melhor o que poderia estar acontecendo.

A presença de expressão basal de TgBCKDK possivelmente pode ser explicada pelo trabalho de Studier (2005), o qual afirma que determinadas proteínas, quando expressas em sistema procaríoto, levam à desregulação dos níveis de AMP cíclico (cAMP) intracelular, o que, por consequência, promove o desbloqueio do promotor que regula a expressão da T7 RNA polimerase, e, com isso, mais proteína será expressa de forma desregulada, reiniciando o processo. Todos esses eventos

podem acarretar a produção de proteínas insolúveis, truncadas, e, em casos mais graves, desencadear mutações nos vetores de expressão, levando à expressão de proteínas com sequências alteradas (STUDIER, 2005).

Para contornar essa situação, é possível utilizar meios autoinduzidos, suplementados com glicose e lactose. A glicose reprime a expressão basal de proteínas recombinantes através do bloqueio das regiões promotores contidas nos vetores de expressão, que são induzidas por análogos de lactose (como o IPTG), atrasando a expressão de proteínas recombinantes durante a fase de crescimento bacteriano (UKKONEN *et al.*, 2013). Com o declínio das concentrações de glicose, as bactérias passam gradualmente a consumir a lactose como fonte de energia, e como consequência, se inicia a expressão recombinante da proteína de interesse também de forma mais gradual, o que pode aumentar a solubilidade além rendimentos superiores em relação ao sistema tradicional que emprega IPTG (STUDIER, 2005).

Para TgBCKDK, os nossos resultados confirmaram esse fenômeno, pois na condição com lactose houve maior expressão do que com IPTG, e níveis aumentados de glicose reprimiram a expressão basal. Entretanto, o contrário foi observado em relação a TgPDK, onde as condições com lactose promoveram uma alta expressão, acima da verificada com IPTG, mas que levou à formação de proteínas instáveis e truncadas. Dessa forma, passamos a utilizar o meio autoinduzido para a proteína TgBCKDK, mantendo a expressão tradicional, com o uso de IPTG, para a proteína TgPDK.

Importante destacar que somente conseguimos atingir a purificação da proteína TgBCKDK com a metodologia de purificação manual, utilizando-se colunas cromatográficas e fluxo da fase móvel por gravidade, no qual a proteína de interesse começou a ser eluída da fase estacionária (coluna de níquel-NTA) a partir de 150 mM de imidazol, com enriquecimento maior a partir da faixa de 200 mM de imidazol. Em todas as tentativas de purificação em cromatógrafo ÄKTA, a proteína de interesse foi eluída com muitos contaminantes. Dessa forma, apesar de ser metodologicamente mais laboriosa, optamos pela purificação manual para todos os demais testes enzimáticos utilizando-se essa proteína.

Em relação à proteína TgPDK, tanto a purificação manual, quanto a purificação por afinidade em cromatógrafo ÄKTA, falharam em produzir frações purificadas, com

a proteína sendo eluída já em baixas concentrações de imidazol, juntamente com os demais contaminantes provenientes das células bacterianas. Esse comportamento também já foi observado na purificação da enzima PDK3 de humanos, onde a eluição já se iniciava a 25 mM de imidazol, além de grande parte da proteína expressa estar retida em corpos de inclusão (DAHIYA *et al.*, 2019). A presença persistente de contaminantes, nas etapas de purificação dessa proteína, inviabilizou a sua utilização nos testes enzimáticos.

Durante a padronização dos ensaios enzimáticos, verificamos que menores tempos de ensaio não resultaram em diferenças estatísticas entre as condições, e que para se mensurar a atividade enzimática de TgBCKDK é necessário ensaios de longa duração, sendo possível observar diferenças significativas somente após 06 horas de ensaio, frente aos peptídeos-alvo e mutados. Esse comportamento é semelhante ao reportado na literatura para a atividade cinética de PDK1 de humanos, que pode requerer de 06 a 12 horas de ensaio para evidenciar diferenças significativas em relação às condições controle (LI; YANG; ZHANG, 2023).

A partir dos ensaios enzimáticos, verificamos que TgBCKDK apresenta atividade basal frente ao ATP, mesmo na ausência de peptídeos, e essa condição já é descrita na literatura, na qual existe uma atividade de autofosforilação inicial para esse grupo de enzimas, previamente à transferência do grupo fosfato para a região de serina do seu alvo biológico (HUANG *et al.*, 2010; THELEN; MIERNYK; RANDALL, 2000).

Apesar da atividade basal observada, a atividade de TgBCKDK aumenta na presença do peptídeo-alvo relacionado à E1-alfa-01 em relação ao peptídeo mutado (contendo mutação da Ser-293, por alanina), o que nos indica que a presença da serina na região-alvo de fosforilação é importante para a atividade dessa enzima, conforme já foi apontado na literatura (HUANG *et al.*, 2010). Quando realizamos os testes enzimáticos utilizando os peptídeos-alvo correspondentes às subunidades E1-alfa-01 e E1-alfa-02, não encontramos diferenças estatísticas entre as condições, ou seja, reforça a hipótese de que BCKDK também poderia ter atividade sobre a nova subunidade encontrada a partir dos dados de filogenia, expandindo ainda mais a participação dessa enzima no metabolismo dos parasitos.

Ao realizarmos os testes enzimáticos utilizando DCA como agente inibidor de TgBCKDK, verificamos valores de IC₅₀ na faixa entre 374,3 e 440,5 μ M. Os valores encontrados estão muito abaixo dos valores de IC₅₀ encontrados para DCA frente a *Toxoplasma* em cultivos *in vitro*, que foram reportados em 16 mM (FERRARINI *et al.*, 2021) e inferiores à inibição de PDK2 *in vitro* por DCA, que foi reportada na faixa de 2 mM (quando o componente E2 está ausente), e na faixa de 200 μ M na presença de E2 (BAKER *et al.*, 2000). Além disso, verificamos que DCA reduz a velocidade enzimática de TgBCKDK, com um aumento do *K_m aparente* da enzima. A literatura aponta que inibidores que aumentam o *K_m* de uma enzima geralmente estão associados a inibição do tipo competitiva (ROBIN; REUVENI; URBACH, 2018). O mecanismo de ação DCA está voltado à interação com a região regulatória desse grupo de enzimas, que é distinto do sítio ATPase. Entretanto, o bloqueio da região regulatória promove alterações conformacionais em toda a enzima, alterando a afinidade do sítio ATPase, o que reduz significativamente a atuação enzimática sobre o ATP (KLYUYEVA; TUGANOVA; POPOV, 2008).

Em conjunto aos dados enzimáticos, realizamos também o *docking* molecular *in silico* para ambas as quinases, frente aos ligantes piruvato e DCA, utilizando como referência os dados já depositados na plataforma PDB (<https://www.rcsb.org/structure/2Q8H>), que reportam os sítios de interação de DCA para a enzima PDK1 de humanos. Os resultados das análises mostraram similaridades na interação de ambos os ligantes aos sítios localizados na região regulatória (N-terminal) de ambas as quinases. Para TgBCKDK, os ligantes DCA e piruvato interagem com resíduos de arginina nas posições 21, 112 e 116. Enquanto isso, na quinase TgPDK os sítios de interação também foram relacionados a resíduos de arginina, semelhante ao encontrado em TgBCKDK, mas identificamos também interações com resíduos de histidina e serina.

Na literatura é reportado que DCA interage sobre os sítios de arginina em PDK2 de humanos (KLYUYEVA; TUGANOVA; POPOV, 2007), além disso, a distância teórica entre esse ligante e os seus respectivos resíduos de PDK1 está na faixa de 2 angstroms (KATO *et al.*, 2007), resultados próximos aos encontrados em nossas análises *in silico*. A interação com ligantes na região regulatória de PDK e BCKDK, além de impedir a dimerização da enzima, que é essencial para a sua atividade

enzimática, possivelmente aumenta as interações com ADP, outro metabólico inibitório, formado a partir da clivagem do ATP (KNOECHEL *et al.*, 2006).

Dessa forma, nossos testes enzimáticos e abordagens *in silico* indicam claramente que TgBCKDK pode ser o alvo biológico de DCA. Além disso, com os dados *in silico* também é possível inferir sobre a possível regulação de TgPDK pelo fármaco DCA, apesar de não termos atingido a purificação dessa enzima para os testes enzimáticos *in vitro*, que poderiam confirmar diretamente a ação de DCA sobre a atividade enzimática dessa quinase. Mas o fato de que TgBCKDK também ser alvo de DCA traz informações novas para a literatura, auxiliando na elucidação da questão sobre a possível participação desse fármaco na regulação dessas quinases em *Toxoplasma* (FERRARINI *et al.*, 2021).

Além dos ensaios enzimáticos e de abordagens *in silico*, realizamos também a imunoprecipitação dos complexos proteicos associados às quinases BCKDK e PDK, a partir de taquizoítas de *T. gondii* previamente etiquetados. Foram identificadas poucas proteínas mitocondriais nas condições analisadas, mas o que chamou atenção foi o fato de que ambas as quinases interagem com o componente E2 do complexo BCKDH, mesmo utilizando-se tampões com alto gradiente salino, o que nos indica que essa interação deve ser estável.

O fato de encontramos o componente E2 de BCKDH associado à quinase TgPDK de *Toxoplasma*, também nos revela algo muito surpreendente. O componente E2 dos complexos BCKDH está estruturado na forma de octaedro, enquanto em PDH essa configuração se apresenta na forma de icosaedro, o que impede o compartilhamento dessa proteína estrutural entre esses 02 complexos desidrogenases, bem como a ligação cruzada entre as respectivas quinases (HEVLER *et al.*, 2023).

Dessa forma, a quinase PDK de *Toxoplasma*, encontrada em um ramo filogeneticamente distinto das PDKs dos demais organismos, pode ter passado por adaptações evolutivas que permitiram o seu ancoramento ao componente E2 do complexo BCKDH de *Toxoplasma*. Nesse sentido, nossas análises da estrutura conformacional das quinases com ferramentas *in silico* já tinham evidenciado um longa região N-terminal para PDK, altamente desestruturada, e com maior número de resíduos do que a encontrada na quinase BCKDK. Assim, especulamos que as

alterações nessa região podem ter permitido uma maior estabilidade de interação dessa quinase em relação ao componente de E2 de BCKDH, e que se mantém mesmo com o uso de tampões com altas concentrações salinas. Esses dados reforçam a possibilidade de que essa quinase também regule as subunidades E1-alfa desse complexo desidrogenase em *Toxoplasma*.

Apesar do enriquecimento do componente E2 de BCKDH, para ambas as quinases, não encontramos enriquecimento em relação às subunidades E1-alfa nos ensaios de imunoprecipitação, e isso pode ser devido à própria estruturação desse complexo, dado que o componente E2 está situado em uma posição central e atua como um eixo onde as demais proteínas se ancoram. Enquanto as quinases BCKDK ou PDK se ancoram na região L2 (STACPOOLE, 2017), a subunidade E1-alfa realiza ancoramento na região E1 do componente E2 (KOROTCHKINA; PATEL, 2008), regiões espacialmente distintas, e é provável que a interação entre a quinase e a subunidade E1-alfa seja muito transiente, apenas para a transferência do grupamento fosfato (Figura 57).

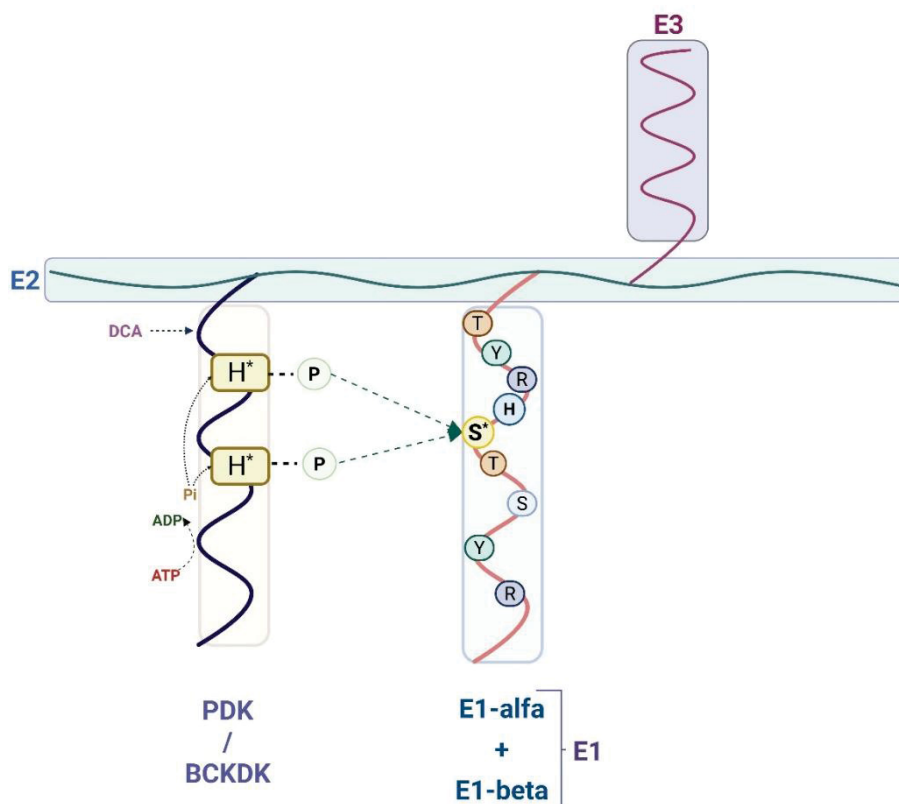


Figura 57. Esquema ilustrativo para a interação das quinases BCKDK e PDK em relação ao componente E2 do complexo BCKDH de *T. gondii*. Na região N-terminal das quinases ocorrem pontos de ancoragem com o componente E2, bem como sítios de interação com o fármaco DCA. O ponto de ancoragem do componente E1 (composto pelas subunidades E1-alfa e E1-beta) ocorre em uma região distinta do sítio de ancoragem das quinases. O sítio H*, representa a histidina que é inicialmente fosforilada nas quinases e promove a transferência do grupo fosfato para a região de serina da subunidade E1-alfa (Thelen; Miernyk; Randall, 2000). Figura do autor, utilizando dados da literatura, e a ferramenta Biorender.

Nos ensaios de imunoprecipitação, também verificamos um aumento de proteínas mitocondriais com o uso de tampão com maior concentração salina, como o componente E2 do complexo KGDH, e as proteínas succinil-CoA ligase e citrato sintase, todas relacionadas ao ciclo de Krebs (CHHIMPA *et al.*, 2023; HANSEN; GIBSON, 2022; VAN HOVE *et al.*, 2010); porém não há dados na literatura em relação à possível regulação dessas enzimas por quinases do tipo PDK/BCKDK.

Apesar de uma maior concentração de sais ter favorecido a interação com maior quantidade de proteínas mitocondriais, isso também favoreceu uma presença maior de contaminantes relacionados a proteínas citoplasmáticas. Nesse sentido, seria importante o uso de técnicas adicionais de imunoprecipitação, como o *crosslinking*, que se utiliza de reagentes que aumentam a interação entre os complexos proteicos, auxiliando na imunoprecipitação de proteínas-alvos e na identificação de redes de interação proteína-proteína (MAKOWSKI *et al.*, 2016). Além disso, outra técnica possível seria o uso de BIOID, metodologia adequada para a aferição de interações proteicas transitórias, ou muito fracas, na qual as enzimas BirA e APEX são fusionadas às proteínas de interesse e promovem a biotinição de proteínas localizadas nas proximidades da proteína de interesse (KIMMEL *et al.*, 2022). As proteínas biotiniladas então podem ser isoladas com imunoprecipitação com o uso de anticorpos conjugados com streptavidina, seguida de identificação das proteínas biotiniladas por espectrometria de massas (DENG *et al.*, 2024).

Nossos dados também sugerem que, de forma concomitante ao evento evolutivo que levou à perda do complexo PDH mitocondrial, em um ancestral ligado aos apicomplexas, também ocorreram alterações evolutivas sobre a quinase PDK, possivelmente permitindo a sua interação com o componente E2 do complexo BCKDH, que, como a literatura reporta, é estruturalmente diferente do componente E2 verificado nos complexos PDH (HEVLER *et al.*, 2023). Além disso, propomos que esse evento evolutivo pode ter permitido a atuação da quinase TgPDK frente ao sítio **STS**, presente nas subunidades E1-alfa de BCKDH, e que é diferente do sítio **SMSDP**, presente nos complexos PDH mitocondriais, e que constitui o alvo da atuação das quinases do tipo PDKs em outros organismos.

Dessa forma, tanto a quinase TgBCKDK normalmente associada à regulação dos complexos BCKDH nos demais organismos poderia atuar regulando as duas subunidades E1-alfa de BCKDH de *Toxoplasma* (como verificado nos testes

enzimáticos), quanto eventos evolutivos possivelmente também habilitaram a quinase TgPDK à interação com um alvo molecular novo, relacionado ao complexo BCKDH, diferente do que ocorre para as enzimas PDKs em outros organismos (**Figura 58**).

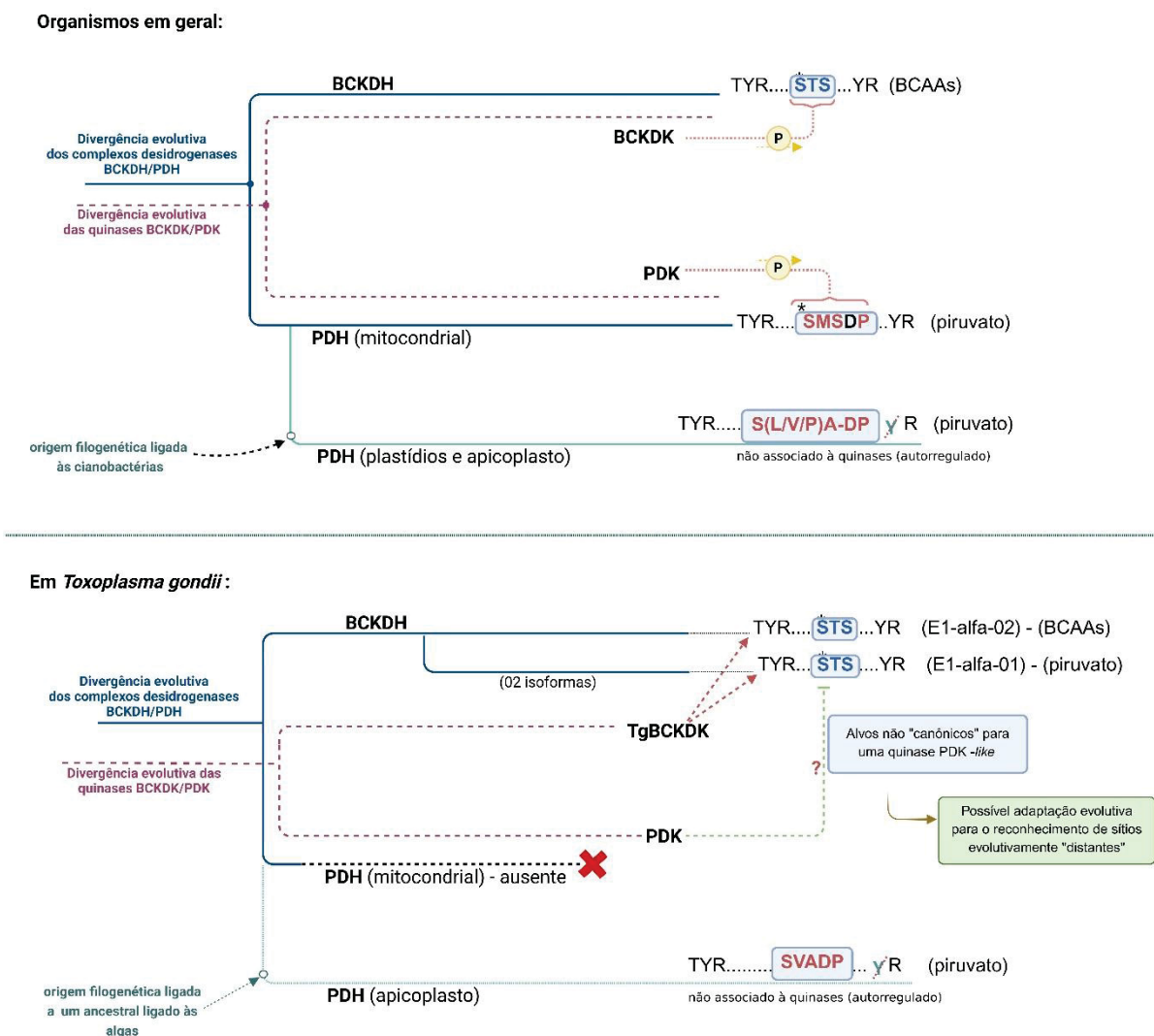


Figura 58. Proposta da divergência evolutiva dos complexos BCKDH e PDH, juntamente com as quinases PDK e BCKDK para os organismos em geral e *Toxoplasma gondii*. Em decorrência da perda do complexo PDH mitocondrial em um ancestral ligado aos apicomplexos, ocorreu o surgimento da subunidade E1-alfa-01, descrita na literatura como voltada ao metabolismo do piruvato, possivelmente compensando a atividade do complexo PDH que foi perdido, bem como a readaptação evolutiva da quinase PDK, possivelmente possibilitando a regulação das enzimas ligadas à subunidade E1-alfa do complexo BCKDH.

A análise dos dados de transcriptômica (RNA-Seq), depositados na plataforma ToxoDB, apontam que a enzima reportada como TGME49_292100 (E1-alfa-02), juntamente com a transaminase BCAT, essencial para o pré-processamento de

BCAAs, estão aumentadas na fase de esporulação dos parasitos, o que contrasta com o perfil expressão de E1-alfa-01, que está aumentado somente durante a fase proliferativa dos parasitos. Apesar do perfil de expressão antagônico entre as subunidades E1-alfa de BCKDH, as quinases BCKDK e PDK estão expressas em todas as fases do ciclo de vida de *T. gondii*.

Dado que a atividade dos complexos desidrogenases é determinada pela atividade catalítica da subunidade E1-alfa (SZABO *et al.*, 2024), propomos que pode ocorrer a alternância da atividade catalítica do complexo BCKDH, onde nos taquizoítas predomina a subunidade E1-alfa-01, direcionando o complexo desidrogenase para o metabolismo do piruvato, enquanto que, em fases latentes ou de esporulação, quando os recursos energéticos se tornam mais escassos, ocorre o predomínio da subunidade E1-alfa-02, possivelmente alterando a atividade de BCKDH para um metabolismo voltado à degradação de BCAAs (**Figura 59**). Assim, acreditamos que essa estratégia metabólica possibilitaria tanto uma eficiência maior dos processos metabólicos de *Toxoplasma*, que poderiam se alternar conforme as demandas energéticas dos parasitos, bem como possibilitaria uma economia de recursos, dispensando a expressão de componentes E2, e de quinases regulatórias, destinadas à estruturação ou regulação de complexos desidrogenases separados.

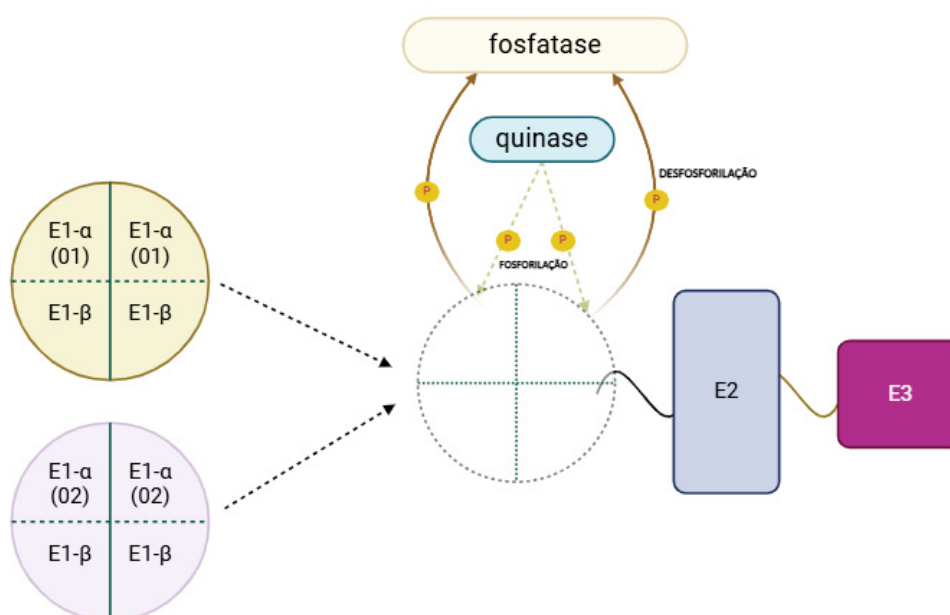


Figura 59. Possível mecanismo de alternância das atividades catalíticas de BCKDH em *Toxoplasma gondii*. A alternância entre as subunidades E1-alfa, identificadas para esse complexo desidrogenase, permitiria a conversão enzimática de todo o complexo, permitindo uma adaptação metabólica dos parasitos frente a diferentes condições nutricionais. A partir da interação com o componente E2, as diferentes subunidades E1-alfa estariam sujeitas à regulação mediada pelas quinases PDK/BCKDK, e pela ação de fosfatases.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossas análises permitiram a identificação de uma nova subunidade E1-alfa que pode interagir com o complexo BCKDH, que denominamos de E1-alfa-02, anotada como TGME49_292100. Isso traz novidades ao que está descrito na literatura, no qual o complexo desidrogenase *Toxoplasma* continha somente uma subunidade E1-alfa (OPPENHEIM *et al.*, 2014). Além disso, nossos dados de filogenia complementam os dados já reportados para as quinases BCKDK/PDK para *Toxoplasma gondii* (Ferrarini *et al.*, 2021), expandindo o conhecimento em relação a atuação dessas proteínas. O trabalho anterior do grupo demonstrou a localização celular das enzimas TgBCKDK/TgPDK e uma correlação estrutural de domínios presentes em TgBCKDK sendo mais próxima da quinase PDK de humanos do que a quinase TgPDK (FERRARINI *et al.*, 2021), não abordando de forma mais aprofundada as relações filogenéticas dessas enzimas em relação às quinases BCKDK e PDK de outros organismos, nem reconstruindo a história evolutiva dessas enzimas.

Nesse sentido, nosso trabalho identificou que a quinase TgBCKDK está filogeneticamente relacionada à quinase BCKDK de outros organismos. Entretanto, TgPDK tem origem evolutiva em um ramo divergente em relação às quinases TgPDK de outros organismos, e isso nos indica que essa enzima pode ter se adaptado a um novo alvo biológico ao longo da evolução. Dessa forma, propomos que a quinase TgPDK sofreu alterações evolutivas que possibilitaram a sua interação com o componente E2 de BCKDH, diferente do que ocorre nos demais organismos, onde PDK se ancora exclusivamente sobre o componente E2 de complexos PDH. Possivelmente a adaptação dessa quinase ocorreu no mesmo período evolutivo em ocorreu a perda complexo PDH mitocondrial.

As análises enzimáticas evidenciaram que peptídeos sintéticos relacionados às 02 subunidades E1-alfa de BCKDH são reconhecidos pela quinase BCKDK, e aumentam a atividade catalítica *in vitro* dessa enzima. Além disso, os dados enzimáticos e abordagens *in silico* indicam que TgBCKDK poderia ser o alvo biológico de DCA. Apesar da purificação de TgPDK recombinante ter sido inviável, impedindo a realização dos ensaios enzimáticos, os nossos dados *in silico* corroboram com a literatura que já descreve PDK como alvo de DCA, e assim essa quinase provavelmente também é alvo desse fármaco no metabolismo de *Toxoplasma*. Dessa

forma o uso de DCA, ou de compostos análogos a esse fármaco, pode se constituir em uma estratégia farmacológica promissora, com o intuito de bloquear as quinases BCKDK e PDK dos parasitos, o que poderia levar ao desenvolvimento de terapias mais efetivas.

7.1 PERSPECTIVAS

Levando em consideração os dados apresentados desse trabalho, consideramos que novas condições de imunoprecipitação seriam importantes, para evidenciar possíveis novos complexos proteicos associados ao complexo BCKDH e às quinases PDK e BCKDK, como estratégias envolvendo *crosslinking* e BIOID, de modo ajudar na identificação de interações transientes com as proteínas-alvo.

Outras abordagens também poderiam incluir a avaliação da expressão dos componentes do BCKDH e das quinases, em parasitos frente à inibidores de quinases, verificando-se a possibilidade de algum mecanismo adaptativo ou mesmo compensatório dessas proteínas, frente à medicamentos, ou mesmo sobre condições de stress nutricional.

Além disso, em contraste com as 02 subunidades E1-alfa do complexo BCKDH em *Toxoplasma*, somente uma enzima está reportada para a subunidade E1-beta desse complexo. Dessa forma, a realização de testes de imunoprecipitação, envolvendo as fases taquizoíta e bradizoíta, envolvendo o etiquetamento de E2, e das subunidades E1-alfa, poderiam ser uma alternativa para uma melhor elucidação desse cenário, o qual também poderia revelar uma nova proteína ainda não descrita na literatura.

REFERÊNCIAS

ÆVARSSON, Arnthor *et al.* Crystal structure of 2-oxoisovalerate and dehydrogenase and the architecture of 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes. *Nature Structural Biology*, v. 6, n. 8, 1999.

AGARWAL, Garima *et al.* Identification of local conformational similarity in structurally variable regions of homologous proteins using protein blocks. *PLoS ONE*, v. 6, n. 3, 2011.

AGBENYEGA, Tsiri *et al.* Population kinetics, efficacy, and safety of dichloroacetate for lactic acidosis due to severe malaria in children. *Journal of Clinical Pharmacology*, v. 43, n. 4, p. 386–396, 1 abr. 2003.

AHSAN, Nagib *et al.* “Scanning mutagenesis” of the amino acid sequences flanking phosphorylation site 1 of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex. *Frontiers in Plant Science*, v. 3, n. JUL, 16 jul. 2012.

ALDAY, P. Holland; DOGGETT, Joseph Stone. *Drugs in development for toxoplasmosis: Advances, challenges, and current status. Drug Design, Development and Therapy*. 2017.

AMANZOUAGHENE, Nadia *et al.* Azithromycin disrupts apicoplast biogenesis in replicating and dormant liver stages of the relapsing malaria parasites *Plasmodium vivax* and *Plasmodium cynomolgi*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 63, n. 5, 1 maio 2024.

ANWAR, Saleha *et al.* Targeting pyruvate dehydrogenase kinase signaling in the development of effective cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, v. 1876, n. 1, p. 188568, 2021.

ARISUE, Nobuko; HASHIMOTO, Tetsuo. Phylogeny and evolution of apicoplasts and apicomplexan parasites. *Parasitology International*, v. 64, n. 3, p. 254–259, 2015.

ATTIAS, Márcia *et al.* *The life-cycle of Toxoplasma gondii reviewed using animations. Parasites and Vectors*. 2020.

AZAMI, Sanaz Jafarpour *et al.* *Unravelling Toxoplasma treatment: conventional drugs toward nanomedicine. World Journal of Microbiology and Biotechnology.* Springer Science and Business Media B.V. 1 mar. 2021.

BABU, M. Madan. The contribution of intrinsically disordered regions to protein function, cellular complexity, and human disease. *Biochemical Society Transactions*, v. 44, n. 5, p. 1185–1200, 2016.

BAKER, Jason C. *et al.* Marked differences between two isoforms of human pyruvate dehydrogenase kinase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 21, 2000.

BANGOURA, Berit; BHUIYA, Md Ashrafal Islam; KILPATRICK, Michelle. *Eimeria infections in domestic and wild ruminants with reference to control options in domestic ruminants. Parasitology Research.* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. 1 ago. 2022.

BEN-HARARI, Ruben R.; GOODWIN, Elizabeth; CASOY, Julio. *Adverse Event Profile of Pyrimethamine-Based Therapy in Toxoplasmosis: A Systematic Review. Drugs in R and D.* 2017.

BERTRANPETIT, Emilie *et al.* Phylogeography of *Toxoplasma gondii* points to a South American origin. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 48, p. 150–155, 2017.

BHANDARY, Suman; AGUAN, Kripamoy. Pyruvate dehydrogenase complex deficiency and its relationship with epilepsy frequency – An overview. *Epilepsy Research*, v. 116, p. 40–52, 1 out. 2015. Acesso em: 13 out. 2024.

BLADER, Ira J.; KOSHY, Anita A. *Toxoplasma gondii development of its replicative niche: In its host cell and beyond. Eukaryotic Cell.* American Society for Microbiology. 1 ago. 2014.

BLAIZOT, Romain *et al.* Pediatric Amazonian Toxoplasmosis Caused by Atypical Strains in French Guiana, 2002-2017. *Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 38, n. 3, p. E39–E42, 1 mar. 2019.

BLUME, Martin *et al.* A *Toxoplasma gondii* gluconeogenic enzyme contributes to robust central carbon metabolism and is essential for replication and virulence. *Cell Host and*

Microbe, v. 18, n. 2, p. 210–220, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.01.001>>.

BOIVIN, Stephane; KOZAK, Sandra; MEIJERS, Rob. *Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. Protein Expression and Purification*. 2013.

BOKHARAEI-SALIM, Farah *et al.* Evaluation of a PCR assay for diagnosis of toxoplasmosis in serum and peripheral blood mononuclear cell among HIV/AIDS patients. *Journal of Parasitic Diseases*, v. 44, n. 1, p. 159–165, 1 mar. 2020.

BOLLANI, Lina *et al.* *Congenital Toxoplasmosis: The State of the Art. Frontiers in Pediatrics*. Frontiers Media S.A.6 jul. 2022.

BRITO, Ramayana Morais de Medeiros *et al.* *Genetic diversity of Toxoplasma gondii in South America: occurrence, immunity, and fate of infection. Parasites and Vectors*. BioMed Central Ltd.1 dez. 2023.

BULTHUIS, Elianne P. *et al.* *Mitochondrial Morphofunction in Mammalian Cells. Antioxidants and Redox Signaling*. Mary Ann Liebert Inc.20 jun. 2019.

CABRAL MONICA, Thaís *et al.* Socioeconomic factors associated with infection by *Toxoplasma gondii* and *Toxocara canis* in children. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 69, n. 3, p. 1589–1595, 1 maio 2022.

CAPELLA-GUTIÉRREZ, Salvador; SILLA-MARTÍNEZ, José M.; GABALDÓN, Toni. trimAl: A tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, v. 25, n. 15, p. 1972–1973, ago. 2009.

CERUTTI, Aude; BLANCHARD, Nicolas; BESTEIRO, Sébastien. *The bradyzoite: A key developmental stage for the persistence and pathogenesis of toxoplasmosis. Pathogens*. MDPI AG.1 mar. 2020.

CHHIMPA, Neeraj *et al.* *The Novel Role of Mitochondrial Citrate Synthase and Citrate in the Pathophysiology of Alzheimer's Disease. Journal of Alzheimer's Disease*. 2023

CLEOPHAS, Ton J.; ZWINDERMAN, Aeilko H. Non-parametric Tests for Three or More Samples (Friedman and Kruskal-Wallis). *Clinical Data Analysis on a Pocket Calculator*. 2016.

COCCARO, Emil F. *et al.* Toxoplasma gondii infection: Relationship with aggression in psychiatric subjects. *Journal of Clinical Psychiatry*, v. 77, n. 3, p. 334–341, 1 mar. 2016.

COHEN, Philip; CROSS, Darren; JÄNNE, Pasi A. Kinase drug discovery 20 years after imatinib: progress and future directions. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 20, n. 7, p. 551–569, 2021.

CONCEIÇÃO, Aline Reetz *et al.* Ocular Findings in Infants with Congenital Toxoplasmosis after a Toxoplasmosis Outbreak. *Ophthalmology*, v. 128, n. 9, p. 1346–1355, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2021.03.009>>.

CUMMINS, Philip M.; ROCHFORT, Keith D.; O'CONNOR, Brendan F. Ion-exchange chromatography: Basic principles and application. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., 2017. v. 1485. p. 209–223.

DAHIYA, Rashmi *et al.* Investigation of inhibitory potential of quercetin to the pyruvate dehydrogenase kinase 3: Towards implications in anticancer therapy. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 136, p. 1076–1085, 1 set. 2019.

DANNE, Jillian C. *et al.* Alveolate mitochondrial metabolic evolution: Dinoflagellates force reassessment of the role of parasitism as a driver of change in apicomplexans. *Molecular Biology and Evolution*, v. 30, n. 1, p. 123–139, jan. 2013.

DE MEEÛS D'ARGENTEUIL, Constance *et al.* Flexibility of equine bioenergetics and muscle plasticity in response to different types of training: An integrative approach, questioning existing paradigms. *PLoS ONE*, v. 16, n. 4 April, 1 abr. 2021.

DE MIGUEL, N.; ECHEVERRIA, P. C.; ANGEL, S. O. Differential subcellular localization of members of the Toxoplasma gondii small heat shock protein family. *Eukaryotic Cell*, v. 4, n. 12, p. 1990–1997, dez. 2005.

DE-LA-TORRE, Alejandra *et al.* Severe South American Ocular Toxoplasmosis Is Associated with Decreased Ifn- γ /Il-17a and Increased Il-6/Il-13 Intraocular Levels. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 11, 2013.

DE-LA-TORRE, Alejandra *et al.* *Therapy for ocular toxoplasmosis. Ocular Immunology and Inflammation*. out. 2011.

DELOOZ, Laurent *et al.* Emergence of besnoitia besnoiti in Belgium. *Pathogens*, v. 10, n. 12, 1 dez. 2021.

DENG, Bin *et al.* *Proteomics Applications in Toxoplasma gondii: Unveiling the Host-Parasite Interactions and Therapeutic Target Discovery. Pathogens*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). 1 jan. 2024.

DESMETTRE, T. *Toxoplasmosis and behavioural changes. Journal Francais d'Ophthalmologie*. Elsevier Masson SAS. 1 mar. 2020.

DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, Olgica *et al.* *Toxoplasmosis: Overview from a One Health perspective. Food and Waterborne Parasitology*. 2019.

DONGCHAO, Zhang; NING, Jiang; QIJUN, Chen. Loss of rhopty protein 9 impeded *Toxoplasma gondii* infectivity. *Acta Tropica*, v. 207, 2020.

DU, Chuang *et al.* The Role of Branched-Chain Amino Acids and Branched-Chain α -Keto Acid Dehydrogenase Kinase in Metabolic Disorders. *Frontiers in Nutrition*, v. 9, 18 jul. 2022.

DUBEY, J. P. The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods*. Elsevier, 2020. p. 1–19.

DUNAY, Ildiko Rita *et al.* *Treatment of toxoplasmosis: Historical perspective, animal models, and current clinical practice. Clinical Microbiology Reviews*. 2018.

ELAAGIP, Arwa; ABSALON, Sabrina; FLORENTIN, Anat. *Apicoplast Dynamics During Plasmodium Cell Cycle. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A. 29 abr. 2022.

ELAHI, Rubayet; PRIGGE, Sean T. *New insights into apicoplast metabolism in blood-stage malaria parasites*. *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd. 1 fev. 2023.

FABIANI, Silvia *et al.* Ocular toxoplasmosis, an overview focusing on clinical aspects. *Acta Tropica*, v. 225, p. 106180, 1 jan. 2022. Acesso em: 9 out. 2024.

FERRARINI, Mariana Galvão *et al.* Dichloroacetate and Pyruvate Metabolism: Pyruvate Dehydrogenase Kinases as Targets Worth Investigating for Effective Therapy of Toxoplasmosis. *mSphere*, v. 6, n. 1, 2021.

FLEGR, Jaroslav *et al.* Toxoplasmosis - A global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS ONE*, v. 9, n. 3, 2014.

FLEIGE, Tobias *et al.* Carbohydrate metabolism in the *Toxoplasma gondii* apicoplast: Localization of three glycolytic isoenzymes, the single pyruvate dehydrogenase complex, and a plastid phosphate translocator. *Eukaryotic Cell*, v. 6, n. 6, p. 984–996, 2007.

FLORES, Carlos *et al.* Epidemiological aspects of maternal and congenital toxoplasmosis in Panama. *Pathogens*, v. 10, n. 6, p. 1–14, 2021.

FORSBERG, Bjoern O. The structure and evolutionary diversity of the fungal E3-binding protein. *Communications Biology*, v. 6, n. 1, 1 dez. 2023.

FOTH, Bernardo J. *et al.* The malaria parasite *Plasmodium falciparum* has only one pyruvate dehydrogenase complex, which is located in the apicoplast. *Molecular Microbiology*, v. 55, n. 1, 2005.

FRANK, René A.W. *et al.* Crystal Structure of the E1 Component of the *Escherichia coli* 2-Oxoglutarate Dehydrogenase Multienzyme Complex. *Journal of Molecular Biology*, v. 368, n. 3, p. 639–651, 4 maio 2007.

GHARAMTI, Amal A. *et al.* Acute toxoplasma dissemination with encephalitis in the era of biological therapies. *Open Forum Infectious Diseases*, v. 5, n. 11, 1 nov. 2018.

GOERDELER, Felix; SEEBERGER, Peter H.; MOSCOVITZ, Oren. *Unveiling the Sugary Secrets of Plasmodium Parasites. Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A. 16 jul. 2021.

GOMES, Priscila S.F.C.; GOMES, Diego E.B.; BERNARDI, Rafael C. Protein structure prediction in the era of AI: Challenges and limitations when applying to in silico force spectroscopy. *Frontiers in Bioinformatics*, v. 2, 2022.

GORT, Steve; MALOY, Stanley. *Purification of a hexahistidine-tagged protein using L-histidine as the eluent. Technical Tips Online*. 1998. Disponível em: <<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>>.

GRIFFITH, Michael B.; PEARCE, Camille S.; HEASLIP, Aoife T. *Dense granule biogenesis, secretion, and function in Toxoplasma gondii. Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2022.

HALL, Martin. Size Exclusion Chromatography (SEC). *Biopharmaceutical Processing: Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes*. Elsevier, 2018. p. 421–432.

HAN, Yongmei *et al.* Screening of compound libraries for inhibitors of Toxoplasma growth and invasion. *Parasitology Research*, v. 119, n. 5, p. 1675–1681, 1 maio 2020.

HANSEN, Grace E.; GIBSON, Gary E. *The α -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex as a Hub of Plasticity in Neurodegeneration and Regeneration. International Journal of Molecular Sciences*. MDPI. 1 out. 2022.

HAWES, John W. *et al.* Production of Recombinant E1 Component of Branched-Chain α -Keto Acid Dehydrogenase Complex. *Methods in Enzymology*, v. 324, p. 200–207, 1 jan. 2000. Acesso em: 12 out. 2024.

HAWES, John W. *et al.* Roles of amino acid residues surrounding phosphorylation site 1 of branched-chain α -ketoacid dehydrogenase (BCKDH) in catalysis and phosphorylation site recognition by BCKDH kinase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 52, p. 31071–31076, 29 dez. 1995.

HE, Yuchen *et al.* Nuclear localization of metabolic enzymes in immunity and metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. Elsevier B.V. 1 dez. 2017.

HEINEMANN-YERUSHALMI, Lia *et al.* BCKDK regulates the TCA cycle through PDC in the absence of PDK family during embryonic development. *Developmental Cell*, v. 56, n. 8, p. 1182- 1194.e6, 19 abr. 2021.

HEVLER, Johannes F. *et al.* MRPS36 provides a structural link in the eukaryotic 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Open Biology*, v. 13, n. 3, 1 mar. 2023.

HUANG, Yadong *et al.* A quantitative mass spectrometry-based approach for identifying protein kinase clients and quantifying kinase activity. *Analytical Biochemistry*, v. 402, n. 1, p. 69–76, 2010.

HURD, Thomas R. *et al.* Inactivation of pyruvate dehydrogenase kinase 2 by mitochondrial reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 42, p. 35153–35160, 12 out. 2012.

HUYNH, My Hang; CARRUTHERS, Vern B. Toxoplasma gondii excretion of glycolytic products is associated with acidification of the parasitophorous vacuole during parasite egress. *PLoS Pathogens*, v. 18, n. 5, p. 1–30, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1010139>>.

INOUE, Alexandre Haruo *et al.* Proteomics Uncovers Novel Components of an Interactive Protein Network Supporting RNA Export in Trypanosomes. *Molecular and Cellular Proteomics*, v. 21, n. 3, 1 mar. 2022.

JACOT, Damien *et al.* Apicomplexan Energy Metabolism: Carbon Source Promiscuity and the Quiescence Hyperbole. *Trends in Parasitology*, v. 32, n. 1, p. 56–70, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2015.09.001>>.

JENG, Jiingjau; HUH, Tae Lin; SONG, Byoung J. Production of an enzymatically active E1 component of human pyruvate dehydrogenase complex in Escherichia coli: Supporting role of E1 β subunit in E1 activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 203, n. 1, 1994.

KANEV, Georgi K. *et al.* *The Landscape of Atypical and Eukaryotic Protein Kinases. Trends in Pharmacological Sciences.* 2019.

KATO, Masato *et al.* Distinct Structural Mechanisms for Inhibition of Pyruvate Dehydrogenase Kinase Isoforms by AZD7545, Dichloroacetate, and Radicol. *Structure*, v. 15, n. 8, p. 992–1004, 14 ago. 2007.

KATOH, Kazutaka; ROZEWICKI, John; YAMADA, Kazunori D. MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, v. 20, n. 4, p. 1160–1166, 27 mar. 2018.

KATRIS, Nicholas J. *et al.* The Apical Complex Provides a Regulated Gateway for Secretion of Invasion Factors in *Toxoplasma*. *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 4, 2014.

KELLEY, Lawrence A. *et al.* The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, v. 10, n. 6, p. 845–858, 30 jun. 2015.

KHAN, Asis *et al.* Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *International Journal for Parasitology*, v. 41, n. 6, p. 645–655, maio 2011.

KIMMEL, Jessica *et al.* *Proximity-dependent biotinylation approaches to study apicomplexan biology. Molecular Microbiology.* John Wiley and Sons Inc. 1 mar. 2022.

KLYUYEVA, Alla; TUGANOVA, Alina; POPOV, Kirill M. Allosteric coupling in pyruvate dehydrogenase kinase 2. *Biochemistry*, v. 47, n. 32, 2008.

KLYUYEVA, Alla; TUGANOVA, Alina; POPOV, Kirill M. Amino acid residues responsible for the recognition of dichloroacetate by pyruvate dehydrogenase kinase 2. *FEBS Letters*, v. 581, n. 16, p. 2988–2992, 26 jun. 2007.

KNOECHEL, Thorsten R. *et al.* Regulatory roles of the N-terminal domain based on crystal structures of human pyruvate dehydrogenase kinase 2 containing physiological and synthetic ligands. *Biochemistry*, v. 45, n. 2, p. 402–415, 17 jan. 2006.

KOLTAI, Tomas; FLIEGEL, Larry. *Dichloroacetate for Cancer Treatment: Some Facts and Many Doubts. Pharmaceuticals*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). 1 jun. 2024.

KOROTCHKINA, Liubov G.; PATEL, Mulchand S. Binding of pyruvate dehydrogenase to the core of the human pyruvate dehydrogenase complex. *FEBS Letters*, v. 582, n. 3, 2008.

KULAŠ, Antonija *et al.* Ciliates (Alveolata, Ciliophora) as bioindicators of environmental pressure: A karstic river case. *Ecological Indicators*, v. 124, 1 maio 2021.

KUO, Yu Hsuan *et al.* Overexpression of Pyruvate Dehydrogenase Kinase-3 Predicts Poor Prognosis in Urothelial Carcinoma. *Frontiers in Oncology*, v. 11, 13 set. 2021.

KUZNETSOV, Dmitry *et al.* OrthoDB v11: annotation of orthologs in the widest sampling of organismal diversity. *Nucleic Acids Research*, v. 51, n. 1 D, p. D445–D451, 6 jan. 2023.

LEI, Jie *et al.* Plastidic pyruvate dehydrogenase complex E1 component subunit Alpha1 is involved in galactolipid biosynthesis required for amyloplast development in rice. *Plant Biotechnology Journal*, v. 20, n. 3, p. 437–453, 1 mar. 2022.

LI, Chunqiong; YANG, Quanjun; ZHANG, Li. Identification of putative allosteric inhibitors of BCKDK via virtual screening and biological evaluation. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 39, n. 1, 2023.

LIANG, Xiaohan *et al.* Acquisition of exogenous fatty acids renders apicoplast-based biosynthesis dispensable in tachyzoites of *Toxoplasma*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 295, n. 22, p. 7743–7752, 28 maio 2020.

LIBERTI, Maria V.; LOCASALE, Jason W. *The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Ltd. 1 mar. 2016.

LIMENITAKIS, Julien *et al.* The 2-methylcitrate cycle is implicated in the detoxification of propionate in *Toxoplasma gondii*. *Molecular Microbiology*, v. 87, n. 4, p. 894–908, fev. 2013.

LIN, Jer Sheng; ALI, Jemal; LAI, Erh Min. Protein-Protein Interactions: Co-immunoprecipitation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 2715, 2024.

LOW, Leanne M.; STANISIC, Danielle I.; GOOD, Michael F. Exploiting the apicoplast: apicoplast-targeting drugs and malaria vaccine development. *Microbes and Infection*, v. 20, n. 9–10, p. 477–483, 1 out. 2018.

LYU, Congcong *et al.* Two enzymes contribute to citrate production in the mitochondrion of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 300, n. 8, 1 ago. 2024.

MACHADO, Ricardo Andrez *et al.* Prediction of the epitopes by selecting amino acid residues with specific physical-chemical and structural attributes available in Blue Star Sting database. *Immunome Res*, v. 10, 2014.

MAILLOUX, Ryan J. *The emerging importance of the α -keto acid dehydrogenase complexes in serving as intracellular and intercellular signaling platforms for the regulation of metabolism*. *Redox Biology*. Elsevier B.V. 1 jun. 2024.

MAITY, Hiranmay; BAIDYA, Lipika; REDDY, Govardhan. Salt-Induced Transitions in the Conformational Ensembles of Intrinsically Disordered Proteins. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 126, n. 32, p. 5959–5971, 18 ago. 2022.

MAKOWSKI, Matthew M. *et al.* Cross-linking immunoprecipitation-MS (xIP-MS): Topological analysis of chromatin-associated protein complexes using single affinity purification. *Molecular and Cellular Proteomics*, v. 15, n. 3, 2016.

MAREZE, Marcelle *et al.* Socioeconomic vulnerability associated to *Toxoplasma gondii* exposure in southern Brazil. *PLoS ONE*, v. 14, n. 2, 2019.

MARINO, Nicole D.; BOOTHROYD, John C. *Toxoplasma* growth in vitro is dependent on exogenous tyrosine and is independent of AAH2 even in tyrosine-limiting conditions. *Experimental Parasitology*, v. 176, p. 52–58, 1 maio 2017.

MARTINS PINTO, M. *et al.* The Warburg effect and mitochondrial oxidative phosphorylation: Friends or foes? *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, v. 1864, n. 1, 1 jan. 2023.

MATHUPALA, Saroj P.; KO, Young H.; PEDERSEN, Peter L. *The pivotal roles of mitochondria in cancer: Warburg and beyond and encouraging prospects for effective therapies. Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 2010.

MATHUR, Varsha; WAKEMAN, Kevin C.; KEELING, Patrick J. Parallel functional reduction in the mitochondria of apicomplexan parasites. *Current Biology*, v. 31, n. 13, p. 2920- 2928.e4, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.04.028>>.

MCAULEY, James B. Congenital toxoplasmosis. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, v. 3, n. SUPPL1, p. 30–35, 2014.

MCFADDEN, Geoffrey I. Origin and evolution of plastids and photosynthesis in eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 6, n. 4, 2014.

MENG, Elaine C. *et al.* UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis. *Protein Science*, v. 32, n. 11, 1 nov. 2023.

MINUZZI, Camila Encarnação *et al.* Contaminated water confirmed as source of infection by bioassay in an outbreak of toxoplasmosis in South Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 68, n. 2, p. 767–772, 1 mar. 2021.

MOGI, Tatsushi; KITA, Kiyoshi. *Diversity in mitochondrial metabolic pathways in parasitic protists Plasmodium and Cryptosporidium. Parasitology International*. 2010.

MONTAZERI, Mahbobeh *et al.* A systematic review of in vitro and in vivo activities of anti-toxoplasma drugs and compounds (2006-2016). *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n. JAN, 2017.

MOONEY, Brian P.; MIERNYK, Jan A.; RANDALL, Douglas D. *The complex fate of α -ketoacids. Annual Review of Plant Biology*. 2002

MORRISSETTE, Naomi; GUBBELS, Marc Jan. The Toxoplasma Cytoskeleton. Structures, Proteins and Processes. *Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods: Second Edition*. 2013. p. 455–503.

MÜLLER, Urs B.; HOWARD, Jonathan C. *The impact of Toxoplasma gondii on the mammalian genome. Current Opinion in Microbiology.* 2016.

NAIK, Rajashri R.; SHAKYA, Ashok K. Exploring the chemotherapeutic potential of currently used kinase inhibitors: An update. *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, n. January, p. 1–23, 2023.

NELSON, David L.; COX, Michael M. *Lehninger Principles of Biochemistry 7th. W.H. Freeman and Company*, v. 2, 2017.

NEVELING, Ute; BRINGER-MEYER, Stephanie; SAHM, Hermann. *Gene and subunit organization of bacterial pyruvate dehydrogenase complexes.* 1998.

NICOLLE, C; MANCEAUX, L. Sur un Protozoaire nouveau du Gondi (*Toxoplasma* n. gen.). 1909.

NICOLLE, Charles; MANCEAUX, Louis Herbert. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences*, v. 147, 1908.

NONG, Xiazhen *et al.* *The mechanism of branched-chain amino acid transferases in different diseases: Research progress and future prospects. Frontiers in Oncology.* Frontiers Media S.A. 2 set. 2022.

NZILA, Alexis; OKOMBO, John; MOLLOY, Anne M. *Impact of folate supplementation on the efficacy of sulfadoxine/pyrimethamine in preventing malaria in pregnancy: The potential of 5-methyl-tetrahydrofolate. Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* fev. 2014.

O'BRIEN, Stephen J. *et al.* *State of cat genomics. Trends in Genetics.* 2008.

OPPENHEIM, Rebecca D. *et al.* BCKDH: The Missing Link in Apicomplexan Mitochondrial Metabolism Is Required for Full Virulence of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium berghei*. *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 7, 2014.

PACHECO, M. Andreína; ESCALANTE, Ananias A. Origin and diversity of malaria parasites and other Haemosporida. *Trends in Parasitology*, v. 39, n. 7, p. 501–516, 1 jul. 2023. Acesso em: 22 dez. 2024.

PAPPAS, Georgios; ROUSSOS, Nikos; FALAGAS, Matthew E. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, v. 39, n. 12, p. 1385–1394, 2009.

PAYSAN-LAFOSSE, Typhaine *et al.* InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research*, v. 51, n. D1, p. D418–D427, 6 jan. 2023.

PENG, Cheng *et al.* The impact of the branched-chain ketoacid dehydrogenase complex on amino acid homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v. 169, n. 3, p. 1807–1820, 1 nov. 2015.

PORTES, Juliana A. *et al.* Intracellular life of protozoan *Toxoplasma gondii*: Parasitophorous vacuole establishment and survival strategies. *Biocell*, v. 47, n. 4, p. 929–950, 2023.

POSSENTI, Alessia *et al.* Global proteomic analysis of the oocyst/sporozoite of *Toxoplasma gondii* reveals commitment to a host-independent lifestyle. *BMC Genomics*, v. 14, n. 1, 15 mar. 2013.

QIAN, Jiahui *et al.* Mitochondrial ADP/ATP Carrier 1 Is Important for the Growth of *Toxoplasma* Tachyzoites. *Microbiology Spectrum*, v. 11, n. 3, 15 jun. 2023.

RAZAVI, Seyed Mostafa *et al.* Host oxidative stress in piroplasmosis: A review in domestic animals. *Veterinary Parasitology*, v. 322, p. 110011, 1 out. 2023. Acesso em: 22 dez. 2024.

ROBERT-GANGNEUX, Florence; DARDÉ, Marie Laure. *Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clinical Microbiology Reviews*. 2012.

ROBIN, Tal; REUVENI, Shlomi; URBAKH, Michael. Single-molecule theory of enzymatic inhibition. *Nature Communications*, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018.

ROGER, Andrew J.; MUÑOZ-GÓMEZ, Sergio A.; KAMIKAWA, Ryoma. *The Origin and Diversification of Mitochondria*. *Current Biology*. Cell Press.6 nov. 2017.

ROSADO, Diego *et al.* Associations between *Toxoplasma gondii* seropositivity and psychopathological manifestations in schizophrenic patients: A single-center study from Ecuador. *PLoS ONE*, v. 19, n. 2 FEBRUARY, 1 fev. 2024.

RUECKERT, Sonja; PIPALIYA, Shweta V.; DACKS, Joel B. Evolution: Parallel Paths to Parasitism in the Apicomplexa. *Current Biology*, v. 29, n. 17, p. R836–R839, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.07.047>>.

RUFF, Kiersten M.; PAPPU, Rohit V. *AlphaFold and Implications for Intrinsically Disordered Proteins*. *Journal of Molecular Biology*. Academic Press.1 out. 2021.

RYALL, Kim; HARPER, James T.; KEELING, Patrick J. Plastid-derived Type II fatty acid biosynthetic enzymes in chromists. *Gene*, v. 313, n. 1–2, p. 139–148, 14 ago. 2003.

SALCEDO-SORA, J. Enrique *et al.* The proliferating cell hypothesis: A metabolic framework for Plasmodium growth and development. *Trends in Parasitology*, v. 30, n. 4, p. 170–175, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2014.02.001>>.

SANTOS, Denis Amilton Dos *et al.* *Protein kinases on carbon metabolism: potential targets for alternative chemotherapies against toxoplasmosis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A. 2023.

SANTOS SOUZA, H. F. *et al.* *Branched chain amino acids catabolism as a source of new drug targets in pathogenic protists*. *Experimental Parasitology*. Academic Press Inc.1 jun. 2023.

SATO, Shigeharu. *The apicomplexan plastid and its evolution*. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011.

SCHNARRENBERGER, Claus; MARTIN, William. Evolution of the enzymes of the citric acid cycle and the glyoxylate cycle of higher plants: A case study of endosymbiotic gene transfer. *European Journal of Biochemistry*, v. 269, n. 3, p. 868–883, 2002.

SCHREINER, Mark E. *et al.* E1 enzyme of the pyruvate dehydrogenase complex in *Corynebacterium glutamicum*: Molecular analysis of the gene and phylogenetic aspects. *Journal of Bacteriology*, v. 187, n. 17, p. 6005–6018, set. 2005.

SCUSSEL, Rahisa *et al.* Peptide-Integrated Superparamagnetic Nanoparticles for the Identification of Epitopes from SARS-CoV-2 Spike and Nucleocapsid Proteins. *ACS Applied Nano Materials*, v. 5, n. 1, 2022.

SEEBER, Frank *et al.* *The apicoplast and mitochondrion of Toxoplasma gondii*. LTD, 2020.

SEEBER, Frank; LIMENITAKIS, Julien; SOLDATI-FAVRE, Dominique. *Apicomplexan mitochondrial metabolism: a story of gains, losses and retentions*. *Trends in Parasitology*. out. 2008.

SHEINER, Lilach *et al.* *Toxoplasma gondii* transmembrane microneme proteins and their modular design. *Molecular Microbiology*, v. 77, n. 4, p. 912–929, 2010.

SHUKLA, Anurag *et al.* Glycolysis is important for optimal asexual growth and formation of mature tissue cysts by *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, v. 48, n. 12, p. 955–968, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.05.013>>.

SHWAB, E. Keats *et al.* Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology*, v. 141, n. 4, p. 453–461, 2 abr. 2014.

SIBLEY, L David; DAVID SIBLEY, L. *Invasion and intracellular survival by protozoan parasites*. *Immunological Reviews*. 2011.

SIMPSON, A. G.B.; EGLIT, Y. Protist Diversification. *Encyclopedia of Evolutionary Biology*, p. 344–360, 1 jan. 2016. Acesso em: 3 jan. 2025.

SMITH, Denise M. Protein Separation and Characterization Procedures. 2010. p. 261–281.

SOKOL-BORRELLI, Sarah L.; COOMBS, Rachel S.; BOYLE, Jon P. *A Comparison of Stage Conversion in the Coccidian Apicomplexans Toxoplasma gondii, Hammondia hammondi, and Neospora caninum. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* Frontiers Media S.A., 3 dez. 2020.

SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uoma. *Rev Soc Sci Sao Paulo*, n. 3, p. 109–112, 1908.

STACPOOLE, Peter W. *Therapeutic Targeting of the Pyruvate Dehydrogenase Complex/Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDC/PDK) Axis in Cancer. Journal of the National Cancer Institute.* 2017.

STACPOOLE, Peter W.; MCCALL, Charles E. The pyruvate dehydrogenase complex: Life's essential, vulnerable and druggable energy homeostat. *Mitochondrion*, maio 2023.

STELZER, S. *et al. Toxoplasma gondii infection and toxoplasmosis in farm animals: Risk factors and economic impact. Food and Waterborne Parasitology.* Elsevier Inc. 1 jun. 2019.

STRIEPEN, Boris. The apicoplast: A red alga in human parasites. *Essays in Biochemistry*, v. 51, n. 1, p. 111–125, 2011.

STRUMILLO, Marta J. *et al. Conserved phosphorylation hotspots in eukaryotic protein domain families. Nature Communications*, v. 10, n. 1, 2019.

STUDIER, F. William. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein expression and purification*, v. 41, n. 1, p. 207–234, 2005.

SU, Chunlei *et al. Globally diverse Toxoplasma gondii isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109, n. 15, p. 5844–5849, 10 abr. 2012.

SZABO, Eszter *et al.* *Mitochondrial Alpha-Keto Acid Dehydrogenase Complexes: Recent Developments on Structure and Function in Health and Disease. Sub-cellular biochemistry.* 2024.

TAO, Shigui; TAO, Kunlin; CAI, Xiaoyong. Pan-cancer analysis reveals PDK family as potential indicators related to prognosis and immune infiltration. *Scientific Reports*, v. 14, n. 1, 1 dez. 2024.

TARCZEWSKA, Aneta; GREB-MARKIEWICZ, Beata. The significance of the intrinsically disordered regions for the functions of the bHLH transcription factors. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 21, 2019.

THELEN, Jay J; MIERNYK, Jan A; RANDALL, Douglas D. *Pyruvate dehydrogenase kinase from Arabidopsis thaliana : a protein histidine kinase that phosphorylates serine residues.* *Biochem. J.* 2000.

TIERSMA, Jiske F. *et al.* Pyruvate Dehydrogenase Kinase Inhibition by Dichloroacetate in Melanoma Cells Unveils Metabolic Vulnerabilities. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 7, 1 abr. 2022.

TIKHONENKOV, Denis V. *et al.* On the origin of TSAR: Morphology, diversity and phylogeny of Telsonemia. *Open Biology*, v. 12, n. 3, 2022.

TOVAR-MÉNDEZ, Alejandro *et al.* Analysis of the catalytic mechanism of pyruvate dehydrogenase kinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 434, n. 1 SPEC. ISS., p. 159–168, 2005.

TOVAR-MÉNDEZ, Alejandro; MIERNYK, Jan A.; RANDALL, Douglas D. *Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in plant cells.* *European Journal of Biochemistry.* mar. 2003.

TRIFINOPOULOS, Jana *et al.* W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research*, v. 44, n. W1, p. W232–W235, 8 jul. 2016.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, v. 31, n. 2, p. 455–461, 30 jan. 2010.

UKKONEN, Kaisa *et al.* Use of slow glucose feeding as supporting carbon source in lactose autoinduction medium improves the robustness of protein expression at different aeration conditions. *Protein Expression and Purification*, v. 91, n. 2, p. 147–154, 2013.

VAN HOVE, Johan L.K. *et al.* Succinyl-coa ligase deficiency: A mitochondrial hepatoencephalomyopathy. *Pediatric Research*, v. 68, n. 2, 2010.

VAN NIEKERK, David D. *et al.* Targeting glycolysis in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *FEBS Journal*, v. 283, n. 4, p. 634–646, 1 fev. 2016.

VANWEERT, Froukje; SCHRAUWEN, Patrick; PHIELIX, Esther. *Role of branched-chain amino acid metabolism in the pathogenesis of obesity and type 2 diabetes-related metabolic disturbances BCAA metabolism in type 2 diabetes. Nutrition and Diabetes*. Springer Nature. 1 dez. 2022.

VANWORMER, Elizabeth *et al.* Using Molecular Epidemiology to Track *Toxoplasma gondii* from Terrestrial Carnivores to Marine Hosts: Implications for Public Health and Conservation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 5, 2014.

VOTÝPKA, Jan *et al.* Apicomplexa. In: ARCHIBALD JOHN M. *et al.* (Org.). *Handbook of the Protists*. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 1–58.

WALLON, Martine; PEYRON, François. *Effect of Antenatal Treatment on the Severity of Congenital Toxoplasmosis. Clinical Infectious Diseases*. 2015.

WALSH, Daniel *et al.* *Toxoplasma* metabolic flexibility in different growth conditions. *Trends in Parasitology*. 2022.

WALZER, Katelyn A. *et al.* *Hammondia hammondi*, an avirulent relative of *Toxoplasma gondii*, has functional orthologs of known *T. gondii* virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, n. 18, p. 7446–7451, 30 abr. 2013.

WANG, Xiuxiu *et al.* *Pyruvate dehydrogenase kinases (PDKs): An overview toward clinical applications. Bioscience Reports*. Portland Press Ltd. 1 mar. 2021.

WANG, Ze Dong *et al.* Toxoplasma gondii infection in immunocompromised patients: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, 2017.

WEBB, S. David. The Great American Biotic Interchange: Patterns and processes. 2006, p. 245–257.

WHITE, Phillip J. *et al.* The BCKDH Kinase and Phosphatase Integrate BCAA and Lipid Metabolism via Regulation of ATP-Citrate Lyase. *Cell Metabolism*, v. 27, n. 6, p. 1281-1293.e7, 5 jun. 2018.

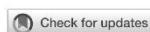
WOHLFERT, Elizabeth A.; BLADER, Ira J.; WILSON, Emma H. *Brains and Brawn: Toxoplasma Infections of the Central Nervous System and Skeletal Muscle. Trends in Parasitology.* 2017.

XIA, Ningbo *et al.* Pyruvate homeostasis as a determinant of parasite growth and metabolic plasticity in toxoplasma gondii. *mBio*, v. 10, n. 3, 2019.

ZHANG, Wen *et al.* Identification of Novel Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 (PDK1) Inhibitors by Kinase Activity-Based High-Throughput Screening for Anticancer Therapeutics. *ACS Combinatorial Science*, v. 20, n. 11, p. 660–671, 12 nov. 2018.

ZHANG, Yuanyuan *et al.* *Lactate: The Mediator of Metabolism and Immunosuppression.* *Frontiers in Endocrinology.* Frontiers Media S.A. 9 jun. 2022.

ANEXO I – Artigo de revisão publicado (Frontiers in Cellular and Infection Microbiology)



OPEN ACCESS

EDITED BY
Ummer Rashid Zargar,
Independent Researcher, Anantnag, India

REVIEWED BY
Carsten Lüder,
University Medical Center Göttingen,
Germany
Victoria Jeffers,
University of New Hampshire, United States
Aqib Magray,
Clemson University, United States

*CORRESPONDENCE
Andréa Rodrigues Ávila
andrea.avila@fiocruz.br

RECEIVED 27 February 2023
ACCEPTED 02 May 2023
PUBLISHED 23 May 2023

CITATION
dos Santos DA, Souza HFS, Silber AM,
Souza TACB and Ávila AR (2023) Protein
kinases on carbon metabolism: potential
targets for alternative chemotherapies
against toxoplasmosis.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 13:1175409.
doi: 10.3389/fcimb.2023.1175409

COPYRIGHT
© 2023 dos Santos, Souza, Silber, Souza and
Ávila. This is an open-access article
distributed under the terms of the [Creative
Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The
use, distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication in
this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Protein kinases on carbon metabolism: potential targets for alternative chemotherapies against toxoplasmosis

Denis Amilton dos Santos¹, Higo Fernando Santos Souza²,
Ariel M. Silber², Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza³
and Andréa Rodrigues Ávila^{1*}

¹Laboratório de Pesquisa em Apicomplexa, Instituto Carlos Chagas, Fiocruz, Curitiba, Brazil,
²Laboratory of Biochemistry of Trypanosomes (LabTryp), Departamento de Parasitologia, Instituto de
Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ³Laboratório de Proteômica
Estrutural e Computacional, Instituto Carlos Chagas, Fiocruz, Curitiba, Brazil

The apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* is the causative agent of toxoplasmosis, a global disease that significantly impacts human health. The clinical manifestations are mainly observed in immunocompromised patients, including ocular damage and neuronal alterations leading to psychiatric disorders. The congenital infection leads to miscarriage or severe alterations in the development of newborns. The conventional treatment is limited to the acute phase of illness, without effects in latent parasites; consequently, a cure is not available yet. Furthermore, considerable toxic effects and long-term therapy contribute to high treatment abandonment rates. The investigation of exclusive parasite pathways would provide new drug targets for more effective therapies, eliminating or reducing the side effects of conventional pharmacological approaches. Protein kinases (PKs) have emerged as promising targets for developing specific inhibitors with high selectivity and efficiency against diseases. Studies in *T. gondii* have indicated the presence of exclusive PKs without homologs in human cells, which could become important targets for developing new drugs. Knockout of specific kinases linked to energy metabolism have shown to impair the parasite development, reinforcing the essentiality of these enzymes in parasite metabolism. In addition, the specificities found in the PKs that regulate the energy metabolism in this parasite could bring new perspectives for safer and more efficient therapies for treating toxoplasmosis. Therefore, this review provides an overview of the limitations for reaching an efficient treatment and explores the role of PKs in regulating carbon metabolism in *Toxoplasma*, discussing their potential as targets for more applied and efficient pharmacological approaches.

KEYWORDS

kinases, parasite metabolism, drug targets, toxoplasmosis, chemotherapy

1 General aspects of the parasite and the disease

Toxoplasmosis is a worldwide disease with important impacts on human and animal health (Flegr et al., 2014). The etiologic agent of toxoplasmosis is the pathogen *Toxoplasma gondii*, an obligate intracellular parasite with great ability to infect different genera of warm-blooded species, like several species of birds and more than 300 species of mammals, including humans (Hunter and Sibley, 2012). *Toxoplasma gondii* belongs to the phylum Apicomplexa, which includes more than 6,000 species of intracellular parasites associated with several infectious diseases (Morrison, 2008), such as *Plasmodium* (pathogen of malaria), *Cryptosporidium* (pathogens of diarrheal outbreaks), and *Babesia* (pathogen of babesiosis) (Arisue and Hashimoto, 2015).

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular protozoan that invades new host cells for its survival and proliferation and differentiates into various forms during its life cycle. The tachyzoite is the asexual replicative form that can infect virtually any host cell, while the bradyzoite is the latent form present in tissue cysts (Skariah et al., 2010). The sexual phase of the parasite occurs in the digestive system of felids, the definitive hosts, leading to the formation of the oocysts (with sporozoites) that contaminate soil, water, and food sources (Djurković-Djaković et al., 2019). Intermediate hosts, including humans, can be infected by ingesting food contaminated by oocysts or consuming undercooked meat from infected animals with tissue cysts (Ducrocq et al., 2021).

Immunocompetent individuals are usually asymptomatic; however, severe manifestations of the disease, which can also progress to death, are observed in immunocompromised patients (Robert-Gangneux and Dardé, 2012). The presence of tissue cysts is a survival mechanism of the parasite for evasion of the immune system, prolonging the persistence of the parasite in the host. It is still unknown whether the reactivation of cysts is completely prevented under conditions of immunocompetence or whether the parasite can release immunosuppressive factors, triggering reactivation of the infection (Elsheikha et al., 2020). The reactivation of tissue cysts can lead to serious health problems linked to ocular damage and blindness (Jones and Holland, 2010; Grigg et al., 2015). The occurrence of vertical transmission of parasites during pregnancy can lead to irreversible damage in embryos (Mareze et al., 2019). Studies conducted in France have shown that both prevention and the administration of adequate drugs during pregnancy can reduce newborns' risk of symptoms and sequelae (Wallon and Peyron, 2015).

Although toxoplasmosis occurs worldwide, seroprevalence rates vary by geographic region. Higher rates are usually verified in people with lower socioeconomic levels or fewer years of schooling (Jones et al., 2014). A study in Germany revealed a global seroprevalence of 55%, and the risk of toxoplasmosis was associated with the consumption of raw meat (Wilking et al., 2016). Low prevalence rates were found in England (17.32%) in pregnant women (Flatt and Shetty, 2013) and a prevalence of 12.3% was found in China in patients with psychiatric disorders (Xiao et al., 2010). In Japan, the presence of anti-*T. gondii* antibodies in pregnant women was 10.3%, and the possibility of infection during pregnancy was only 0.25% (Sakikawa et al., 2012).

The scenario observed for toxoplasmosis in Latin America is unique, with higher infection rates than countries in the Northern Hemisphere. In Mexico, seroprevalence can reach 70% of the population (Caballero-Ortega et al., 2012). In Colombia, a seroprevalence of 29.9% was observed in blood donors (Alberto Betancur et al., 2011) but can reach more than 80% in workers from numerous slaughterhouses (Cortes et al., 2009) or as a result of consuming unboiled water and wild animals (Gómez-Marín et al., 2012). In Cuba, ocular toxoplasmosis can exceed 45% (Bustillo et al., 2015) and in Panama, seroprevalence of 44.41% occurs in pregnant women, representing a high-risk factor for congenital toxoplasmosis (Flores et al., 2021).

The average seroprevalence rate of *T. gondii* in Brazil, the largest country in South America, is above 60%, varying among geographic regions (Pappas et al., 2009). For example, in Fortaleza, a city in the Northeastern region, the general seroprevalence in pregnant women was 68.6% (Sroka et al., 2010) while in the state of Rio Grande do Sul, in the Southern region, a study indicated a positivity of 74.5% (Spalding et al., 2005). In the state of Minas Gerais, in the Southeastern region, the rate increases to 68.3% in rural areas, possibly associated with the consumption of unwashed fruit, contaminated water, undercooked meat, and unpasteurized milk (Antinarelli et al., 2021). The city of Santa Maria, in the Southern region, has observed the largest outbreak of toxoplasmosis in the country, with a high occurrence of congenital infection and severe abnormalities in newborns (Conceição et al., 2021).

Initial studies involving the genetic characterization of *T. gondii* described three clonal lineages, classified as Types I, II, and III (Howe and Sibley, 1995). Type I strains are characterized by a higher virulent profile, causing severe clinical manifestations in humans, such as ocular toxoplasmosis (Khan et al., 2005), psychiatric disorders, and intense inflammatory responses from the host immune system (Halonon and Weiss, 2013). Type II and Type III strains are less virulent and can differentiate into bradyzoites, forming tissue cysts that constitute the latent phase of the infection (Skariah et al., 2010). In South America, cases of ocular toxoplasmosis tend to be more severe, with larger and more numerous lesions than those found in Europe (de-la-Torre et al., 2013). The severe clinical manifestations of toxoplasmosis found in Central and South America can be associated with the highest prevalence of Type I and the occurrence of strains with high genomic diversity and high virulence (Shwab et al., 2018; Hosseini et al., 2019). Type II parasites are widely spread in human populations from North America and Europe, and this type is highly associated with ocular toxoplasmosis in France (Fekkar et al., 2011). A systematic review of studies on clinical samples indicates that the prevalence of *T. gondii* genotypes varies among the continents, with the highest prevalence of Type I strain reported for North and South America and the lowest prevalence for Africa. Type I and Type III were reported more in North and South America (Hosseini et al., 2019).

The genetic diversity of *Toxoplasma* found in South America differs from that found in North America and Europe, where hundreds of atypical genotypes coexist without dominant strains (Shwab et al., 2014). Phylogenetic analyses have indicated that the ancestor of *T. gondii* emerged in the Amazon around 1.5 million

years ago. Various factors have contributed to genomic diversification and the emergence of more virulent strains in South America. The great diversity of intermediate hosts, carnivorous behavior between species, and the presence of other felid species (for sexual reproduction) have provided different selective pressures. As a result, the emergence of new lineages increased (Bertranpetit et al., 2017). In addition, the migratory events of the fauna between the Americas allowed the entrance of new genotypes of *Toxoplasma* in North America, and the further passage of animals through the Bering Strait enabled the arrival of the parasite in Asia, Europe, and Africa (Bertranpetit et al., 2017). The current genomic structure of a few strains of *T. gondii* found in the Old World can be attributed to the recent expansion of domestic cats as companion animals and as the primary definitive hosts, where previously only genotypes of parasites more adapted to this animal were more easily dispersed (Müller and Howard, 2016).

Toxoplasma is an apicomplexan parasite that has a symbiotic organelle, the apicoplast, essential for its survival due to its vital role in metabolism, mainly in pathways linked to the biosynthesis of fatty acids, isoprenoids, and heme (Van Dooren and Striepen, 2013; Arisue and Hashimoto, 2015). Furthermore, the apicoplast displays specific enzymes with no homologs in the host cells; thus, this organelle could be considered an important potential target for more specific treatments.

2 Chemotherapies against *T. gondii*: current drugs and challenges

The pharmacological approaches against toxoplasmosis usually combine two drugs, pyrimethamine and sulfadiazine, which act synergistically on the parasite's survival and proliferation, inhibiting the folate metabolic pathways (Dunay et al., 2018). However, these drugs are not selective enough against the parasites and affect biochemical pathways in human cells. Adverse effects have been related mainly to pyrimethamine and its inhibition effect on folic acid pathways in tissues with high metabolic activity, such as epithelium and bone marrow. In addition, significant adverse effects can occur independent of the clinical manifestation of the infection (Ben-Harari et al., 2017). A study involving 115 patients with symptoms of encephalitis indicated that 62% suffered side effects due to the use of sulfadiazine, and around a third of the patients abandoned the treatment (Alday and Doggett, 2017). The toxic effects of drugs routinely used are significant, and cases of *Toxoplasma* infections reported in the FDA adverse events reporting system (FAERS) demonstrated that most adverse outcome reports were serious (89%), followed by the adverse outcome of death (11%). The study also confirmed that most adverse outcome reports involved pyrimethamine followed by sulfonamides and that hepatocellular injury, eosinophilia, and systemic symptoms were associated with sulfonamide drug reactions, whereas pancytopenia, neutropenia, and nausea were associated with pyrimethamine (Shammaa et al., 2021).

Sulfadiazine can be substituted for clindamycin in people allergic to sulfa drugs, although the treatment is less effective and has similar adverse effects (Katlama et al., 1996). The combination

of sulfamethoxazole and trimethoprim has also shown similar efficacy to pyrimethamine-sulfadiazine. Therefore, it can be used as an alternative in patients who cannot tolerate pyrimethamine or when the drug is unavailable (Rajapakse et al., 2013). However, in addition to side effects, the administration of pyrimethamine and sulfadiazine is associated with rare severe reactions, including agranulocytosis and hepatic necrosis (Alday and Doggett, 2017).

Another significant factor is the need for long-term therapies, lasting from four to six weeks in cases of eye infections and up to one year in patients with congenital infections. Even longer treatments may be necessary since the drugs used are unable to affect bradyzoites and are ineffective in eliminating tissue cysts (Harrell and Carvounis, 2014). Therefore, new therapies should address criteria such as increased selectivity, reduced side effects, elimination of tissue cysts, and reduced drug exposure time.

Studies have proposed that the apicoplast could be an important target for specific drugs since it is considered the parasite's Achilles Heel due to its vital role in critical metabolic pathways (Kadian et al., 2018). Several compounds have shown efficient inhibition effects on apicoplast pathways. For example, the natural compound thiolactomycin (TLM) is a known selective inhibitor of the Type II fatty acid biosynthesis found in the plant plastids and bacteria, which also occurs in the apicoplast, exhibiting growth inhibition against *Plasmodium falciparum* parasites (Waller et al., 1998). Synthetic analogs of TLM also showed improved antiparasitic effects against *Plasmodium* (Waller et al., 2003), *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* (Jones et al., 2014).

Another example is the natural compound that disrupts the membrane metalloprotease FtsH1 of apicoplasts, inhibiting organelle biogenesis and leading to apicoplast loss and, consequently, parasite death (Amberg-Johnson et al., 2017). Furthermore, the machinery of apicoplast replication coordinated by a plastid gyrase can be inhibited by ciprofloxacin, leading to profound alterations in the apicoplast and growth inhibition in the parasites (Botté et al., 2012). Finally, *Plasmodium* parasites treated with doxycycline show impaired gene expression, causing defects in apicoplast biogenesis and morphology and leading to the distribution of nonfunctional apicoplasts into daughter merozoites (Dahl et al., 2006), confirming the importance of apicoplast enzymes as potential specific drug targets.

Apicoplasts also play an important role in the parasite's energy metabolism, containing all subunits of pyruvate dehydrogenase complex (PDH) that is usually found in the mitochondrion in most organisms, catalyzing the conversion of pyruvate to acetyl-CoA, which is then used in Type II fatty acid biosynthesis (Fleige et al., 2007). Since the PDH complex is found in the apicoplast, the mitochondrial conversion of pyruvate to acetyl-CoA is indeed mediated by the branched-chain ketoacid dehydrogenase complex (BCKDH), which has a different substrate in human cells; instead of pyruvate, the human enzyme uses α -ketoacid (Oppenheim et al., 2014). Protein kinases (PKs) regulate both complexes in other eukaryotes, but the kinases regulating PDH and BCKDH in *T. gondii* are still unknown (Ferrarini et al., 2021).

Compounds that inhibit PKs have also been promising alternatives for effectively treating several human pathologies, such as diabetes (Prada and Saad, 2013), cancer (Zhang et al.,

2009), and diseases caused by viruses (Buljan et al., 2020) and protozoans (Dichiara et al., 2017). PKs are highly involved in cellular pathways, acting in signal transduction and regulating several biochemical pathways, permitting adaptive cellular responses to environmental changes (Buljan et al., 2020). Drug design strategies have allowed the development of specific kinase inhibitors, with high selectivity against cancer, for example, improving patients' quality of life and survival (Di Felice et al., 2018).

PKs are interesting targets to be explored against different pathogens such as *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, and *Toxoplasma* because, despite the conservation of PK families among other organisms, there are significant differences in protein identities, in addition to significant structural differences to their closest mammalian homologs (Doerig et al., 2002). Furthermore, drug design strategies are also helpful in constructing specific kinase inhibitors acting as allosteric inhibitors in the PKs regulatory domains, with no interactions against the ATP binding pocket region, which is similar among different kinases (Eglen and Reisine, 2010).

In this way, structural differences found in the pathogen kinases also result in differential affinities to potential kinase inhibitors, opening perspectives to design drugs with appropriate affinity to pathogen kinases, with reduced interactions with host kinases and prevention of unwanted effects (Knoekaert et al., 2002).

3 Protein kinases: general aspects, classification, and regulatory functions

Rapid responses to internal and external stimuli are fundamental requirements to maintain the life cycle of any organism or cell. Moreover, these responses are required to afford protection to cells with regard to environmental changes, such as determining the correct maintenance of biochemical pathways linked to energy metabolism, storage of nutrients, and communication, constituting a significant survival mechanism (Humphrey et al., 2015).

To provide modulation in biochemical cascades, proteins are subject to reversible post-translational modifications (PTMs) that usually occur through the addition of chemical groups, polypeptides, or direct alterations in amino acid residues, leading to conformational changes in the protein structure, activating or inhibiting catalytic sites, and modulating their biological functions (Wang et al., 2014; Spoel, 2018). Over 200 PTMs are known, including phosphorylation, acetylation, and ubiquitination, rapidly altering protein activity with low metabolic cost (Humphrey et al., 2015). A specialized protein is required for each PTM. Reversible PTMs are possible, which require appropriate enzymes to revert the structural changes and restore the chemical activity of the substrates (Oliveira and Sauer, 2012).

The most studied PTM is phosphorylation, catalyzed by PKs that are key regulators of cellular function; they constitute the largest and most functionally diverse protein family. PKs direct proteins' activity, location, and function by adding a phosphate

moiety to substrate proteins. They also orchestrate the activity of almost all cellular pathways, especially those involved in the transduction and transmission of signals and coordination of complex processes such as the cell cycle (Manning, 2005).

Krebs and Fischer were the first researchers to recognize the biological role of PKs in 1956. These authors isolated a protein able to convert a phosphorylase from the inactive to the active form through a phosphorylation process, elucidating the origin of the phosphate group (using labeled ATP) and determining the optimum pH and the influence of Mn^{2+} in the reaction (KREBS and FISCHER, 1956; KREBS et al., 1959). The discovery of 'reversible protein phosphorylation' was a great revolution in biochemistry and led to the authors being awarded the Nobel Prize in Physiology or Medicine in 1992.

PKs phosphorylate a substrate protein's hydroxyl moiety of serine, threonine, or tyrosine (Cohen, 2002). They constitute a superfamily broadly subdivided into eukaryotic protein kinases (ePKs) and "atypical" protein kinases (aPKs) (Miranda-Saavedra et al., 2012). The ePKs constitute the largest group, subclassified into eight families (AGC, CAMK, CK1, CMGC, RGC, STE, TK, and TKL). This classification highlights the sequence similarity among the catalytic domains and the presence of accessory domains, considering the regulatory characteristics. AGC and CAMK tend to phosphorylate basic residues, while CMGC kinases are usually directed to prolines. TK and TKL phosphorylate tyrosine residues, and STE phosphorylates serine and threonine residues (Parsons et al., 2005). The genes encoding ePKs are highly conserved in their primary amino acid sequences and the three-dimensional structures of their catalytic domains, constituting around 2% of the eukaryotic genome (over 520 proteins) (Manning et al., 2002).

On the other hand, the aPK group is constituted by a small set of protein kinases, subclassified into four families (Alpha, PDHK, PIKK, RIO). These families do not share apparent sequence similarity with ePKs but possess kinase activity (Miranda-Saavedra et al., 2007). The main differences between aPKs are related to low structure similarities, with alterations in regulatory regions and limited interaction binding modes (Kanev et al., 2019), as well as lacking 11 subdomains present in the ePKs (Parsons et al., 2005).

The relationships shown in phylogeny also can be used to predict substrates and biological functions of many uncharacterized kinases (Manning and Cantley, 2002). For example, phylogenetic analyses have revealed that the main family of serine/threonine/tyrosine ePKs is also present in Bacteria and Archaea. The shared characteristics of these PKs in different organisms indicate a monophyletic origin that could lead to the last common ancestor (LUCA). In this evolutionary context, authors have proposed that the appropriate name for this kinase family should be Hanks-type kinases, referring to Hanks' studies that described this group of kinases in 1988 (Hanks et al., 1988; Stancik et al., 2018). This PK group is also responsible for cellular division, growth, glycolysis, and pathogenicity in *Streptococcus pneumoniae* (Henry et al., 2019), virulence in *Mycobacterium tuberculosis*, and spore germination in *Bacillus subtilis* (Cowley et al., 2004; Shah et al., 2008).

3.1 The role of kinases in cell metabolism

PKs coordinate essential cellular pathways. Cellular division is highly regulated by cyclin-dependent kinases (CDKs) and cyclins. Cyclins provide the structural domains that activate the enzymatic activity of CDKs, acting as regulatory subunits (Malumbres, 2014). Quiescent cells (at the G0 phase) can be stimulated through mitotic factors, leading to the synthesis of cyclin D and stimulating CDK4 and CDK6. From there, the retinoblastoma (Rb) protein is phosphorylated, activating cascades that modulate the S phase with DNA synthesis. The end of the S phase is marked by the interaction of cyclin A/CDK2, with phosphorylation of CDK6 and E2F1, driving the cell to the G2 phase. After the G2 phase, the M phase is started by activating CDK1 in association with cyclin B (Otto and Sicinski, 2017; Ding et al., 2020). Several types of kinases are activated in events of DNA damage to promote different responses, including cell cycle arrest, protection of replication forks, control of dNTPs levels, or autophagy (Lanz et al., 2019).

PKs also play a decisive role in cell signal transduction, structuring cellular receptors. Receptor tyrosine kinases (RTKs) are integral membrane proteins represented by 58 proteins in humans. They are structurally disposed of by five regions: extracellular ligand-binding domain, transmembrane and juxtamembrane regions, cytoplasmic domain with tyrosine kinase activity, and a C-terminal tail. The interaction with specific extracellular ligands promotes conformation changes in the receptor, activating the kinase domain and promoting the phosphorylation of downstream proteins, amplifying the external signal and resulting in metabolic changes in the cell (Critchley et al., 2018).

Similarly, MAP kinases were shown to play a significant role in the central nervous system (CNS), connecting neurons and participating in the axonal transport and neuroregeneration process (Asih et al., 2020). Deregulation of MAP kinases can lead to altered gene expression patterns, resulting in serious neurodegenerative damage. For example, the risk of Alzheimer's and Parkinson's diseases has increased in patients with alterations in kinase activity. Furthermore, altered PKs in the CNS could generate an inflammatory state leading neurons and glial cells to cell death (Ahmed et al., 2020).

In the context of energy metabolism, the AMP-activated protein kinase (AMPK) controls cellular energy, regulating the dynamic of lipids, glucose, and insulin (Xu et al., 2012). In conditions of fasting, physical exercise, and exposure to cold temperatures, ATP is highly consumed, with increased levels of ADP/AMP in the cell, resulting in AMPK activation. The role of AMPK is directed to reducing cholesterol synthesis, fatty acids, and proteins. This metabolic switch increases the glucose and ATP levels, ensuring the supply of energy compounds for the cell. On the other hand, AMPK is found in an inactive state in cases of obesity in cases of increased levels of nutrients in the organism, which demand strong external stimuli for its activation (Ahmad et al., 2020).

Protein kinase C (PKC) isoforms are involved in lipid metabolism, inflammatory responses, and activation of signaling pathways. In diabetes, defects in PKC contribute to worsening

clinical conditions, generating plaque formation in the blood vessel, leading to lumen narrowing and ischemia in the myocardial tissue. However, specific PKC drugs without adverse effects on other kinases have not yet been described (Lien et al., 2021). Therefore, many efforts worldwide have been conducted to discover the phosphorylation sites of essential proteins and their corresponding effector kinases (Bradley et al., 2021).

Drugs that inhibit specific kinases have been developed for treating several diseases, and some are currently in clinical use, such as Imatinib (Gleevec[®]) and Gefitinib (Iressa[®]) for cancer treatment (Mikalsen et al., 2006). Until now, 67 specific kinase inhibitor molecules have already been approved by the FDA for therapeutic purposes (Axtman, 2021). In scientific databases, such as the Protein Data Bank (PDB), protein structures and inhibitory complexes related to more than 300 kinases are available for drug design studies (Laufer et al., 2020). The web computational resource (KinCore) predicts the dynamic states of PKs in association with inhibitors, contributing to the identification of more efficient kinase inhibitors (Modi and Dunbrack, 2022) and opening new avenues for the application of safe chemotherapies against a variety of diseases (Elkoshi, 2021). In addition, Uniprot (www.uniprot.org) provides more than 2,000 three-dimensional structures related to human PKs, which can contribute to developing specific kinase inhibitors for therapeutic applications against apicomplexan parasites.

3.2 Protein kinases as potential drug targets in protozoan parasites

There is a broad interest in developing protein kinase inhibitors as potential drugs against various diseases, including kinases as potential targets for new antiparasitic pharmacological strategies (Doerig, 2004). An important number of kinases that play critical and essential roles in the *Toxoplasma* life cycle have been suggested and/or described for Apicomplexa in particular (Gaji et al., 2021).

The CDKs are serine/threonine kinases, and their association with cyclins is the primary mechanism of regulation of CDK activity, in addition to phosphorylation, which also modulates the kinase activity. The genus *Toxoplasma* has more than 20 CDKs. On the other hand, *Plasmodium* and *Cryptosporidium* have less than 10 CDKs each (Rotella, 2012). Interestingly, despite their potential interest as therapeutic targets, only three CDKs have been studied with some detail in *Plasmodium falciparum* (PfPK5, PfPK6, and Pfmrk) (Waters and Geyer, 2003). In addition, all major ePKs groups have been observed, except for receptor guanylate cyclase (RGC) and tyrosine kinases, as well as lacking members of the PDHK (except *T. gondii*) and Alpha aPK families. Furthermore, PKs are conserved among apicomplexan and higher eukaryotes (Miranda-Saavedra et al., 2012). The CAMK group is a family of serine/threonine kinases that mediate many of the second messenger effects of Ca²⁺ and is the second-largest kinase group in apicomplexan (Talevich et al., 2012). Regarding the group of calcium-dependent protein kinases (CDPKs) that participate in invading new host cells in *T. gondii* (Kieschnick et al., 2001) are highly related to other proteins found in plants and algae. However,

there are no similar proteins in mammals, opening the perspective for the design of specific drugs, like bumped kinase inhibitors (BKIs), which interfere with the activity of CDPK1, blocking the parasite invasion process *in vitro* (Ojo et al., 2010). Similarly, the inhibitor H89, an ATP-competitive compound, reduces the kinase activity of the cAMP-dependent protein kinase (PKA) and, consequently, the replication of tachyzoites in the parasitophorous vacuole (Kurokawa et al., 2011). Finally, other *Toxoplasma* kinases may also be critical pharmacological targets, such as the kinases that participate in immune manipulation (ROP16, 18, and 38), the cell cycle (TgNEK1, TgCK1, TgTPK2), the conversion of tachyzoites to bradyzoites, and those that control the metabolic responses to stress (TgMAPK1, TgPKA-C, and TgEIF2K) (Kato et al., 2012).

In the context of more effective drugs against *Toxoplasma* parasites, some biochemical characteristics involving PKs that participate in the carbon metabolism are only found in this parasite and, for this reason, could become attractive targets for new therapies. Although the TCA cycle is essential for intracellular and extracellular tachyzoites (MacRae et al., 2012), changes in ATP homeostasis occur in extracellular parasites, leading to high dependence on the glycolytic pathway rather than on the oxidative phosphorylation of mitochondria (Shukla et al., 2018). Similarly, erythrocytic stages of *Plasmodium* are also highly dependent on aerobic glycolysis as the major route to ATP production (Salcedo-Sora et al., 2014). Furthermore, in cases where glutamine is the major carbon source, it is catabolized *via* the TCA cycle and used to produce glycolytic intermediates (Lyu et al., 2023). Glycolysis is also essential for parasite egress (Huynh and Carruthers, 2022). In general, glycolysis is the primary source of ATP in the parasites, despite the fact that the mitochondrial pathway is essential for tachyzoites. This dependence on glycolysis is also found in cancer cells that repress the mitochondrial TCA cycle by overexpression of dehydrogenase kinases (PDKs), blocking the activity of pyruvate dehydrogenase complex (PDH) (Yu et al., 2017). DCA is a potent PDK inhibitor in tumor cells that revert the glycolytic phenotype and contribute to cell death in its cells (Michelakis et al., 2008). DCA treatment in *Toxoplasma* causes inhibitory effects in tachyzoites and affects the mitochondrial activity in these parasites, which might indicate that PDK could be the DCA target, regulating the TCA cycle (Ferrarini et al., 2021). However, the PDH complex is present in the apicoplast, distinct from the mitochondrial localization observed in most eukaryotes. In *Toxoplasma*, the absence of the PDH complex in mitochondria was compensated by the BCKDH complex, which took over the functions initially carried out by the canonical PDH (Oppenheim et al., 2014). Two putative mitochondrial kinases (PDK/BCKDK) are reported in the *Toxoplasma* parasites, which are located in the mitochondria. It is still unknown whether these kinases could regulate the BCKDH complex (Ferrarini et al., 2021), and there is still no evidence of potential kinases regulating the PDH complex in the apicoplast. Thus, further insights into the specific features of those PKs that can be useful for new drug strategies are still needed to understand the role of kinases in regulating carbon metabolism.

Nevertheless, it is important to consider that most of the data have been described on tachyzoites; on the other hand, knowledge about carbon metabolism in bradyzoites is still limited, mainly due to experimental constraints. Different studies indicate that glycolytic degradation of glucose also plays an important role in bradyzoites, in which they depend on the turnover of storing polysaccharide amylopectin by glycogen phosphorylase (Coppin et al., 2003), with its formation induced by a few electron transport inhibitors (Tomavo and Boothroyd, 1995; Ferreira Da Silva et al., 2008). Recently, the development of an *in vitro* system developing bradyzoites enabled measurements of bradyzoite metabolites *via* mass spectrometry, revealing lower levels of several TCA cycle-associated metabolites that are consistent with a lower reliance on this pathway (Christiansen et al., 2022). These scalable *in vitro* systems can be useful in providing new data regarding bradyzoite metabolism and identifying PKs and other enzymes specific to glycolytic metabolism in bradyzoites, improving the selectivity of chemotherapy strategies and reducing the side effects. If future studies demonstrate that the overexpression of PDK in bradyzoites is responsible for the low activity of the TCA cycle in this stage, perhaps the DCA treatment would revert the reduced activity of mitochondria and generate a lethal effect due to metabolic disequilibrium, like reversion of the Warburg effect in cancer cells (Ferrarini et al., 2021). Although DCA was not tested on bradyzoites, it is not toxic to human cells; therefore, further studies could open perspectives of repositioning kinase inhibitors used in other diseases for toxoplasmosis therapy.

3.3 Regulatory kinases in the carbon metabolism of apicomplexan parasites

PKs that coordinate glycolysis in the parasites could be important targets to screen for new treatments due to the differences found with regard to mammalian cells. In addition, glycolysis is an essential pathway for the parasite life cycle, and disruption of this pathway disturbs tachyzoite replication and the formation of tissue cysts, constituting an essential target for treatments (Shukla et al., 2018).

After the invasion, the replicative niche of *Toxoplasma* is constituted by the parasitophorous vacuole (PV), a specialized organelle responsible for tachyzoite protection, manipulating signaling pathways, and acquiring soluble nutrients from the host cell as amino acids, sugars, and nucleotides (Martin et al., 2007). Figure 1 depicts the kinases regulating different metabolic pathways.

3.3.1 Glycolysis in cytosol

Glucose is internalized by the hexose transporter GT1 distributed on the parasite surface and is not restricted to a particular site in the cell membrane (Pomel et al., 2008). The first stage of glycolysis is mediated by hexokinase (1-HK), an enzyme responsible for converting glucose to glucose-6-phosphate.

Sequence analysis has revealed considerable similarity between *T. gondii* HK and *Plasmodium falciparum* HK but low similarity (> 35%) between parasite and host HKs (Saito et al., 2002). In

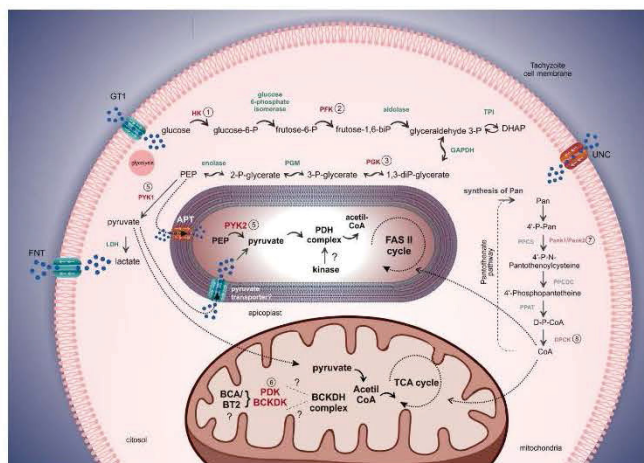


FIGURE 1

Schematic model of the role of protein kinases in glycolysis, the TCA cycle, and the pantothenate pathways in *T. gondii*. The GT1 transporter is responsible for the internalization of glucose to the cytosol. Kinases in the cytosol, apicoplast, and mitochondria are highlighted and listed. The apicoplast displays a PEP transporter represented as APT in *Toxoplasma* and TPT in *Plasmodium*. The extrusion of excessive lactate and pyruvate produced by glycolysis is exported by the FNT transporter, contributing to the acidification of the parasitophorous vacuole and parasite release. Tachyzoites can synthesize or import pantothenate (Pan) from the host cell, but the Pan transporter is still uncharacterized (UNC). Besides the kinases that act in glycolysis, mitochondria, and apicoplast, kinases in the pantothenate pathway are also important in converting pantothenate to coenzyme-A (CoA) used in other biochemical pathways.

Plasmodium vivax, HK exhibits a homotetrameric structure, unlike that found in human HKs that are organized in monomers or dimers. The organization of the tetrameric structure in *Plasmodium* is related to the most extensive hydrophobic interactions in peripheral regions, generating solid interactions in the interfaces of the kinase. In contrast, these regions are replaced by polar residues (Srivastava et al., 2020). *Toxoplasma* knockout parasites for HK cannot catalyze glucose phosphorylation, even under supplemented glucose conditions, displaying defects in the formation of tissue cysts in the nervous system of mice and alterations in the invasion process of new host cells (Shukla et al., 2018).

Cryptosporidium (Apicomplexa) also shows a unique and highly divergent HK to humans and *Toxoplasma*, with the distinctive capacity to use other NTPs besides ATP, unlike other organisms whose HKs are ATP-dependents (Yu et al., 2014).

After phosphorylation mediated by HK, the glucose-6-phosphate is converted to fructose-6-phosphate by the glucose-6-phosphate isomerase. From this point in glycolysis, the differences between the enzymes from parasites and mammalian cells become more marked. The remaining enzymes of glycolysis (from phosphofruktokinase to pyruvate kinase) are expressed in two isoforms in the parasites, including isoforms present in the apicoplast (Fleige et al., 2007).

The third stage of glycolysis is mediated by phosphofruktokinase (2-PFK), which uses fructose-6-phosphate as a substrate to generate fructose-1,6-bisphosphate. Two PFKs are reported in *T. gondii*: PFK1,

dependent on ATP, and PFK2, dependent on pyrophosphate as a phosphate donor. While PFK1 is not essential for parasite proliferation, the conditional knockout of PFK2 leads to growth arrest and an increase of pyrophosphate levels in the cytosol, which is in high amounts in the cell, as well as reduces protein synthesis in the tachyzoites (Yang et al., 2022).

Toxoplasma PFK2 differs from the ATP-dependent PFK found in the host cells because it differs in subunit structure and catalytic kinetics, constituting a potential drug target. Analogs of phosphonic acid showed inhibitory effects in the kinetic activity of PFK2, inhibiting parasite growth and protective effects in treated host cells (Peng et al., 1995). Mutations in *Plasmodium* PFKs confer drug resistance to antimalarial drugs because they redirect the glycolytic metabolites to the pentose phosphate pathway and improve the parasite's survival (Fisher et al., 2020). Inhibitory compounds directed to PFKs provide strong effects in other parasites, such as trypanosomes, blocking the glycolytic pathways and leading to parasite death and the complete cure of infected mice, with no side effects to the host (McNae et al., 2021).

The enzyme aldolase mediates the conversion of fructose-1,6-bisphosphate to glyceraldehyde 3-phosphate, and the transformation of glyceraldehyde-3-phosphate to 1,3-diphosphoglycerate is mediated by the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), although they are not regulated by kinases (Fleige et al., 2007). It has also been proposed that glyceraldehyde 3-phosphate could be converted to dihydroxyacetone-phosphate (DHAP) in a reversible reaction, with DHAP imported to the

apicoplast for metabolism in the isoprenoid pathway (Nair et al., 2011).

Aldolase-deficient *Toxoplasma* strains show growth inhibition due to the accumulation of toxic intermediates from upstream stages of glycolysis, with no interference in the motility and invasion mechanisms (Shen and Sibley, 2014). GAPDH is also essential to parasite metabolism, with parasite growth impairment when the protein is absent through knockout genetic strategies (Dubey et al., 2017). It has been found that *Toxoplasma* enzymes triose phosphate isomerase II (TPI-II), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase II (GAPDH-II), and phosphoglycerate kinase II (PGK II) are in the apicoplast and play an important role in the isoprenoids and fatty acids biosynthesis (Niu et al., 2022).

Phosphoglycerate kinase (3-PGK) is the third kinase found in glycolysis, present in two isoforms in *Toxoplasma* to catalyze the conversion from 1,3-bisphosphoglycerate to 3-phosphoglycerate (3-PGA) (Smith et al., 2011). In *Plasmodium falciparum*, PGK showed a 61% similarity to human PGK, with conserved regions implicated in interaction with the substrate, cofactors, and catalysis. However, it offers higher affinity interaction with ATP and 3-PGA (1.5- to 2.0-fold more, respectively) and lower thermal stability than the human homolog (Hicks et al., 1991; Pal et al., 2004).

Structural differences in PGKs from humans and parasites are related to the acetylation profile of these kinases. In humans, acetylation of PGK occurs in 13 lysines (Choudary et al., 2009), while five lysines are acetylated in intracellular parasites, and only one is found in extracellular parasites (Xue et al., 2013), indicating a possible regulatory function. Although there are no reports about PGK inhibitors for *Toxoplasma*, the compound adenyllyl 1,1,5,5-tetrafluoromethane-1,5-bisphosphonate efficiently occupied the bind sites of the *Trypanosoma* PGK, inhibiting the kinase through conformational changes (Bernstein et al., 1998). PGK is also considered a potential target for cancer therapy, where the expression levels could indicate tumor progression and the existence of a multidrug resistance profile in the tumor cells (Liu et al., 2022).

The two subsequent stages of glycolysis are conducted by phosphoglycerate mutase (PGM), catalyzing the interconversion of 3-phosphoglycerate to 2-phosphoglycerate, with enolase using the 2-phosphoglycerate as a substrate to form phosphoenolpyruvate (PEP) (Hargrave et al., 2019). Studies using the mice model have indicated that recombinant PGM2 from *Toxoplasma* can induce protective effects in the animals, with improved survival outcomes and a reduction in the number of tachyzoites found in brain and liver tissues (Wang et al., 2016). *Toxoplasma* shows two isoforms of enolase (enolase 1, ENO1, and enolase 2, ENO2). ENO1 is only expressed in bradyzoites and shows only one-third of the catalytic activity of ENO2. In addition to the activity in glycolysis, ENO1 and ENO2 also exhibit a regulatory function linked to gene expression and are also found in the parasite nucleus (Dzierszinski et al., 2001; Ruan et al., 2015).

3.3.2 FAS II cycle in apicoplast

PEP, generated by the enolase enzyme, can be directed along two distinct routes, following the glycolytic pathway in the

cytoplasm, or imported to the apicoplast through plant-like transporters, APT in *Toxoplasma* or TPT in *Plasmodium* (Shunmugam et al., 2022). *Toxoplasma gondii* exhibits two isoforms of pyruvate kinases (4-PYK1 and 5-PYK2) responsible for converting PEP to pyruvate in cytosol and apicoplast, respectively (Xia et al., 2019). It has been proposed that pyruvate produced by PYK1 in the cytosol could also be imported to the apicoplast, although its transporter still needs to be confirmed and characterized (Fleige et al., 2007; Xia et al., 2019). PYK1 plays a greater role than PYK2 in parasite metabolism. Depletion of PYK2 does not significantly affect the parasite, but disruption of PYK1 leads to the accumulation of upstream metabolites from glycolysis, reducing ATP production. Disruption of both kinases (PYK1 and PYK2) generates complete growth arrest due to the loss of the apicoplast, an organelle essential to the parasite's survival (Xia et al., 2019).

Other steps in pyruvate parasite metabolism present significant differences related to mammalian organisms. Pyruvate dehydrogenase complex (PDH), usually found in the mitochondria of other organisms, mediates the metabolism of pyruvate and acetyl-CoA production in the apicoplast, which is then used in Type II fatty acid biosynthesis (FAS II pathway). In the absence of the mitochondrial PDH complex, the BCKDH complex assumes the canonical function of PDH, promoting the conversion of pyruvate to acetyl-CoA, which is then metabolized through the TCA cycle (Oppenheim et al., 2014). It is still unknown if the apicoplast PDH could be regulated by kinases as usually observed in other organisms (Wang et al., 2021), which could also constitute an essential target for use in antiparasitic drugs.

3.3.3 The TCA cycle in mitochondria

In mammalian cells and organisms, the pyruvate produced by pyruvate kinase in the last stage of glycolysis is directed to the mitochondria. In this organelle, pyruvate is decarboxylated by PDH in an irreversible reaction, resulting in the production of acetyl-CoA, CO₂ release, and the reduction of NAD⁺ to NADH. The acetyl-CoA is then metabolized through the tricarboxylic acid (TCA) cycle in the mitochondria (Anwar et al., 2021). The PDH complex is present in eukaryotes and prokaryotes and is structured through multiple copies of three catalytic subunits: pyruvate dehydrogenase (E1), dihydrolipoamide acetyltransferase (E2), and dihydrolipoamide dehydrogenase (E3). Higher eukaryotes also have the dihydrolipoamide dehydrogenase binding protein (E3BP) subunit. This dehydrogenase complex is controlled by regulatory enzymes such as pyruvate dehydrogenase kinases (with four isoforms reported in humans) and pyruvate dehydrogenase phosphatases (PDP, with two isoforms in humans) (Patel et al., 2014). In non-tumoral mammalian cells, the TCA cycle and oxidative phosphorylation (OXPHOS) in the mitochondria produce significant amounts of ATP from pyruvate. However, even in normal oxygen conditions, tumor cells use glycolysis as the main route for making ATP, inhibiting the mitochondrial TCA cycle and, consequently, the OXPHOS, avoiding oxidative damage and apoptosis and ensuring survival (Anwar et al., 2021). In tumor cells, the Warburg effect is observed, corresponding to a switch from

glycolysis controlled by the Pasteur effect to aerobic glycolysis triggered by the pyruvate's overexpression of dehydrogenase kinases (PDKs). These PDKs promote the phosphorylation of mitochondrial PDH, blocking the formation of acetyl-CoA from pyruvate, its entry into the TCA cycle, and, therefore, the OXPHOS. Such accumulation of carbon compounds permits cell growth and metastasis (Stacpoole, 2017).

Remarkably, reversing the Warburg effect in cancer metabolism is possible using the small molecule inhibitor dichloroacetate (DCA). The mechanism of action of the drug is focused precisely on the inhibition of PDKs, restoring the activity of the PDH complex and mitochondrial functions, and consequently, increasing intracellular ROS levels, the susceptibility to other drugs, as well as stopping the progression of tumor growth (Tataranni and Piccoli, 2019). DCA can be administered orally, and due to its inhibitory effect on PDKs, increasing the pyruvate flux in mitochondria, promoting the TCA cycle, and indirectly the OXPHOS results in the inhibition of tumor growth both *in vitro* and *in vivo* (Michelakis et al., 2008). Therefore, disruption of the PDK/PDH axis is the key to the tumor elimination mechanism of DCA, inducing apoptosis in tumor cells without affecting non-tumor cells. Thus, PDK became a therapeutic target in oncology (Sutendra and Michelakis, 2013).

Metabolism in apicomplexan parasites is also highly dependent on the glycolysis pathway, suppressing mitochondrial metabolism and accumulating intermediate metabolites produced by glycolysis that support rapid proliferation (Salcedo-Sora et al., 2014). Due to TCA cycle repression, the pyruvate accumulated in the cytosol is then converted to lactate by the enzymatic activity of two lactate dehydrogenases (LDH1 and LDH2) and used as an energy source by fermentative processes in the parasite (Xia et al., 2018). The exportation of lactate by the FNT transporters has an important role in the acidification of the parasitophorous vacuole, contributing to the natural egress of the parasites (Huynh and Carruthers, 2022). Inhibitory drugs for the FNT transporters reduce the exportation of lactate, leading to rapid cytosol acidification and cell death in the parasites (Walloch et al., 2021).

The reduction of the TCA cycle observed in the parasites also could be controlled by the PKs. Cluster analyses have revealed the presence of two putative kinases (6- PDK/BCKDK) that may be regulating the mitochondrial carbon metabolism in *T. gondii*, which DCA could target. Treating infected cells with DCA also produced the intracellular parasite's death without noticeable biological effects on the host cells. It is important to note that it has not been formally demonstrated that the DCA target in the parasites is indeed a kinase (Ferrarini et al., 2021).

In addition to DCA, the compound known as BT2 (3,6-dichlorobenzo[b]thiophene-2-carboxylic acid) is a kinase inhibitor directed to another kinase (BCKDK) in other models. It could target the BCKDK in the parasite mitochondria, indirectly promoting the activity of the BCKDH. Thus, the BCKDK also could be an exciting target for drugs against apicomplexans. BT2 is a potent allosteric inhibitor of BCKDK. Although BCKDK and PDKs share similar structures, the ligand-binding allosteric pocket in BCKDK (412Å³ volume) is two to four times larger than their counterparts in PDKs (90Å³–213Å³) (Zhou et al., 2019). BT2 belongs to a family of

benzothiophene derivatives, several of which have already been reported as enzyme inhibitors. It has been identified as a novel BCKDK inhibitor for therapeutic approaches. It reduces the BCAA/BCKA concentrations in maple syrup urine disease (MSUD) and is used to treat obesity and type 2 diabetes (Tso et al., 2014). The treatment of the C2C12 myoblast with BT2 blocks BCKDK, causing the activation of branched-chain amino acids catabolism and consequently suppressing cell proliferation and differentiation (Sato et al., 2020). Inhibition of BCKDK was sufficient to enhance BCKDH activity across tissue types in insulin-resistant, diet-induced obese mice (Zhou et al., 2019). Additionally, benzothiophene carboxamide derivatives are potent slow-binding inhibitors of *Plasmodium* enoyl-acyl carrier protein (ACP) reductase (PfENR), thus suggesting their use as an important potential antimalarial drug (Banerjee et al., 2011). Moreover, benzothiophene derivatives have also shown inhibitory effects in the proliferation of *T. gondii* (Rosada et al., 2019).

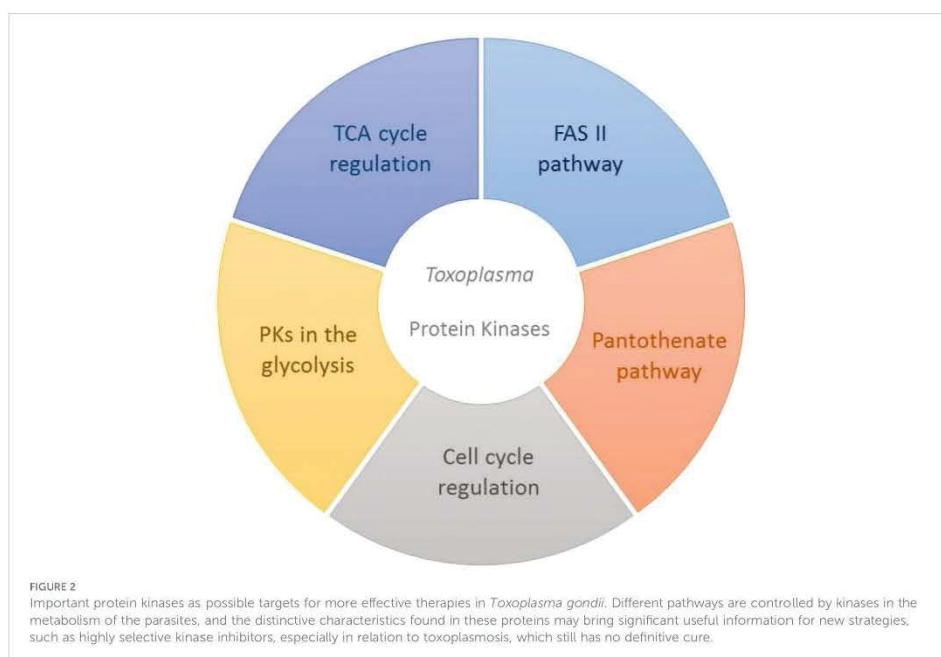
3.3.4 Pan synthesis in the cytosol

Beyond the pathways of glycolysis involving the apicoplast and mitochondria, the pantothenate pathway is another important target for applied therapies against the parasites. Pantothenate (Pan, vitamin B5) is an essential precursor for the synthesis of Coenzyme A (CoA), which has a role in gene regulation, the TCA cycle, heme, and fatty acid biosynthesis (Lunghi et al., 2022). While animals acquire Pan only through diet, the apicomplexan parasites have the machinery to produce Pan, becoming essential for the pathogen parasite and a particular target against chronic infection (de Vries et al., 2021). *Toxoplasma* parasites show two isoforms of Pan kinases (7- Pank1 and Pank2) that promote the phosphorylation of Pan to 4'-phosphopantothenate (4'-P-P-Pan). In this pathogen, Pank1 and Pank2 act in a heterodimer complex, unlike in humans, where Pank enzymes exist only as a homodimer and are necessary for tachyzoite proliferation (Tjhin et al., 2021). The last step of CoA biosynthesis occurs through the conversion of phospho-CoA (D-P-CoA) to CoA and is also catalyzed by dephospho-coenzyme A kinase (8- DPCK) (Fletcher et al., 2016). DPCK is in the cytosol of *Toxoplasma* and in the apicoplast of *Plasmodium* (de Vries et al., 2021). *Plasmodium* parasites subjected to apicoplast disruption (mediated by drug strategies) continue to express DPCK, with biochemical activity inside the vesicles derived from the apicoplast rupture. The DPCK remains active inside these vesicles and supplies the parasites with essential metabolites, contributing to parasite survival, also indicating a critical target that could be explored in new drug studies looking for kinase inhibitory strategies (Swift et al., 2021).

Then, the distinctive characteristics found in different PKs in the apicomplexans could open critical perspectives to applied chemotherapies focused on the complete characteristics that differentiate them from host kinases.

4 Conclusion

PKs regulate essential aspects of cell metabolism. Therefore, they have become potential targets for effective therapies in different



human diseases caused by protozoan pathogens, mainly when they are structurally different from human cells or involved in the distinctive metabolic pathways of those microorganisms. Different routes could be explored for new kinase inhibitors (Figure 2) as the CDKs coordinate the parasite cycle. Still, the specificities found in the PKs regulating the parasites' energy metabolism could offer new perspectives for safer and more effective therapies against *T. gondii* parasites.

The research on structural differences, specific kinetic activities, and binding sites found in the kinases PFK, PGK, and PYK in parasite glycolysis can shed light on more detailed and non-toxic chemotherapies. For example, inhibiting PFK2 restricts the formation of metabolites in an early stage of glycolysis and increases pyrophosphate levels to achieve toxic effects on the parasite. Various acetylation sites in parasite PGK could serve as potential sites for specific compounds since acetylated residues are distinct from the host PGK in both proliferative and latent parasites. The combination of strategies aiming to block both PYK1 and PYK2 in the parasites also leads to the suppression of glycolysis and apicoplast loss in the parasites, suppressing the essential FAS II pathway. Furthermore, the presence of isoforms with a possible location in the apicoplast may also indicate the presence of still unknown metabolic routes or catalytic activities, which need to be better evaluated.

The regulatory kinase for PDH in the apicoplast and whether the mitochondrial BCKDH is regulated by the kinases PDK and/or BCKDK remain unclear. Then, elucidating the regulatory kinases of

those pathways would help to understand the mechanism of DCA inhibitory effects already reported for tachyzoites.

Other potential important targets in the parasites are the kinases in the pantothenate pathway, which are responsible for producing coenzyme-A (CoA) as the end product. Inhibition of its kinases would indirectly affect the activities of PDH (in the apicoplast) and BCKDH (in mitochondria), since these complexes use CoA in the conversion of pyruvate to acetyl-CoA, affecting both the TCA cycle and FAS II biosynthesis, as well as the role of CoA in other cellular regulatory functions.

Exploring the specificities that differentiate the parasite PKs from the host enzymes will bring information to help develop compounds with high affinity to parasite proteins, trying to reduce the side effects of traditional chemotherapies, and find compounds that would eliminate the latent forms that serve as a reinfection source in patients.

Author contributions

DS: conceptualization and writing – original draft, writing – review, and editing. HS: writing – original draft, writing – review and editing. AS: writing – original draft, writing – review and editing. TS: writing – original draft, writing – review and editing. AA: conceptualization, writing – original draft, writing – review and editing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This work was supported by Fundação Oswaldo Cruz grant number ICC-008-FIO-21-2-15 (award to AA); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo grant number 2021/12938-0 and 2018/14432-3 (awarded to AMS); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) grant number 307487/2021-0 (awarded to AMS) and grant number 442344/2019-8 (award to AÁ); DS is fellow of CAPES.

Acknowledgments

We would like to thank Wagner Nagib for the figure design; Dr. Lysangela Alvez for the critical analysis of the manuscript; Fiocruz, CAPES, and CNPq for financial support.

References

- Ahmad, B., Serpell, C. J., Fong, I. L., and Wong, F. H. (2020). Molecular mechanisms of adipogenesis: the anti-adipogenic role of AMP-activated protein kinase. *Front. Mol. Biosci.* 7. doi: 10.3389/fmolb.2020.00076
- Ahmed, T., Zulfikar, A., Arguelles, S., Rasekhan, M., Nabavi, S. F., Silva, A. S., et al. (2020). Map kinase signaling as therapeutic target for neurodegeneration. *Pharmacol. Res.* 160, 1–10. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105090
- Alberto Betancur, C., Mario Jaramillo, J., David Puyana, J., Isabel Quintero, M., Estrada, S., and María Salazar, L. (2011). Seroprevalencia de toxoplasmosis en donantes de sangre de la clínica cardiovascular Santa María, Medellín, Colombia 2009–2010. *Infectio* 15, 14–19. doi: 10.1016/s0123-9392(11)70071-6
- Alday, P. H., and Doggett, J. S. (2017). Drugs in development for toxoplasmosis: advances, challenges, and current status. *Drug Des. Devel Ther.* 11, 273–293. doi: 10.2147/DDDT.S60973
- Amberg-Johnson, K., Hari, S. B., Ganesan, S. M., Lorenzi, H. A., Sauer, R. T., Niles, J. C., et al. (2017). Small molecule inhibition of apicomplexan FtsH1 disrupts plastid biogenesis in human pathogens. *Elife* 6, 1–23. doi: 10.7554/eLife.29865
- Antinorelli, L. M. R., Silva, M. R., Guimarães, R. J. D. P. S. E., Terror, M. S., Lima, P. E., Ishii, J. D. S. C., et al. (2021). Rural residence remains a risk factor for toxoplasma infection among pregnant women in a highly urbanized Brazilian area: a robust cross-sectional study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 115, 896–903. doi: 10.1093/trstmh/traa153
- Anwar, S., Shamsi, A., Mohammad, T., Islam, A., and Hassan, M. I. (2021). Targeting pyruvate dehydrogenase kinase signaling in the development of effective cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 1876, 188568. doi: 10.1016/j.bbcan.2021.188568
- Arisue, N., and Hashimoto, T. (2015). Phylogeny and evolution of apicoplasts and apicomplexan parasites. *Parasitol. Int.* 64, 254–259. doi: 10.1016/j.parint.2014.10.005
- Asih, P. R., Prikas, E., Stefanoska, K., Tan, A. R. P., Ahel, H. I., and Ittner, A. (2020). Functions of p38 MAP kinases in the central nervous system. *Front. Mol. Neurosci.* 13. doi: 10.3389/fnmol.2020.570586
- Axtman, A. D. (2021). Characterizing the role of the dark kinome in neurodegenerative disease – a mini review. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1865, 130014. doi: 10.1016/j.bbagen.2021.130014
- Banerjee, T., Sharma, S. K., Kapoor, N., Dwivedi, V., Suroliya, N., and Suroliya, A. (2011). Benzothioamide derivatives as inhibitors of plasmodium falciparum enoyl-ACP reductase. *IUBMB Life* 63, 1101–1110. doi: 10.1002/iub.553
- Ben-Harari, R. R., Goodwin, E., and Casoy, J. (2017). Adverse event profile of pyrimethamine-based therapy in toxoplasmosis: a systematic review. *Drugs R D* 17, 523–544. doi: 10.1007/s40268-017-0206-8
- Bernstein, B. E., Williams, D. M., Bressi, J. C., Kuhn, P., Gelb, M. H., Blackburn, G. M., et al. (1998). A bisubstrate analog induces unexpected conformational changes in phosphoglycerate kinase from *Trypanosoma brucei*. *J. Mol. Biol.* 279, 1137–1148. doi: 10.1006/jmbi.1998.1835
- Bertranpetit, E., Jombart, T., Paradis, E., Pena, H., Dubey, J., Su, C., et al. (2017). Phylogeography of *Toxoplasma gondii* points to a south American origin. *Infection Genet. Evol.* 48, 150–155. doi: 10.1016/j.meegid.2016.12.020
- Botté, C. Y., Dubar, F., McFadden, G. L., Maréchal, E., and Biot, C. (2012). Plasmodium falciparum apicoplast drugs: targets or off-targets? *Chem. Rev.* 112, 1269–1283. doi: 10.1021/cr200258w

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

- Bradley, D., Viéitez, C., Rajeeve, V., Selkrig, J., Cutillas, P. R., and Beltrao, P. (2021). Sequence and structure-based analysis of specificity determinants in eukaryotic protein kinases. *Cell Rep.* 34, 1–12. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108602
- Buljan, M., Ciuffa, R., van Drogen, A., Vichalkovski, A., Mehnert, M., Rosenberger, G., et al. (2020). Kinase interaction network expands functional and disease roles of human kinases. *Mol. Cell* 79, 504–520.e9. doi: 10.1016/j.molcel.2020.07.001
- Bustillo, J. I., Diaz, J. D., Pacheco, I. C., and Gritz, D. C. (2015). Cuban Ocular toxoplasmosis epidemiology study (COTES): incidence and prevalence of ocular toxoplasmosis in central Cuba. *Br. J. Ophthalmol.* 99, 382–386. doi: 10.1136/bjophthalmol-2014-305843
- Caballero-Ortega, H., Uribe-Salas, F. J., Conde-Glez, C. J., Cedillo-Pelaez, C., Vargas-Villavicencio, J. A., Luna-Pastén, H., et al. (2012). Seroprevalence and national distribution of human toxoplasmosis in Mexico: analysis of the 2000 and 2006 national health surveys. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106, 653–659. doi: 10.1016/j.trstmh.2012.08.004
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M. L., Rehman, M., Walther, T. C., et al. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 325, 834–840. doi: 10.1126/science.1175371
- Christiansen, C., Maus, D., Hoppenz, E., Murillo-León, M., Hoffmann, T., Scholz, J., et al. (2022). *In vitro* maturation of *Toxoplasma gondii* bradyzoites in human myotubes and their metabolomic characterization. *Nat. Commun.* 13, 1–15. doi: 10.1038/s41467-022-28730-w
- Cohen, P. (2002). The origins of protein phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* 4, E127–E128. doi: 10.1038/nce0502-e127
- Conceição, A. R., Belucik, D. N., Missio, L., Gustavo Brenner, L., Henrique Monteiro, M., Ribeiro, K. S., et al. (2021). Ocular findings in infants with congenital toxoplasmosis after a toxoplasmosis outbreak. *Ophthalmology* 128, 1346–1355. doi: 10.1016/j.ophtha.2021.03.009
- Coppin, A., Dzierzinski, F., Legrand, S., Montuaire, M., Ferguson, D., and Tomavo, S. (2003). Developmentally regulated biosynthesis of carbohydrate and storage polysaccharide during differentiation and tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*. *Biochimie* 85, 353–361. doi: 10.1016/s0300-9084(03)00076-2
- Cortes, L. J., Flórez Sánchez, A. C., Montelegrè Santa, I. A., and Valbuena, Y. A. (2009). Seroprevalencia de la toxoplasmosis y factores relacionados con las enfermedades transmitidas por alimentos en trabajadores de plantas de beneficio animal en cinco ciudades capitales de Colombia 2008. *Nova* 7, 66. doi: 10.22490/24629448.419
- Cowley, S., Ko, M., Pick, N., Chow, R., Downing, K. J., Gordhan, B. G., et al. (2004). The mycobacterium tuberculosis protein serine/threonine kinase PknG is linked to cellular glutamate/glutamine levels and is important for growth *in vivo*. *Mol. Microbiol.* 52, 1691–1702. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04085.x
- Critchley, W. R., Pellet-Many, C., Ringham-Terry, B., Harrison, M. A., Zachary, I. C., and Ponnambalam, S. (2018). Receptor tyrosine kinase ubiquitination and de-ubiquitination in signal transduction and receptor trafficking. *Cells* 7, 1–24. doi: 10.3390/cells7030022
- Dahl, E. L., Shock, J. L., Shenai, B. R., Gut, J., DeRisi, J. L., and Rosenthal, P. J. (2006). Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3124–3131. doi: 10.1128/AAC.00394-06

- de-la-Torre, A., Sauer, A., Pfaff, A. W., Bourcier, T., Brunet, J., Speeg-Schatz, C., et al. (2013). Severe south American ocular toxoplasmosis is associated with decreased ifn- γ /IL-17a and increased il-6/IL-13 intraocular levels. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, 1–11. doi: 10.1371/journal.pntd.0002541
- de Vries, L. E., Lunghi, M., Krishnan, A., Kooij, T. W. A., and Soldati-Favre, D. (2021). Pantothenate and CoA biosynthesis in apicomplexa and their promise as antiparasitic drug targets. *PLoS Pathog.* 17, 1–24. doi: 10.1371/journal.ppat.1010124
- Dichiara, M., Marrazzo, A., Prezavento, O., Collina, S., Rescifina, A., and Amata, E. (2017). Repurposing of human kinase inhibitors in neglected protozoan diseases. *ChemMedChem* 12, 1235–1253. doi: 10.1002/cmdc.201700259
- Di Felice, E., Roncaglia, F., Venturini, F., Mangone, L., Luminari, S., Cirilli, C., et al. (2018). The impact of introducing tyrosine kinase inhibitors on chronic myeloid leukemia survival: a population-based study. *BMC Cancer* 18, 1–12. doi: 10.1186/s12885-018-4984-3
- Ding, L., Cao, J., Lin, W., Chen, H., Xiong, X., Ao, H., et al. (2020). The roles of cyclin-dependent kinases in cell-cycle progression and therapeutic strategies in human breast cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–28. doi: 10.3390/ijms21061960
- Djurković-Djoković, O., Dupouy-Camet, J., van der Giessen, J., and Dubey, J. P. (2019). Toxoplasmosis: overview from a one health perspective. *Food Waterborne Parasitol.* 15, 1–4. doi: 10.1016/j.fawpar.2019.e00054
- Dnerig, C. (2004). Protein kinases as targets for anti-parasitic chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom* 1697, 155–168. doi: 10.1016/j.bbapap.2003.11.021
- Dnerig, C., Meijer, L., and Mottram, J. C. (2002). Protein kinases as drug targets in parasitic protozoa. *Trends Parasitol.* 18, 366–371. doi: 10.1016/S1471-4922(02)02321-8
- Dubey, R., Staker, B. L., Foe, I. T., Bogoy, M., Myler, P. J., Ngô, H. M., et al. (2017). Membrane skeletal association and post-translational allosteric regulation of toxoplasma gondii GAPDH1. *Mol. Microbiol.* 103, 618–634. doi: 10.1111/mmi.13577
- Ducrocq, J., Simon, A., Lemire, M., De Serres, G., and Lévesque, B. (2021). Exposure to toxoplasma gondii through consumption of raw or undercooked meat: a systematic review and meta-analysis. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 21, 40–49. doi: 10.1089/vbz.2020.2639
- Dunay, L. R., Gajurel, K., Dhakal, R., Liesenfeld, O., and Montoya, J. G. (2018). Treatment of toxoplasmosis: historical perspective, animal models, and current clinical practice. *Clin. Microbiol. Rev.* 31, 1–33. doi: 10.1128/CMR.00057-17
- Dzierszinski, E., Mortuaire, M., Dendouga, N., Popescu, O., and Tomavo, S. (2001). Differential expression of two plant-like enolases with distinct enzymatic and antigenic properties during stage conversion of the protozoan parasite toxoplasma gondii. *J. Mol. Biol.* 309, 1017–1027. doi: 10.1006/jmbi.2001.4730
- Eglen, R. M., and Reisine, T. (2010). Human kinome drug discovery and the emerging importance of atypical allosteric inhibitors. *Expert Opin. Drug Discovery* 5, 277–290. doi: 10.1517/17464411003636820
- Elkoshi, Z. (2021). The binary classification of protein kinases. *J. Inflammation Res.* 14, 929–947. doi: 10.2147/JIR.S303750
- Elsheikha, H. M., Marra, C. M., and Zhu, X. Q. (2020). Epidemiology, pathophysiology, diagnosis, and management of cerebral toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 34, 1–28. doi: 10.1128/CMR.00115-19
- Fekkar, A., Aizenberg, D., Bodaghi, B., Touafek, F., Le Hoang, P., Delmas, J., et al. (2011). Direct genotyping of toxoplasma gondii in ocular fluid samples from 20 patients with ocular toxoplasmosis: predominance of type II in France. *J. Clin. Microbiol.* 49, 1513–1517. doi: 10.1128/JCM.02196-10
- Ferrarini, M. G., Nishimura, L. M., Girard, R. M. B. M., Alencar, M. B., Frago, M. S. L., Araújo-Silva, C. A., et al. (2021). Dichloroacetate and pyruvate metabolism: pyruvate dehydrogenase kinases as targets worth investigating for effective therapy of toxoplasmosis. *mSphere* 6, 1–20. doi: 10.1128/msphere.01002-20
- Ferreira Da Silva, M. D. F., Barbosa, H. S., Groß, U., and Lüder, C. G. K. (2008). Stress-related and spontaneous stage differentiation of toxoplasma gondii. *Mol. Biosyst.* 4, 824–834. doi: 10.1039/b800520f
- Fisher, G. M., Cobbold, S. A., Jezewski, A., Carpenter, E. F., Arnold, M., Cowell, A. N., et al. (2020). The key glycolytic enzyme phosphofruktokinase is involved in resistance to antiplasmodial glycosides. *mBio* 11, 1–19. doi: 10.1128/mBio.02842-20
- Flatt, A., and Shetty, N. (2013). Seroprevalence and risk factors for toxoplasmosis among antenatal women in London: a re-examination of risk in an ethnically diverse population. *Eur. J. Public Health* 23, 648–652. doi: 10.1093/eurpub/cks075
- Fleg, J., Prandota, J., Sovičková, M., and Israili, Z. H. (2014). Toxoplasmosis - a global threat. correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS One* 9, 1–22. doi: 10.1371/journal.pone.0090203
- Fleige, T., Fischer, K., Ferguson, D. J. P., Gross, U., and Bohne, W. (2007). Carbohydrate metabolism in the toxoplasma gondii apicoplast: localization of three glycolytic isoenzymes, the single pyruvate dehydrogenase complex, and a plastid phosphate translocator. *Eukaryot Cell* 6, 984–996. doi: 10.1128/EC.00061-07
- Fletcher, S., Lucantoni, L., Sykes, M. L., Jones, A. J., Holleran, J. P., Saliba, K. J., et al. (2016). Biological characterization of chemically diverse compounds targeting the plasmodium falciparum coenzyme a synthesis pathway. *Parasit Vectors* 9, 1–13. doi: 10.1186/s13071-016-1860-3
- Flores, C., Villalobos-Cerrud, D., Borace, J., Fábrega, L., Norero, X., Sáez-Llorens, X., et al. (2021). Epidemiological aspects of maternal and congenital toxoplasmosis in Panama. *Pathogens* 10, 1–14. doi: 10.3390/pathogens10060764
- Gaji, R. Y., Sharp, A. K., and Brown, A. M. (2021). Protein kinases in toxoplasma gondii. *Int. J. Parasitol.* 51, 415–429. doi: 10.1016/j.ijpara.2020.11.006
- Gómez-Marín, J. E., de-la-Torre, A., Barrios, P., Cardona, N., Álvarez, C., and Herrera, C. (2012). Toxoplasmosis in military personnel involved in jungle operations. *Acta Trop.* 122, 46–51. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.11.019
- Grigg, M. E., Dubey, J. P., and Nussenblatt, R. B. (2015). Ocular toxoplasmosis: lessons from Brazil. *Am. J. Ophthalmol.* 159, 999–1001. doi: 10.1016/j.ajo.2015.04.005
- Halonon, S. K., and Weiss, L. M. (2013). Toxoplasmosis. *Handb. Clin. Neurol.* 114, 125–145. doi: 10.1016/B978-0-444-53490-3.00008-X
- Hanks, S. K., Quinn, A. M., and Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42–52. doi: 10.1126/science.3291115
- Hargrave, K. E., Woods, S., Millington, O., Chalmers, S., Westrop, G. D., and Roberts, C. W. (2019). Multi-omics studies demonstrate toxoplasma gondii-induced metabolic reprogramming of murine dendritic cells. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 9, 1–10. doi: 10.3389/fcimb.2019.00309
- Harrell, M., and Carvounis, P. E. (2014). Current treatment of toxoplasma retinochoroiditis: an evidence-based review. *J. Ophthalmol.* 2014, 1–7. doi: 10.1155/2014/273506
- Henry, C., Haller, L., Blein-Nicolas, M., Zivy, M., Canette, A., Verbrugge, M., et al. (2019). Identification of hanks-type kinase PknB-specific targets in the streptococcus thermophilus phosphoproteome. *Front. Microbiol.* 10, 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2019.01329
- Ficks, K. E., Read, M., Holloway, S. P., Sims, P. F. G., and Hyde, J. E. (1991). Glycolytic pathway of the human malaria parasite plasmodium falciparum: primary sequence analysis of the gene encoding 3-phosphoglycerate kinase and chromosomal mapping studies. *Gene* 100, 123–129. doi: 10.1016/0378-1119(91)90357-H
- Hosseini, S. A., Amouei, A., Sharif, M., Sarvi, S., Galal, L., Javidnia, J., et al. (2019). Human toxoplasmosis: a systematic review for genetic diversity of toxoplasma gondii in clinical samples. *Epidemiol. Infect.* 147, 1–9. doi: 10.1017/S0950268818002947
- Howe, D. K., and Sibley, L. D. (1995). Toxoplasma gondii comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 172, 1561–1566. doi: 10.1093/infdis/172.6.1561
- Humphrey, S. J., James, D. E., and Mann, M. (2015). Protein phosphorylation: a major switch mechanism for metabolic regulation. *Trends Endocrinol. Metab.* 26, 676–687. doi: 10.1016/j.tem.2015.09.013
- Hunter, C. A., and Sibley, L. D. (2012). Modulation of innate immunity by toxoplasma gondii virulence effectors. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 766–778. doi: 10.1038/nrmicro2858
- Huynh, M. H., and Carruthers, V. B. (2022). Toxoplasma gondii excretion of glycolytic products is associated with acidification of the parasitophorous vacuole during parasite egress. *PLoS Pathog.* 18, 1–30. doi: 10.1371/journal.ppat.1010139
- Jones, J. L., and Holland, G. N. (2010). Short report: annual burden of ocular toxoplasmosis in the united states. *Am. J. Trop. Med. Hygiene* 82, 464–465. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0664
- Jones, J. L., Kruszon-Moran, D., Rivera, H. N., Price, C., and Wilkins, P. P. (2014). Toxoplasma gondii seroprevalence in the united states 2009-2010 and comparison with the past two decades. *Am. J. Trop. Med. Hygiene* 90, 1135–1139. doi: 10.4269/ajtmh.14-0013
- Kadian, K., Gupta, Y., Singh, H. V., Kempaiah, P., and Rawat, M. (2018). Apicoplast metabolism: parasite's achilles' heel. *Curr. Top. Med. Chem.* 18, 1987–1997. doi: 10.2174/1568026619666181130134742
- Kanev, G. K., de Graaf, C., de Esch, I. J. P., Leurs, R., Würdinger, T., Westerman, B. A., et al. (2019). The landscape of atypical and eukaryotic protein kinases. *Trends Pharmacol. Sci.* 40, 818–832. doi: 10.1016/j.tips.2019.09.002
- Katlam, C., De Wit, S., O'Doherty, E., Van Glabeke, M., and Clumeck, N. (1996). Pyrimethamine-clindamycin vs. pyrimethamine-sulfadiazine as acute and long-term therapy for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 22, 268–275. doi: 10.1093/clindis/22.2.268
- Kato, K., Sugi, T., and Iwanaga, T. (2012). Roles of apicomplexan protein kinases at each life cycle stage. *Parasitol. Int.* 61, 224–234. doi: 10.1016/j.parint.2011.12.002
- Khan, A., Su, C., German, M., Storch, G. A., Clifford, D. B., and Sibley, L. D. (2005). Genotyping of toxoplasma gondii strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5881–5887. doi: 10.1128/JCM.43.12.5881-5887.2005
- Kieschnick, H., Wakefield, T., Narducci, C. A., and Beckers, C. (2001). Toxoplasma gondii attachment to host cells is regulated by a calmodulin-like domain protein kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 12369–12377. doi: 10.1074/jbc.M011045200
- Knockaert, M., Greengard, P., and Meijer, L. (2002). Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 417–425. doi: 10.1016/S0165-6147(02)02071-0
- KREBS, E. G., and FISCHER, E. H. (1956). The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *BBA - Gen. Subj.* 20, 150–157. doi: 10.1016/0006-3002(56)90273-6
- KREBS, E. G., Graves, D. J., and Fischer, E. H. (1959). Factors affecting the activity of muscle phosphorylase b kinase. *J. Biol. Chem.* 234, 2867–2873. doi: 10.1016/s0021-9258(18)69685-1
- Kurokawa, H., Kato, K., Iwanaga, T., Sugi, T., Sudo, A., Kobayashi, K., et al. (2011). Identification of toxoplasma gondii cAMP dependent protein kinase and its role in the tachyzoite growth. *PLoS One* 6, 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0022492

- Lanz, M. C., Dibitetto, D., and Smolka, M. B. (2019). DNA Damage kinase signaling: checkpoint and repair at 30 years. *EMBO J.* 38, 1–21. doi: 10.15252/embj.2019101801
- Laufer, S., Briner, K., Bajorath, J., Georg, G. L., and Wang, S. (2020). New horizons in drug discovery - understanding and advancing kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* 63, 7921–7922. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c01136
- Lien, C. F., Chen, S. J., Tsai, M. C., and Lin, C. S. (2021). Potential role of protein kinase c in the pathophysiology of diabetes-associated atherosclerosis. *Front. Pharmacol.* 12. doi: 10.3389/fphar.2021.716332
- Liu, H., Wang, X., Shen, P., Ni, Y., and Han, X. (2022). The basic functions of phosphoglycerate kinase 1 and its roles in cancer and other diseases. *Eur. J. Pharmacol.* 920, 174835. doi: 10.1016/j.ejphar.2022.174835
- Lunghi, M., Kloehn, J., Krishnan, A., Varesio, E., Vadas, O., and Soldati-Favre, D. (2022). Pantothenate biosynthesis is critical for chronic infection by the neurotropic parasite toxoplasma gondii. *Nat. Commun.* 13, 1–18. doi: 10.1038/s41467-022-27996-4
- Lyu, C., Chen, Y., Meng, Y., Yang, J., Ye, S., Niu, Z., et al. (2023). The mitochondrial pyruvate carrier coupling glycolysis and the tricarboxylic acid cycle is required for the asexual reproduction of toxoplasma gondii. *Microbiol. Spectr.* 11, 1–14. doi: 10.1128/spectrum.05043-22
- MacRae, J. J., Sheiner, L., Nahid, A., Tonkin, C., Striepen, B., and McConville, M. J. (2012). Mitochondrial metabolism of glucose and glutamine is required for intracellular growth of toxoplasma gondii. *Cell Host Microbe* 12, 682–692. doi: 10.1016/j.chom.2012.09.013
- Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* 15, 1–10. doi: 10.1186/gb4184
- Manning, G. (2005). Genomic overview of protein kinases. *WormBook*, 1–19. doi: 10.1895/wormbook.1.60.1
- Manning, B. D., and Cantley, L. C. (2002). Hitting the target: emerging technologies in the search for kinase substrates. *Sci. STKE* 2002, 1–5. doi: 10.1126/stke.2002.162.pe49
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912–1934. doi: 10.1126/science.1075762
- Mareze, M., do Nascimento Benitez, A., Perola Drulla Brandão, A., Pinto Ferreira, F., Miura, A. C., Cardoso Martins, F. D., et al. (2019). Socioeconomic vulnerability associated to toxoplasma gondii exposure in southern Brazil. *PLoS One* 14, 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0212375
- Martin, A. M., Liu, T., Lynn, B. C., and Sinai, A. P. (2007). The toxoplasma gondii parasitophorous vacuole membrane: transactions across the border. *J. Eukaryotic Microbiol.* 54, 25–28. doi: 10.1111/j.1550-7408.2006.00230.x
- McNae, I. W., Kinkad, J., Malik, D., Yen, L. H., Walker, M. K., Swain, C., et al. (2021). Fast acting allosteric phosphofruktokinase inhibitors block trypanosome glycolysis and cure acute African trypanosomiasis in mice. *Nat. Commun.* 12, 1–10. doi: 10.1038/s41467-021-21273-6
- Michalak, E. D., Webster, L., and Mackey, J. R. (2008). Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic therapy for cancer. *Br. J. Cancer* 99, 989–994. doi: 10.1038/sj.bjc.6604554
- Mikalsen, T., Gerits, N., and Moens, U. (2006). Inhibitors of signal transduction protein kinases as targets for cancer therapy. *Biotechnol. Annu. Rev.* 12, 153–223. doi: 10.1016/S1387-2656(06)12006-2
- Miranda-Saavedra, D., Gabaldón, T., Barton, G. J., Langley, G., and Doerig, C. (2012). The kinomes of apicomplexan parasites. *Microbes Infect.* 14, 796–810. doi: 10.1016/j.micinf.2012.04.007
- Miranda-Saavedra, D., Stark, M. J. R., Packer, J. C., Vivares, C. P., Doerig, C., and Barton, G. J. (2007). The complement of protein kinases of the microsporidium encephalitozoon cuniculi in relation to those of saccharomyces cerevisiae and schizosaccharomyces pombe. *BMC Genomics* 8, 1–21. doi: 10.1186/1471-2164-8-309
- Modi, V., and Dunbrack, R. L. (2022). Kincore: a web resource for structural classification of protein kinases and their inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 50, D654–D664. doi: 10.1093/nar/gkab920
- Morrison, D. A. (2008). Prospects for elucidating the phylogeny of the apicomplexa. *Parasite* 15, 191–196. doi: 10.1051/parasite/2008153191
- Müller, U. B., and Howard, J. C. (2016). The impact of toxoplasma gondii on the mammalian genome. *Curr. Opin. Microbiol.* 32, 19–25. doi: 10.1016/j.mib.2016.04.009
- Nair, S. C., Brooks, C. F., Goodman, C. D., Strum, A., McFadden, G. L., Sundriyal, S., et al. (2011). Apicoplast isoprenoid precursor synthesis and the molecular basis of fosmidomycin resistance in toxoplasma gondii. *J. Exp. Med.* 208, 1547–1559. doi: 10.1084/jem.20110039
- Niu, Z., Ye, S., Liu, J., Lyu, M., Xue, L., Li, M., et al. (2022). Two apicoplast dwelling glycolytic enzymes provide key substrates for metabolic pathways in the apicoplast and are critical for toxoplasma growth. *PLoS Pathog.* 18, e1011009. doi: 10.1371/journal.ppat.1011009
- Ojo, K. K., Larson, E. T., Keyloun, K. R., Castaneda, L. J., Derocher, A. E., Inampudi, K. K., et al. (2010). Toxoplasma gondii calcium-dependent protein kinase 1 is a target for selective kinase inhibitors. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 602–607. doi: 10.1038/nsmb.1818
- Oliveira, A. P., and Sauer, U. (2012). The importance of post-translational modifications in regulating saccharomyces cerevisiae metabolism. *FEMS Yeast Res.* 12, 104–117. doi: 10.1111/j.1567-1364.2011.00765.x
- Oppenheim, R. D., Creek, D. J., Macrae, J. L., Modrzynska, K. K., Pino, P., Limenitakis, J., et al. (2014). BCKDH: the missing link in apicomplexan mitochondrial metabolism is required for full virulence of toxoplasma gondii and plasmodium berghei. *PLoS Pathog.* 10, 1–18. doi: 10.1371/journal.ppat.1004263
- Otto, T., and Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 17, 93–115. doi: 10.1038/nrc.2016.138
- Pal, B., Pybus, B., Muccio, D. D., and Chattopadhyay, D. (2004). Biochemical characterization and crystallization of recombinant 3-phosphoglycerate kinase of plasmodium falciparum. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Proteins Proteomics* 1699, 277–280. doi: 10.1016/j.bbapap.2004.01.003
- Pappas, G., Roussos, N., and Falagas, M. E. (2009). Toxoplasmosis snapshots: global status of toxoplasma gondii seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int. J. Parasitol.* 39, 1385–1394. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.04.003
- Parsons, M., Worthey, E. A., Ward, P. N., and Mottram, J. C. (2005). Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: leishmania major, trypanosoma brucei and trypanosoma cruzi. *BMC Genomics* 6, 1–19. doi: 10.1186/1471-2164-6-127
- Patel, M. S., Nemeria, N. S., Furey, W., and Jordan, F. (2014). The pyruvate dehydrogenase complexes: structure-based function and regulation. *J. Biol. Chem.* 289, 16615–16623. doi: 10.1074/jbc.R114.563148
- Peng, Z. Y., Mansour, J. M., Araujo, F., Ju, J. Y., McKenna, C. E., and Mansour, T. E. (1995). Some phosphonic acid analogs as inhibitors of pyrophosphate-dependent phosphofruktokinase, a novel target in toxoplasma gondii. *Biochem. Pharmacol.* 49, 105–113. doi: 10.1016/0006-2952(94)00437-Q
- Pomel, S., Luk, F. C. Y., and Beckers, C. J. M. (2008). Host cell egress and invasion induce marked relocations of glycolytic enzymes in toxoplasma gondii tachyzoites. *PLoS Pathog.* 4, 1–15. doi: 10.1371/journal.ppat.1000188
- Prada, P. O., and Saad, M. J. A. (2013). Tyrosine kinase inhibitors as novel drugs for the treatment of toxoplasmosis. *Expert Opin. Investig. Drugs* 22, 751–763. doi: 10.1517/13543784.2013.802768
- Rajapakse, S., Chrisnan Shivanthan, M., Samaranyake, N., Rodrigo, C., and Deepika Fernando, S. (2013). Antibiotics for human toxoplasmosis: a systematic review of randomized trials. *Pathog. Glob Health* 107, 162–169. doi: 10.1179/204773213Y.0000000094
- Robert-Gangneux, F., and Dardé, M. L. (2012). Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 264–296. doi: 10.1128/CMR.05103-11
- Rosada, B., Bekier, A., Cytarska, J., Plaziński, W., Zavyalova, O., Sikora, A., et al. (2019). Benzo[b]thiophene-thiazoles as potent anti-toxoplasma gondii agents: design, synthesis, tyrosinase/tyrosine hydroxylase inhibitors, molecular docking study, and antioxidant activity. *Eur. J. Med. Chem.* 184, 1–12. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.111765
- Rotella, D. P. (2012). Recent results in protein kinase inhibition for tropical diseases. *Bioorg Med. Chem. Lett.* 22, 6788–6793. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.09.044
- Ruan, J., Mouveaux, T., Light, S. H., Minasov, G., Anderson, W. F., Tomavo, S., et al. (2015). The structure of bradyzoite-specific enolase from toxoplasma gondii reveals insights into its dual cytoplasmic and nuclear functions. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 71, 417–426. doi: 10.1107/S1399004714026479
- Saito, T., Maeda, T., Nakazawa, M., Takeuchi, T., Nozaki, T., and Asai, T. (2002). Characterisation of hexokinase in toxoplasma gondii tachyzoites. *Int. J. Parasitol.* 32, 961–967. doi: 10.1016/S0020-7519(02)00059-0
- Sakikawa, M., Noda, S., Hanaoka, M., Nakayama, H., Hojo, S., Kakinoki, S., et al. (2012). Anti-toxoplasma antibody prevalence, primary infection rate, and risk factors in a study of toxoplasmosis in 4,466 pregnant women in Japan. *Clin. Vaccine Immunol.* 19, 365–367. doi: 10.1128/CVI.05486-11
- Salcedo-Sora, J. E., Caamano-Gutierrez, E., Ward, S. A., and Biagini, G. A. (2014). The proliferating cell hypothesis: a metabolic framework for plasmodium growth and development. *Trends Parasitol.* 30, 170–175. doi: 10.1016/j.pt.2014.02.001
- Sato, Y., Tate, H., Yoshizawa, F., and Sato, Y. (2020). Data on the proliferation and differentiation of C2C12 myoblast treated with branched-chain ketoacid dehydrogenase kinase inhibitor. *Data Brief* 31, 105766. doi: 10.1016/j.dib.2020.105766
- Shah, I. M., Laaberk, M. H., Popham, D. L., and Dworkin, I. (2008). A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. *Cell* 135, 486–496. doi: 10.1016/j.cell.2008.08.039
- Shamma, A. M., Powell, T. G., and Benmerzouga, I. (2021). Adverse outcomes associated with the treatment of toxoplasma infections. *Sci. Rep.* 11, 1–8. doi: 10.1038/s41598-020-80569-7
- Shen, B., and Sibley, L. D. (2014). Toxoplasma aldolase is required for metabolism but dispensable for host-cell invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 3567–3572. doi: 10.1073/pnas.1315156111
- Shukla, A., Olszewski, K. L., Llinás, M., Rommereim, L. M., Fox, B. A., Bzik, D. J., et al. (2018). Glycolysis is important for optimal asexual growth and formation of mature tissue cysts by toxoplasma gondii. *Int. J. Parasitol.* 48, 955–968. doi: 10.1016/j.ijpara.2018.05.013
- Shummugam, S., Arnold, C. S., Dass, S., Nicholas, J. K., and Botté, C. Y. (2022). The flexibility of apicomplexa parasites in lipid metabolism. *PLoS Pathog.* 18, 1–19. doi: 10.1371/journal.ppat.1010313

- Shwab, E. K., Saraf, P., Zhu, X. Q., Zhou, D. H., McFerrin, B. M., Ajzenberg, D., et al. (2018). Human impact on the diversity and virulence of the ubiquitous zoonotic parasite *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, E6956–E6963. doi: 10.1073/pnas.1722202115
- Shwab, E. K., Zhu, X. Q., Majumdar, D., Pena, H. F. J., Gennari, S. M., Dubey, J. P., et al. (2014). Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology* 141, 453–461. doi: 10.1017/S0031182013001844
- Skariah, S., McIntyre, M. K., and Mordue, D. G. (2010). *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitol. Res.* 107, 253–260. doi: 10.1007/s00436-010-1899-6
- Smith, C. D., Chattopadhyay, D., and Pal, B. (2011). Crystal structure of plasmodium falciparum phosphoglycerate kinase: evidence for anion binding in the basic patch. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412, 203–206. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.045
- Spalding, S. M., Reis Annendoira, M. R., Klein, C. H., and Ribeiro, L. C. (2005). Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in south of Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38, 173–177. doi: 10.1590/S0037-86822005000200009
- Spoel, S. H. (2018). Orchestrating the proteome with post-translational modifications. *J. Exp. Bot.* 69, 4499–4503. doi: 10.1093/jxb/ery295
- Srivastava, S. S., Darling, J. E., Suryadi, J., Morris, J. C., Drew, M. E., and Subramaniam, S. (2020). Plasmodium vivax and human hexokinases share similar active sites but display distinct quaternary architectures. *IUCr* 7, 453–461. doi: 10.1107/S2052252520002456
- Sroka, S., Bartelheimer, N., Winter, A., Heukelbach, J., Ariza, I., Ribeiro, H., et al. (2010). Prevalence and risk factors of toxoplasmosis among pregnant women in Fortaleza, northeastern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hygiene* 83, 528–533. doi: 10.4269/ajtmh.2010.10-0082
- Stacpoole, P. W. (2017). Therapeutic targeting of the pyruvate dehydrogenase Complex/Pyruvate dehydrogenase kinase (PDC/PDK) axis in cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 109, 1–14. doi: 10.1093/jnci/djx071
- Stancik, I. A., Šestak, M. S., Ji, B., Axelson-Fisk, M., Franjevic, D., Jers, C., et al. (2018). Serine/Threonine protein kinases from bacteria, archaea and eukarya share a common evolutionary origin deeply rooted in the tree of life. *J. Mol. Biol.* 430, 27–32. doi: 10.1016/j.jmb.2017.11.004
- Sutendra, G., and Michelakis, E. D. (2013). Pyruvate dehydrogenase kinase as a novel therapeutic target in oncology. *Front. Oncol.* 3, doi: 10.3389/fonc.2013.00038
- Swift, R. P., Rajaram, K., Liu, H. B., and Prigge, S. T. (2021). Dephospho-CoA kinase, a nuclear-encoded apicoplast protein, remains active and essential after plasmodium falciparum apicoplast disruption. *EMBO J.* 40, 1–15. doi: 10.15252/embj.2020107247
- Talevich, E., Tobin, A. B., Kannan, N., and Doerig, C. (2012). An evolutionary perspective on the kinome of malaria parasites. *Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.* 367, 2607–2618. doi: 10.1098/rstb.2012.0014
- Tataranni, T., and Piccoli, C. (2019). Dichloroacetate (DCA) and cancer: an overview towards clinical applications. *Oxid. Med. Cell Longev* 2019, 1–14. doi: 10.1155/2019/8201079
- Tjhin, F. T., Howieson, V. M., Spry, C., van Dooren, G. G., and Saliba, K. J. (2021). A novel heteromeric pantothenate kinase complex in apicomplexan parasites. *PLoS Pathog.* 17, 1–25. doi: 10.1371/journal.ppat.1009797
- Tomavo, S., and Boothroyd, J. C. (1995). Interconnection between organellar functions, development and drug resistance in the protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 25, 1293–1299. doi: 10.1016/0020-7519(95)00066-B
- Tso, S. C., Gui, W. J., Wu, C. Y., Chuang, J. L., Qi, X., Skvorak, K. J., et al. (2014). Benzothioephene carboxylate derivatives as novel allosteric inhibitors of branched-chain α -ketoacid dehydrogenase kinase. *J. Biol. Chem.* 289, 20583–20593. doi: 10.1074/jbc.M114.569251
- Van Dooren, G. G., and Striepen, B. (2013). The algal past and parasite present of the apicoplast. *Annu. Rev. Microbiol.* 67, 271–289. doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155741
- Waller, R. F., Keeling, P. J., Donald, R. G. K., Striepen, B., Handman, E., Lang-Unnasch, N., et al. (1998). Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 12352–12357. doi: 10.1073/pnas.95.21.12352
- Waller, R. F., Ralph, S. A., Reed, M. B., Su, V., Douglas, J. D., Minnikin, D. E., et al. (2003). A type II pathway for fatty acid biosynthesis presents drug targets in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 297–301. doi: 10.1128/AAC.47.1.297-301.2003
- Walloch, P., Hansen, C., Priegann, T., Schade, D., and Beitz, E. (2021). Pentaffluoro-3-hydroxy-pent-2-en-1-ones potently inhibit FNT-type lactate transporters from all five human-pathogenic *Plasmodium* species. *ChemMedChem* 16, 1283–1289. doi: 10.1002/cmdc.202000952
- Wallon, M., and Peyron, F. (2015). Effect of antenatal treatment on the severity of congenital toxoplasmosis. *Clin. Infect. Dis.* 62, 811–812. doi: 10.1093/cid/civ1035
- Wang, Y. C., Peterson, S. E., and Loring, J. F. (2014). Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells. *Cell Res.* 24, 143–160. doi: 10.1038/cr.2013.151
- Wang, X., Shen, X., Yan, Y., and Li, H. (2021). Pyruvate dehydrogenase kinases (PDKs): an overview toward clinical applications. *Biosci. Rep.* 41, 1–15. doi: 10.1042/BSR20204402
- Wang, H. L., Wen, L. M., Pei, Y. J., Wang, F., Yin, L. T., Bai, J. Z., et al. (2016). Recombinant *Toxoplasma gondii* phosphoglycerate mutase 2 confers protective immunity against toxoplasmosis in BALB/c mice. *PLoS One* 11, e0160121. doi: 10.1371/journal.pone.0160121
- Waters, N. C., and Geyer, J. A. (2003). Cyclin-dependent protein kinases as therapeutic drug targets for antimalarial drug development. *Expert Opin. Ther. Targets* 7, 7–17. doi: 10.1517/14728222.7.1.7
- Wilking, H., Thamm, M., Stark, K., Aebischer, T., and Seeber, F. (2016). Prevalence, incidence estimations, and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study. *Sci. Rep.* 6, 1–9. doi: 10.1038/srep22551
- Xia, N., Yang, J., Ye, S., Zhang, L., Zhou, Y., Zhao, J., et al. (2018). Functional analysis of *Toxoplasma* lactate dehydrogenases suggests critical roles of lactate fermentation for parasite growth *in vivo*. *Cell Microbiol.* 20, 1–15. doi: 10.1111/cmi.12794
- Xia, N., Ye, S., Liang, X., Chen, P., Zhou, Y., Fang, R., et al. (2019). Pyruvate homeostasis as a determinant of parasite growth and metabolic plasticity in *Toxoplasma gondii*. *mBio* 10, 1–16. doi: 10.1128/mBio.00898-19
- Xiao, Y., Yin, J., Jiang, N., Xiang, M., Hao, L., Lu, H., et al. (2010). Seroepidemiology of human *Toxoplasma gondii* infection in China. *BMC Infect. Dis.* 10, 0–4. doi: 10.1186/1471-2334-10-4
- Xu, X. J., Gauthier, M. S., Hess, D. T., Apovian, C. M., Cacicedo, J. M., Gokce, N., et al. (2012). Insulin sensitive and resistant obesity in humans: AMPK activity, oxidative stress, and depot-specific changes in gene expression in adipose tissue. *J. Lipid Res.* 53, 792–801. doi: 10.1194/jlr.P022905
- Xue, B., Jeffers, V., Sullivan, W. J., and Uversky, V. N. (2013). Protein intrinsic disorder in the acetylome of intracellular and extracellular *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biosyst.* 9, 645–657. doi: 10.1039/c3mb25517d
- Yang, X., Yin, X., Liu, J., Niu, Z., Yang, J., and Shen, B. (2022). Essential role of pyrophosphate homeostasis mediated by the pyrophosphate-dependent phosphofructokinase in *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 18, 1–21. doi: 10.1371/journal.ppat.1010293
- Yu, L., Chen, X., Sun, X., Wang, L., and Chen, S. (2017). The glycolytic switch in tumors: how many players are involved? *J. Cancer* 8, 3430–3440. doi: 10.7150/jca.21125
- Yu, Y., Zhang, H., Guo, F., Sun, M., and Zhu, G. (2014). A unique hexokinase in *Cryptosporidium parvum*, an apicomplexan pathogen lacking the krebs cycle and oxidative phosphorylation. *Protist* 165, 701–714. doi: 10.1016/j.protis.2014.08.002
- Zhang, J., Yang, P. L., and Gray, N. S. (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* 9, 28–39. doi: 10.1038/nrc2559
- Zhou, M., Shao, J., Wu, C. Y., Shu, L., Dong, W., Liu, Y., et al. (2019). Targeting BCAA catabolism to treat obesity-associated insulin resistance. *Diabetes* 68, 1730–1746. doi: 10.2337/db18-0927

ANEXO II – Dados referentes às análises filogenéticas dos complexos desidrogenases BCKDH/DPDH e das quinases PDK/BCKDK

Quadro 1: Dados utilizados para as análises filogenéticas da subunidade E1-alfa do complexo BCKDH em diferentes grupos de organismos

FILO	CLASSE	ORDEM	FAMILIA	ESPECIE	ToxoDB ID	NCBI ID	PlasmODB	E-value (E1 DH)	
Apicomplexa	Aconoidasida	Proplasmida	Babesiidae	<i>Babesia bigemina</i>	-	XP_012768856.1	-	5.56e-88	
				<i>Babesia bovis</i>	-	BAN64809.1	-	3.50e-90	
				<i>Babesia caballi</i>	-	GI>X61488.1	-	1.63e-89	
				<i>Babesia divergens</i>	-	KAK1933417.1	-	6.99e-90	
				<i>Babesia duncani</i>	-	KAK2196436.1	-	2.97e-88	
				<i>Babesia gibsoni</i>	-	KAK1444409.1	-	1.58e-96	
				<i>Babesia microti</i>	-	XP_021337179.1	-	6.05e-90	
				<i>Babesia ovata</i>	-	XP_028864976.1	-	2.12e-87	
				<i>Babesia ovis</i>	-	GFE53419.1	-	4.69e-91	
				<i>Theileria annulata</i>	-	XP_963356.1	-	6.84e-90	
				<i>Theileria equi</i>	-	XP_004831227.1	-	5.62e-96	
				<i>Theileria orientalis</i>	-	UKJ89904.2	-	4.88e-91	
				<i>Theileria parva</i>	-	XP_764355.1	-	1.66e-88	
				<i>Hepatozys sp.</i>	-	VWU52883.1	-	HEP_00484700	4.57e-83
				<i>Plasmodium adleri</i>	-	-	-	PADL01_1311500	1.61e-81
				<i>Plasmodium berghei</i>	-	-	-	PBANKA_1411100	1.45e-79
				<i>Plasmodium bilicollinsi</i>	-	-	-	PBILCG01_1313000	1.28e-81
<i>Plasmodium blacklocki</i>	-	-	-	PBLACG01_1310800	7.13e-81				
	Haemosporida		Plasmodiidae						

Filo	Classe	Ordem	Família	Espécie	ToxoDB ID	NCBI ID	PlasmODB	E-value (E1 DH)
Apicomplexa	Aconoidasida	Haemosporidia	Plasmodiidae	<i>Plasmodium brasilianum</i>	-	KAI4834693.1	MKS88_005368	3.92e-77
				<i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i>	-	XP_744777.2	PCHAS_1413000	8.26e-81
				<i>Plasmodium coatneyi</i>	-	XP_019916228.1	PCOAH_00038490	3.76e-81
				<i>Plasmodium cynomolgi</i>	-	XP_004224740.1	PCYB_142210	7.78e-72
				<i>Plasmodium falciparum</i>	-	XP_001349853.1	PF3D7_1312600	4.42e-83
				<i>Plasmodium fragile</i>	-	XP_012333268.1	AK88_00194	1.05e-79
				<i>Plasmodium gaboni</i>	-	XP_018639932.1	PGSY75_1312600	1.70e-81
				<i>Plasmodium gallinaceum</i>	-	XP_028530317.1	PGAL8A_00508900	4.76e-83
				<i>Plasmodium gonderi</i>	-	XP_028545923.1	-	5.60e-79
				<i>Plasmodium inui</i>	-	XP_008814338.1	C922_00500	2.48e-80
				<i>Plasmodium knowlesi</i>	-	OTN64240.1	PKNH_1413300	1.80e-80
				<i>Plasmodium malariae</i>	-	XP_028864195.1	PmUG01_14029400	3.92e-77
				<i>Plasmodium ovale</i>	-	SBT82291.1	PocGH01_14020800	5.38e-79
				<i>Plasmodium praefalciparum</i>	-	-	PPRFG01_1314500	3.64e-83
				<i>Plasmodium reichenowi</i>	-	XP_012764506.2	PRCDC_1311600	4.14e-83
				<i>Plasmodium relictum</i>	-	XP_028534897.1	PRELSG_1410600	1.27e-81
<i>Plasmodium vinckei</i>	-	CAD2113004.1	PVVCY_1401330	1.18e-80				

Filo	Classe	Ordem	Familia	Espécie	ToxoDB ID	NCBI ID	PlasmioDB	E-value (E1 DH)	
Apicomplexa	Aconoidasida	Haemosporidia	Plasmodiidae	<i>Plasmodium vivax</i>	-	XP_001617054.1	PVP01_1413600	1.03e-78	
			Haemoproteidae	<i>Plasmodium yoelii</i>	-	XP_725487.1	PY17X_1412900	1.66e-80	
	Nephromycida				<i>Haemoproteus tartakovskyi</i>	-	-	Htart_000285500	4.57e-83
					<i>Cardiosporidium cionae</i>	-	KAF8821684.1	-	1.90e-91
					<i>Cyclospora cayatanensis</i> CHN_HEND1	cyc_04563	XP_026193821.1	-	8.99e-81
					<i>Eimeria acervulina</i>	EAH_00061100	XP_013248831.1	-	1.93e-79
					<i>Eimeria brunetti</i>	EBH_0047620	CDJ52180.1	-	5.46e-92
					<i>Eimeria faeliciformis</i>	EiaB_MINUS_13716.g1221	-	-	1.47e-78
					<i>Eimeria maxima</i>	EMWEY_00054560	XP_013335591.1	-	3.36e-10
					<i>Eimeria necatrix</i>	ENH_00076290	XP_013438420.1	-	5.5e-68
					<i>Eimeria tenella</i>	ETH2_1049200	XP_013234241.1	-	5.7e-87
					Coccidia	Conoidasida			<i>Besnoitia besnoiti</i>
	<i>Besnoitia besnoiti</i>	BESB_024810	XP_029215524.1	-					1.04e-77
	<i>Cystoisospora suis</i>	CSUI_002465	-	-					1.40e-88
	<i>Hammondia hammondi</i>	HHA_239490	-	-					5.30e-86
	<i>Hammondia hammondi</i>	HHA_292100	-	-					1.43e-82
	<i>Neospora caninum</i> Liverpool	NCLIV_016110	CEL65777.1	-					1.16e-84
	<i>Neospora caninum</i> Liverpool	NCLIV_012850	XP_003881524.1	-					4.75e-64
	<i>Sarcocystis neurona</i>	SN3_00301690	-	-					7.20e-89
	<i>Sarcocystis neurona</i>	SN3_00900025	-	-					3.28e-79
	<i>Toxoplasma gondii</i> ME49	TGME49_239490	XP_002366588.2	-					2.39e-85
	<i>Toxoplasma gondii</i> ME49	TGME49_292100	XP_002368552.1	-	2.81e-84				

Filo	Classe	Ordem	Família	Espécie	ToxoDB ID	NCBI ID	PlasmODB	E-value (E1 DH)	
Ciliophora	Spirotrichea	Sporodotrichida	Oxytrichidae	<i>Stylonychia lemnae</i>	-	CDW72849.1	-	4.27e-94	
			Halteriidae	<i>Halteria grandinella</i>	-	TNV84003.1	-	1.03e-100	
	Heterotrichea	Euplotida	Euplotidae	<i>Moneuplotes crassus</i>	-	CAI2370674.1	-	1.29e-85	
				<i>Blepharisma stolfei</i>	-	CAG9321799.1	-	6.17e-94	
		Heterotrichida	Stentoridae	<i>Stentor coeruleus</i>	-	OMJ76956.1	-	3.63e-97	
					-	OMJ66661.1	-	5.90e-94	
		Oligohymenophorea	Peniculida	Parameciidae	<i>Paramecium octaurelia</i>	-	CAD8176016.1	-	1.22e-88
					<i>Pseudocohnilembus persalinus</i>	-	CAD8167561.1	-	1.90e-88
			Phlaesterida	Pseudocohnilembidae	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	-	XP_004030224.1	-	1.06e-90
					<i>Tetrahymena thermophila</i>	-	XP_001026420.2	-	4.16e-97
Colpodellida	Vitrellaceae		<i>Vitrella brassicaformis</i>	-	CEL91651.1	-	2.36e-92		
			<i>Chromera velia</i>	-	CEL91940.1	-	1.51e-88		
Dinoflagellata	Dinophyceae	Suessiales	Chromeraceae	<i>Cladocoptium goreau</i>	-	JAHBMJ010000404.1	-	7.31e-91	
			<i>Durusdinium trenchii</i>	-	CAL1140186.1	-	1.44e-88		
			<i>Effrenium voratum</i>	-	CAK9053038.1	-	1.34e-87		
			<i>Polarella glacialis</i>	-	CAJ1348725.1	-	1.02e-89		
			<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	-	CAE8656634.1	-	6.69e-91		
			<i>Symbiodinium natans</i>	-	CAE8628092.1	-	5.18e-86		
			<i>Symbiodinium necroappetens</i>	-	CAE7182159.1	-	4.37e-86		
			<i>Symbiodinium pilosum</i>	-	CAE7311788.1	-	5.45e-104		
			<i>Symbiodinium sp. KB8</i>	-	CAE7476291.1	-	7.29e-89		
				-	CAE7384605.1	-	1.81e-87		
	-	CAE7894490.1	-	4.94e-100					

Filo	Classe	Ordem	Família	Espécie	ToxoDB ID	NCBI ID	Plasmo DB	E-value (E1 DH)
Perkinsozoa	Perkinsea	Perkinsida	Perkinsidae	<i>Perkinsus olsenii</i>	-	KAF4684757.1	-	7.51e-97
				<i>Perkinsus marinus</i>	-	XP_002775720.1	-	1.4e-91
				<i>Perkinsus chesapeakei</i>	-	KAF4663402.1	-	9.5e-68
Bacillario phyta	Bigyra	Thraustochytrida	Thraustochytriaceae	<i>Hondaea fermentalgiana</i>	-	GBG26140.1	-	1.41e-104
				<i>Fistulifera solaris</i>	-	GAX13740.1	-	1.89e-99
					-	GAX21827.1	-	1.33e-100
Ochrophyta	Bolidophyceae	Parmales	Triparmaceae	<i>Triparma strigata</i>	-	GMH81490.1	-	9.81e-102
				<i>Nannochloropsis gaditana</i>	-	EWM25336.1	-	1.46e-103
				<i>Aureococcus anophagefferens</i>	-	XP_009040732.1	-	1.34e-94
				<i>Tribonema minus</i>	-	KAG5178102.1	-	3.79e-101
				<i>Aphanomyces stellatus</i>	-	KAF0688070.1	-	3.17e-100
Oomycota	Phytoomyxa	Saprolegniales	Saprolegniaceae	<i>Plasmodiophora brassicae</i>	-	CEO97018.1	-	1.97e-112
				<i>Marteilia pararefringens</i>	-	ND/A	-	ND/A
Endomyxa	Ascetosporea	Paramyxida	Marteiliidae	<i>Reticulomyxa filosa</i>	-	ETO26597.1	-	2.56e-67
				<i>Paulinella micropora</i>	-	ND/A	-	ND/A
Retaria	Foraminifera	Monothalamids	Reticulomyxidae	<i>Cercozoa sp. M6MM</i>	-	MES1912172.1	-	4.44e-88
					-		-	
Cercosozoa	Imbricatea	Euglyphida	Paulinellidae		-		-	
					-		-	

Filo	Classe	Ordem	Família	Espécie	ToxoDB ID	NCBI ID	Plasmo DB	E-value (E1 DH)
Chlorophyta	Chloropicophyceae	Chloropiales	Chloropicaceae	<i>Chloropicon roscoffensis</i>	-	WZN61384.1	-	6.07e-93
	Chlorophyceae	Sphaeropleales	Selenastraceae	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	-	GBF89985.1	-	4.62e-95
	Mamiellophyceae	Mamiellales	Mamiellaceae	<i>Micromonas pusilla</i>	-	ND/A	-	ND/A
Chlorophyta	Magnoliopsida	Brassicales	Brassicaceae	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	NP_173562.1	-	5.05e-109
	Pyramimonadophyceae	Pyramimonadales	Pyramimonadaceae	<i>Cymbomonas tetramitiformis</i>	-	NP_568209.1	-	8.94e-107
	Trebouxiophyceae			<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	-	KAK3242079.1	-	1.93e-100
	Ulvoephyceae	Bryopsidales	Bryopsidaceae	<i>Bryopsis sp. KO-2023</i>	-	XP_005645171.1	-	3.42e-103
Rhodophyta	Bangiophyceae	Cyanidiales	Cyanidiaceae	<i>Cyanidiococcus yangmingshanensis</i>	-	KAF6001385.1	-	3.3e-87
				<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	-	XP_005536000.1	-	5.2e-84
				<i>Galdieria partita</i>	-	GJQ12319.1/GJQ12927.1	-	5.3e-94
				<i>Galdieria sulphuraria</i>	-	XP_005704750.1	-	2.2e-92
Actinomycetota	Flavobacteria	Leptolyngbyales	Microcoleaceae	<i>Porphyridium purpureum</i>	-	KAA8494579.1	-	2.3e-87
				<i>Rhodorus marinus</i>	-	KAJ8903418.1	-	1.2e-96
				<i>Nocardioides marinus</i>	-	MBY6137789.1	-	8.11e-99
				<i>Crocinitomicaceae bacterium</i>	-	MEJ6589735.1	-	3.31e-73
Bacteroidota	Cyanophyceae	Oscillatoriales	Leptolyngbyaceae	<i>Pantanalinema sp.</i>	-	HEY9900794.1	-	8.73e-107
				<i>Planktothrix sp.</i>	-	HEY9772781.1	-	9.16e-104
				<i>Stenomitos sp.</i>	-	HEY9857571.1	-	4.20e-108
				<i>Coleofasciculaceae cyanobacterium</i>	-	HEY9686203.1	-	7.01e-99
Pseudomonadota	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillales	<i>Rickettsiales bacterium</i>	-	MBB20726.1	-	2.63e-108
				<i>Blastomonas sp. CACJA14H2</i>	-	ESZ87497.1	-	2.02e-112
				<i>Rhodospirillales bacterium</i>	-	MDB5361231.1	-	1.41e-111
				<i>Kiloniellales bacterium</i>	-	HLW28916.1	-	7.44e-100

Quadro 2: Dados utilizados para as análises filogenéticas da subunidade E1-alfa do complexo PDH em diferentes grupos de organismos

Filo	Classe	Ordem	Família	Espécie	ToxoDB ID	NCBI ID	PlasmoDB	E-value (E1 DH)
Apicomplexa	Aconidiasida	Haemosporidia	Plasmodiidae	<i>Hepatocystis sp.</i>	-	-	HEP_00461700	5.53e-53
				<i>Plasmodium adleri</i>	-	-	PADL01_1122700	3.42e-61
				<i>Plasmodium berghei</i>	-	XP_034421588.1	PBANKA_0923800	1.91e-61
				<i>Plasmodium billcollinsi</i>	-	-	PBILCG01_1121000	7.69e-63
				<i>Plasmodium blacklocki</i>	-	-	PBLACG01_1122300	1.53e-61
				<i>Plasmodium brasilianum</i>	-	XP_067073421.1	MKS88_002844	2.18e-57
				<i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i>	-	SCM22148.1	PCHAS_0920600	3.95e-61
				<i>Plasmodium coatneyi</i>	-	XP_019914944.1	PCOAH_00025740	1.28e-63
				<i>Plasmodium cynomolgi</i>	-	XP_004222467.1	PCYB_093050	7.35e-61
				<i>Plasmodium falciparum</i>	-	XP_001347927.1	PF3D7_1124500	1.69e-62
				<i>Plasmodium fragile</i>	-	XP_012335761.1	AK88_02713	2.83e-63
				<i>Plasmodium gaboni</i>	-	SOV15685.1	PGSY75_1124500	3.39e-63
				<i>Plasmodium gallinaceum</i>	-	XP_028529098.1	PGAL8A_00351100	2.35e-63
				<i>Plasmodium gonderi</i>	-	XP_028543602.1	-	6.03e-53
				<i>Plasmodium inui</i>	-	XP_008817945.1	C922_04138	7.00e-64
				<i>Plasmodium knowlesi</i>	-	XP_002259247.1	PKNH_0922300	8.95e-63
				<i>Plasmodium malariae</i>	-	XP_028861661.1	PmUG01_09033700	1.11e-58
				<i>Plasmodium ovale</i>	-	SBT35320.1	PocGH01_09030700	1.88e-53
				<i>Plasmodium praefalciparum</i>	-	-	PPRF01_1125300	1.69e-62
				<i>Plasmodium reichenowi</i>	-	CDO65048.1	PRCDC_1122900	1.98e-62
				<i>Plasmodium relictum</i>	-	XP_028533118.1	PRELSG_0921300	1.10e-61
				<i>Plasmodium vinckei</i>	-	CAD2104152.1	PVVCY_0902250	2.08e-63

Filo	Classe	Ordem	Família	Espécie	ToxoDB ID	NCBI ID	PlasmODB	E-value (E1 DH)			
Apicomplexa	Aconoidasida	Haemosporidia	Plasmodiidae	<i>Plasmodium vivax</i>	-	XP_001615360.1	PVP01_0925100	1.49e-61			
				<i>Plasmodium yoelii</i>	-	EAA18662.1	PY17X_0925800	1.86e-63			
		Nephromycida	Haemoproteidae		<i>Haemoproteus tartakovskyi</i>	-	-	-	Htart_000149700	4.34e-56	
	<i>Cardiosporidium cionae</i>				-	-	-	-	4.97e-95		
	<i>Cyclospora cayentanensis</i>				CHN_HEN01	cyc_03035	OE79285.1	-	-	8.82e-92	
	Eimeriidae		Coccidia		<i>Eimeria acervulina</i>		EAH_00017590	XP_013253058.1	-	3.46e-93	
					<i>Eimeria brunetti</i>		EBH_0016870	CDJ47615.1	-	1.35e-92	
					<i>Eimeria faecaliformis</i>		Efab_PLUS_6743.g611	-	-	-	4.07e-86
					<i>Eimeria maxima</i>		EMWEY_00039180	XP_013337887.1	-	-	2.10e-94
					<i>Eimeria mitis</i>		EMH_0009020	XP_013350004.1	-	-	1.06e-92
					<i>Eimeria necatrix</i>		ENH_00080770	XP_013438716.1	-	-	4.40e-95
					<i>Eimeria tenella</i>		ETH2_0303000	XP_013231024.1	-	-	8.80e-94
					<i>Besnoitia besnoiti</i>		BESB_006800	XP_029222348.1	-	-	1.19e-77
					<i>Cystoisospora suis</i>		CSUI_005036	XP_067922809.1	-	-	3.25e-80
					<i>Hammondia hammondi</i>		HHA_245670	-	-	-	1.25e-79
					<i>Neospora caninum</i>	Liverpool	Ncaninum_LIV_000306200	CEL70612.1	-	-	5.19e-79
					<i>Sarcocystis neurona</i>		SN3_01900070	-	-	-	7.28e-71
					<i>Toxoplasma gondii</i>	ME49	TGME49_245670	XP_002366997.1	-	-	1.12e-80

Filo	Classe	Ordem	Familia	Espécie	ToxoDB ID	NCBI ID	PlasmODB	E-value (E1 DH)
Ciliophora	Spirotrichea	Sporadotrichida	Oxytrichidae	<i>Stylonychia lemnae</i>	-	CDW91415.1	-	7.86e-126
			Halteriidae	<i>Halteria grandinella</i>	-	TNV81002.1	-	2.77e-128
		Euplotida	Euplotidae	<i>Moneuploetes crassus</i>	-	CAI2371880.1	-	9.14e-121
	Heterotricha	Heterotrichida	Blepharismidae	<i>Blepharisma stoltei</i>	-	CAG9315188.1	-	5.12e-115
			Stentoridae	<i>Stentor coeruleus</i>	-	OMJ65756.1	-	2.47e-112
			Paramecitidae	<i>Paramecium octaurelia</i>	-	CAD8152618.1	-	8.38e-113
	Oligohymenophorea	Phliasterida	Pseudocohnilembidae	<i>Pseudocohnilembus persalinus</i>	-	KRX05111.1	-	4.63e-121
			Ichthyophthiriidae	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	-	XP_004034736.1	-	1.90e-113
		Hymenostomatida	Tetrahymenidae	<i>Tetrahymena thermophila</i>	-	XP_001017076.2	-	7.64e-118
			Vitrellaceae	<i>Vitrella brassicaformis</i>	-	CEM06775.1	-	3.73e-83
	Dinoflagellata	ColpodeLLida	Chromeraceae	Chromera velia	-	JAHBMJ010000538.1	-	1.65e-96
				Amphidiniaceae	<i>Amphidinium carterae</i>	-	ND/A	-
		Syndiniales	Amoebophryaceae	<i>Amoebophrya sp. A120</i>	-	ND/A	-	ND/A
<i>Amoebophrya sp. A25</i>				-	ND/A	-	ND/A	
Dinophyceae		Suessiales	Symbiodiniaceae	<i>Cladocopium goreau</i>	-	ND/A	-	ND/A
				<i>Durusdinium trenchii</i>	-	CAK9002984.1	-	8.72e-115
				<i>Effrenium voratum</i>	-	ND/A	-	ND/A
				<i>Polarella glacialis</i>	-	ND/A	-	ND/A
				<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	-	ND/A	-	ND/A
				<i>Symbiodinium natans</i>	-	ND/A	-	ND/A
	<i>Symbiodinium necroappetens</i>			-	ND/A	-	ND/A	
	<i>Symbiodinium pilosum</i>			-	ND/A	-	ND/A	
<i>Symbiodinium sp. KB8</i>	-	CAE7374882.1	-	4.82e-63				

Filo	Classe	Ordem	Familia	Espécie	ToxoDB ID	NCBI ID	PlasmODB	E-value (E1 DH)
Bacillariophyta	Bigyra	Thraustochytrida	Thraustochytriaceae	<i>Hondaea fermentalgiana</i>	-	GBG25968.1	-	6.04e-121
	Bacillariophyceae	Naviculales	Naviculaceae	<i>Fistulifera solaris</i>	-	GAX27614.1 GAX27155.1	-	2.20e-114 2.50e-113
Ochrophyta	Bolidophyceae	Parmales	Tripalmaceae	<i>Tripalma strigata</i>	-	GMH87853.1	-	8.75e-116
	Eustigmatophyceae	Eustigmatales	Monodopsidaceae	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	-	EWM29330.1	-	1.38e-107
	Pelagophyceae	Pelagomonadales	Pelagomonadaceae	<i>Aureococcus anophagefferens</i>	-	XP_009035434.1	-	9.50e-115
	Phaeophyceae	Ectocarpales	Ectocarpaceae	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	-	CBJ28862.1	-	8.77e-98
Oomycota	Xanthophyceae	Tribonematales	Tribonemataceae	<i>Tribonema minus</i>	-	KAG5185495.1	-	4.59e-117
		Saprolegniales	Saprolegniaceae	<i>Aphanomyces stellatus</i>	-	KAF0687791.1	-	2.04e-120
Endomyxa	Phycomyxa	Plasmodiophorida	Plasmodiophoridae	<i>Plasmodiophora brassicae</i>	-	CEO99520.1	-	3.90e-124
	Ascetosporea	Paramyxida	Martelliidae	<i>Martelia pararefringens</i>	-	MEN2498920.1	-	7.12e-94
Cercozoa	Imbricatea	Euglyphida	Paulinellidae	<i>Paulinella micropora</i>	-	YP_009530324.1	-	3.80e-94
				<i>Cercozoa sp. M6MM</i>	-	MES1909340.1	-	9.76e-123
	Magnoliopsida	Brassicales	Brassicaceae	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	NP_176198.1 NP_173828.1 NP_171617.1	-	3.43e-157 2.42e-149 4.33e-99
Chlorophyta	Chloropicophyceae	Chloropicales	Chloropicaceae	<i>Chloropicon roscoffensis</i>	-	WZN66417.1	-	1.03e-132
				<i>Raphidocelis subcapitata</i>	-	WZN63797.1	-	3.85e-90
	Chlorophyceae	Sphaeropleales	Selenastraceae		-	GBF89270.1	-	7.11e-123
				<i>Micromonas pusilla</i>	-	GBF88307.1	-	6.44e-90
					-	XP_003062902.1	-	6.36e-130
					-	XP_003063958.1	-	8.95e-42
				<i>Pedinophyceae sp. YPF-701</i>	-	CAG9465257.1	-	3.96e-105
				<i>Cymbomonas tetramitiformis</i>	-	CAG9464940.1	-	3.45e-89
					-	KAK3273844.1	-	2.27e-124
				<i>Bryopsis sp. KO-2023</i>	-	GMH36432.1	-	3.61e-129
				-	GMH38650.1	-	3.92e-88	

Filo	Classe	Ordem	Família	Espécie	ToxoDB ID	NCBI ID	PlasmODB	E-value (E1 DH)	
Chlorophyta	Trebouxiophyceae			<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	-	XP_005650857.1	-	1.70E-126	
					-	XP_005647733.1	-	1.17E-121	
					-	XP_005643628.1	-	1.35E-81	
Rhodophyta	Bangiophyceae	Cyanidiales	Cyanidiaceae	<i>Cyanidiococcus yangmingshanensis</i>	-	KAF6005225.1	-	3.06E-136	
					-	WDB00323.1	-	7.99E-92	
				<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	-	XP_005539268.1	-	2.64E-139	
					-	NP_849059.1	-	1.69E-92	
					-	GJQ14317.1	-	7.19E-131	
			Galdieriales	Galdieriaceae	<i>Galdieria partita</i>	-	BDE17533.1	-	7.52E-88
					<i>Galdieria sulphuraria</i>	-	XP_005704309.1	-	3.84E-129
						-	YP_009051098.1	-	7.28E-88
					<i>Porphyridium purpureum</i>	-	KA848491732.1	-	1.05E-123
						-	YP_008965799.1	-	2.59E-95
Actinomycetota	Stylonematomphyceteae	Porphyridiales	Porphyridiaceae	<i>Rhodosorus marinus</i>	-	KAJ8903823.1	-	1.94E-126	
Bacteroidota	Actinomycetes	Stylonematales	Stylonemataceae	<i>Nocardioides marinus</i>	-	MBY6134362.1	-	7.74E-114	
Campylobacterota	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Crocinitomiacaeae	<i>Crocinitomiacaeae bacterium</i>	-	MCB9261616.1	-	5.05E-108	
	Epsilonproteobacteria	Nautiliales	Nautiliaceae	<i>Caminibacter pacificus</i>	-	WP_123351928.1	-	1.46E-82	
Cyanobacteriota	Cyanophyceae	Leptolyngbyales	Trichocoleaceae	<i>Pantanalinema sp.</i>	-	HEY9900493.1	-	1.06E-96	
		Oscillatoriales	Microcoleaceae	<i>Planktothrix sp.</i>	-	WP_079681339.1	-	2.21E-94	
		Leptolyngbyales	Leptolyngbyaceae	<i>Stenomitos sp.</i>	-	HEY9825592.1	-	9.07E-97	
		Coleofasciculales	Coleofasciculaceae	<i>Coleofasciculaceae cyanobacterium</i>	-	HEY9634914.1	-	9.28E-102	
		Rickettsiales		<i>Rickettsiales bacterium</i>	-	MDB2550764.1	-	3.63E-120	
Pseudomonadota	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Blastomonas sp. CACIA14H2</i>	-	ESZ88546.1	-	1.67E-121	
		Rhodospirillales		<i>Rhodospirillales bacterium</i>	-	MFA6020542.1	-	1.56E-120	
				<i>Kiloniellales bacterium</i>	-	HEX9790621.1	-	1.41E-120	

Quadro 3: Dados utilizados para as análises filogenéticas da quinase BCKDK em diferentes grupos de organismos

Filo	Classe	Ordem	Família	Espécie	ToxoDB ID	NCBI ID	Plasmo DB	BCKDK Adom3 (E-value)	HATPase (E-value)
Apicomplexa	Aconoidasida	Piroplasmida	Babesiidae	<i>Babesia</i> spp.	-	ND/A	ND/A	ND/A	ND/A
			Theileriidae	<i>Theileria</i> spp.	-	ND/A	ND/A	ND/A	ND/A
		Haemosporidia	Plasmodiidae	<i>Hepatozys</i> sp.	-	ND/A	ND/A	ND/A	ND/A
				<i>Plasmodium</i> spp.	-	ND/A	ND/A	ND/A	ND/A
			Haemoproteidae	<i>Haemoproteus tartakovskyi</i>	-	ND/A	ND/A	ND/A	ND/A
		Coccidia	Nephromycida	<i>Cardiosporidium cionae</i>	-	ND/A	ND/A	ND/A	ND/A
				<i>Cryptosporidium</i> spp. (11)	-	ND/A	ND/A	ND/A	
				<i>Cyclospora cayentanensis</i> CHN_HEN01	cyc_03619	OEH80181.1	-	4.46E-30	5.94E-13
				<i>Cyclospora cayentanensis</i> NF1_C8	LOC34620284	XP_026194478.1	-	7.82E-35	1.01E-12
				<i>Eimeria acervulina</i>	EAH_00057240	XP_013252881.1	-	1.50e-03	ND/A
	<i>Eimeria brunetti</i>			ND/A	ND/A	-	ND/A	ND/A	
	<i>Eimeria falciformis</i>			EfaB_MINUS_2526.g312	-	-	1.53E-32	1.79E-12	
	Conoidasida	Coccidia	Eimeriidae	<i>Eimeria tenella</i>	ETH2_0409800	-	-	1.65E-29	4.33E-13
				<i>Besnoitia besnoiti</i>	BESB_044740	XP_029220291.1	-	1.19E-38	1.79E-12
				<i>Cystoisospora suis</i>	CSUI_005845	PHJ20322.1	-	2.56E-39	7.06E-12
				<i>Hammondia hammondi</i>	HHA_318560	-	-	7.34E-40	3.59E-12
				<i>Neospora caninum</i>	NCLIV_010980	XP_003880663.1	-	4.28E-40	1.26E-12
<i>Sarcocystis neurona</i>				SN3_01700245	-	-	4.11E-31	6.42E-13	
<i>Toxoplasma gondii</i> ME49				TGME49_318560	XP_018638005.1	-	2.39E-40	1.66E-12	

Filo	Classe	Ordem	Familia	Espécie	ToxoDB ID	NCBI ID	PlasmoDB	BCKDHK Adom3 (E-value)	HATPase (E-value)		
Ciliophora	Oligohymenophorea	Peniculida	Parameciidae	<i>Paramecium octaurelia</i>	-	ND/A	-	ND/A	ND/A		
		Philasterida	Pseudocohnilembidae	<i>Pseudocohnilembus persalinus</i>	-	ND/A	-	ND/A	ND/A		
		Hymenostomatida	Tetrahymenidae	<i>Ichthyophthirius multitriliis</i> <i>Tetrahymena thermophila</i>	-	ND/A	-	ND/A	ND/A		
Colpodehlida		Vitrellaceae	Vitrellaceae	<i>Vitrella brassicaformis</i>	-	CEM11776.1	-	2.78E-36	7.08E-12		
					-	CEL93607.1	-	3.24E-42	1.20E-10		
					-	CEM08869.1	-	6.32E-39	2.78E-03		
		Chromeraceae	Chromeraceae	<i>Chromera velia</i>	-	JAHBMJ010002833.1	-	7.38E-31	2.70E-11		
					-	JAHBMJ010001062.1	-	5.54E-29	4.69E-13		
		Syndiniales	Amoebophryaceae	Amoebophryaceae	<i>Amoebophrya</i> sp. A120	-	ND/A	-	ND/A	ND/A	
						-	CAL1173303.1	-	6.17E-36	1.71E-09	
						-	CAL1145961.1	-	1.07E-32	5.32E-14	
		Dinophyceae	Suessiales	Symbiodiniaceae	Symbiodiniaceae	<i>Effrenium voratum</i> <i>Polarella glacialis</i> <i>Symbiodinium microadriaticum</i>	-	CAJ1342572.1	-	2.57E-33	6.48E-10
							-	CAE8629545.1	-	1.98E-20	2.45E-10
-	OLP86488.1						-	4.92E-34	1.10E-09		
-	OLP85832.1						-	5.54E-29	4.69E-13		
-	KAF4660097.1						-	5.38E-13	2.10E-10		
Perkinsozoa	Perkinsea	Perkinsida	Perkinsidae	<i>Perkinsus olseni</i> <i>Perkinsus marinus</i>	-	KAF4692696.1	-	1.55E-07	1.71E-10		
					-	KAF4728824.1	-	-	1.06E-07		
					-	XP_002787619.1	-	4.45E-10	5.86E-10		
					-	XP_002777142.1	-	2.67E-05	1.11E-07		
					-	XP_002775601.1	-	6.33E-04	-		

Filo	Classe	Ordem	Familia	Espécie	ToxoDB ID	NCBI ID	PlasmODB	BCKDHK Adom3 (E-value)	HATPase (E-value)	
Bacillario phyta	Bigyra	Thraustochytrida	Thraustochytriaceae	<i>Hondaea fermentalgiana</i>	-	ND/A		ND/A	ND/A	
		Naviculales	Naviculaceae	<i>Fistulifera solaris</i>	-	ND/A		ND/A	ND/A	
Ochrophyta	Bolidophyceae	Parmales	Tripalmaceae	<i>Tripalma strigata</i>	-	ND/A		ND/A	ND/A	
		Eustigmatales	Monodopsidaceae	<i>Nannochloropsis salina</i>	-	TFJ81964.1	-	1.11E-04	1.20E-10	
	Pelagophyceae	Pelagomonadales	-	<i>Chrysophaeum taylorii</i>	-	ND/A		ND/A	ND/A	
		Tribonematales	Tribonemataceae	<i>Tribonema minus</i>	-	ND/A		ND/A	ND/A	
	Magnoliopsida	Brassicales	Brassicaceae	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	ND/A		ND/A	ND/A	
		Chloropicales	Chloropicaceae	<i>Chloropicon roscoffensis</i>	-	WZN61764.1		3.89E-51	3.45E-07	
	Chlorophyceae	Sphaeropleales	Selenastraceae	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	-	GBF98531.1		5.91E-22	2.67E-06	
		Mamiellales	Mamiellaceae	<i>Micromonas pusilla</i>	-	ND/A		ND/A	ND/A	
	Chlorophyta	Pedinophyceae			<i>Pedinophyceae sp. YPF-701</i>	-	ND/A		ND/A	ND/A
			Pyramimonadales	Pyramimonadaceae	<i>Cymbomonas tetramitiformis</i>	-	KAK3268610.1		1.52E-58	1.26E-03
Ulvoiphyceae		Bryopsidales	Bryopsidaceae	<i>Bryopsis sp. KO-2023</i>	-	ND/A		ND/A	ND/A	
			Ostreobiaceae	<i>Ostreobium quekettii</i>	-	ND/A		ND/A	ND/A	
Trebouxiophyceae				<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	-	XP_005648590.1	-	1.56E-59	4.02E-11	
				<i>Cyanidiococcus yangmingshanensis</i>	-	ND/A		ND/A	ND/A	
Rhodophyta	Bangiophyceae	Cyanidiales	Cyanidiaceae	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	-	ND/A		ND/A	ND/A	
				<i>Galdieria partita</i>	-	GJQ10499.1	-	1.64E-49	8.37E-14	
			Galdieriales	Galdieriaceae	<i>Galdieria sulphuraria</i>	-	XP_005706894.1	-	8.55E-50	5.94E-12

Quadro 4: Dados utilizados para as análises filogenéticas da quinase PDK em diferentes grupos de organismos

Filo	Classe	Ordem	Família	Espécie	ToxoDB ID	NCBI ID	Plasmo DB	BCKDHK Adom3 (E-value)	HATPase (E-value)
Apicomplexa	Conoidasida	Coccidia	Eimeriidae	<i>Cyclospora cayentanensis</i> CHN_HENO1	cyc_04842	OE78367.1	-	5.15E-14	-
				<i>Eimeria acervulina</i>	EAH_00057250	XP_013252882.1	-	-	8.36E-04
				<i>Eimeria brunetti</i>	EBH_0003460	CDJ52316.1	-	-	-
				<i>Eimeria fafciformis</i>	EBH_0003450	CDJ52315.1	-	-	-
				<i>Eimeria maxima</i>	EfaB_PLUS_58361.g286	-	-	5.51E-23	4.32E-03
				<i>Eimeria necatrix</i>	-	XP_013332812.1	-	-	3.83E-04
				<i>Eimeria tenella</i>	ENH_00061580	XP_013437474.1	-	3.57E-07	-
				<i>Besnoitia besnoiti</i>	ENH_00061590	XP_013437475.1	-	-	8.34E-03
				<i>Cystoisospora suis</i>	ETH_00010060	XP_013234273.1	-	5.38E-07	-
				<i>Hammondia hammondi</i>	ETH_00014950	XP_013228871.1	-	-	7.14E-13
		Sarcocystidae	<i>Neospora caninum Liverpool</i>	BESB_040230	XP_029221574.1	-	1.51E-21	-	
			<i>Sarcocystis neurona</i>	CSUI_008436	PHJ17738.1	-	2.18E-23	-	
			<i>Toxoplasma gondii</i> ME49	HHA_219682	-	-	1.28E-22	-	
				NCLIV_060930	XP_003885695.1	-	1.33E-20	-	
				SN3_02600105	-	-	2.35E-21	-	
				TGME49_219682	XP_002370720.2	-	1.13E-22	-	
				TGME49_227050	XP_018636057.1	-	-	8.05E-10	
				TGME49_293260	XP_002370128.2	-	-	3.12E-04	

Filo	Classe	Ordem	Familia	Espécie	ToxoDB ID	NCBI ID	PlasmODB	BCKDHK Adom3 (E-value)	HATPase (E-value)			
	ColpodeLLida		Vitrellaceae	<i>Vitrella brassicaformis</i>	-	CEM00650.1	-	7.63E-30	-			
					-	CEM26965.1	-	6.96E-10	2.35E-15			
					-	CEL91698.1	-	6.96E-10	2.35E-15			
					-	CEM37805.1	-	-	-			
					-	JAHBMJ010001065.1	-	2.76E-13	3.64E-08			
			Syndiniales			Amoebophyceae	<i>Amoebophya</i> sp. A120	-	CAD7936620.1	-	2.55E-20	-
								-	CAD7953739.1	-	2.25E-10	5.17E-03
								-	CAL1170747.1	-	2.95E-24	1.44E-06
								-	CAL1158120.1	-	3.98E-19	1.24E-09
								-	CAJ1366419.1	-	1.46E-19	2.25E-09
			Dinophyceae		Suessiales	Symbiodiniaceae	<i>Cladocopium goreauii</i>	-	CAK0888422.1	-	2.63E-24	2.41E-08
								-	CAE8604686.1	-	6.96E-19	-
								-	OLP85089.1	-	3.62E-27	1.09E-07
								-	OLQ03606.1	-	1.51E-18	6.40E-09
								-	CAK9022889.1	-	7.28E-26	3.65E-07
				<i>Polarella glacialis</i>	-	CAK9068131.1	-	3.87E-22	4.43E-10			
					-	CAK9022961.1	-	1.12E-25	5.89E-04			
					-	CAK9053619.1	-	2.71E-21	6.13E-07			
					-		-					
					-		-					
				<i>Durusdinium trenchii</i>	-		-					
					-		-					

Filo	Classe	Ordem	Familia	Espécie	ToxoDB ID	NCBI ID	PlasmODB	BCKDHK Adom3 (E-value)	HATPase (E-value)
Bacillariophyta	Bigyra	Thraustochytrida	Thraustochytriaceae	<i>Hondaea fermentalgiana</i>	-	GBG31421.1	-	5.88E-40	2.46E-12
					-	GBG34078.1	-	5.43E-21	1.44E-09
					-	GBG29208.1	-	3.67E-43	3.05E-06
Bacillariophyta	Bacillariophyceae	Naviculales	Naviculaceae	<i>Fistulifera solaris</i>	-	GAX27898.1	-	9.05E-44	1.91E-13
					-	GAX18311.1	-	5.62E-32	1.16E-14
					-	GAX18335.1	-	2.79E-38	4.27E-16
Ochrophyta	Bolidophyceae	Parmales	Triparmaceae	<i>Triparma strigata</i>	-	GMH78382.1	-	1.35E-19	3.57E-09
					-	GMH78058.1	-	2.94E-48	1.24E-13
					-	TFJ80277.1	-	2.18E-44	1.84E-15
	Eustigmatophyceae	Eustigmatales	Monodopsidaceae	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	-	TFJ81478.1	-	1.39E-34	7.99E-06
					-	TFJ83833.1	-	9.97E-31	4.62E-10
					-	KAJ8600356.1	-	3.77E-44	-
	Ochrophyta	Pelagophyceae	Pelagomonadales	<i>Chrysothaeum taylorii</i>	-	KAJ8612705.1	-	5.23E-12	-
					-	CBJ48308.1	-	7.19E-50	2.66E-11
					-	CBN79619.1	-	1.86E-31	3.79E-08
					-	KAG5183205.1	-	1.36E-47	4.97E-10
Oomycota	Xanthophyceae	Tribonematales	Tribonemataceae	<i>Tribonema minus</i>	-	KAG5187839.1	-	1.86E-34	1.16E-08
					-	KAG9410202.1	-	3.69E-67	9.80E-15
					-	KAG9401993.1	-	1.02E-27	4.28E-08
Endomyxa	Phycomyxea	Saprolegniales	Saprolegniaceae	<i>Aphanomyces stellatus</i>	-	SPQ98325.1	-	1.51E-48	4.73E-09
					-	ETO16978.1	-	2.20E-27	8.47E-11
Retaria	Foraminifera	Monothalamids	Reticulomyxidae	<i>Reticulomyxa filosa</i>	-	ETO25922.1	-	5.27E-13	2.46E-11
					-	ETO11642.1	-	9.78E-24	1.54E-07

Filo	Classe	Ordem	Familia	Espécie	ToxoDB ID	NCBI ID	Plasmo DB	BCKDHK Adom3 (E-value)	HATPase (E-value)
Chlorophyta	Magnoliopsida	Brassicales	Brassicaceae	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	NP_187300.3	-	4.66E-68	1.61E-16
	Chlorophyceae	Chloropicales	Chloropicaceae	<i>Chloropicon roscoffensis</i>	-	WZN67151.1	-	7.32E-67	1.25E-16
	Chlorophyceae	Sphaeropleales	Selenastraceae	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	-	GBF94246.1	-	2.10E-70	1.36E-15
	Mamiellophyceae	Mamiellales	Mamiellaceae	<i>Micromonas pusilla</i>	-	XP_003055586.1	-	4.28E-67	1.49E-13
	Pedinophyceae			<i>Pedinophyceae sp. YPF-701</i>	-	CAG9463186.1	-	1.05E-62	1.69E-15
	Pyramimonadophyceae	Pyramimonadales	Pyramimonadaceae	<i>Cymbomonas tetramitiformis</i>	-	KAK3276200.1	-	7.68E-65	1.48E-15
					-	KAK3246400.1	-	5.71E-26	4.89E-14
	Ulvoephyceae	Bryopsidales	Bryopsidaceae	<i>Ostreobium quekettii</i>	-	CAD7705296.1	-	4.30E-70	2.63E-16
					-	CAD7704106.1	-	1.02E-69	3.54E-13
	Trebouxioephyceae			<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	-	BDA45758.1	-	1.57E-69	4.69E-15
				<i>Cyanidiococcus yangmingshanensis</i>	-	KAK4532845.1	-	2.50E-57	1.30E-13
				<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	-	KAF6001778.1	-	1.24E-57	-
	Rhodophyta	Bangiophyceae	Cyanidiales	Cyanidiaceae		-	XP_0055338494.1	-	1.91E-52
				<i>Galdieria partita</i>	-	GJQ10174.1	-	9.98E-64	6.37E-13
				<i>Galdieria sulphuraria</i>	-	XP_005707861.1	-	1.04E-62	6.76E-13
				<i>Porphyridium purpureum</i>	-	KAA8494057.1	-	7.16E-51	1.45E-10
					-	KAA8492141.1	-	5.49E-35	1.73E-10
Stylonematoephyceae		Stylonematales	Stylonemataceae	<i>Rhodosorus marinus</i>	-	KAJ8906792.1	-	8.60E-54	8.46E-10
				<i>Terriglobia bacterium</i>	-	HET6962535.1	-	2.26E-68	1.73E-16
Acidimicrobia				<i>Acidimicrobia bacterium</i>	-	MBM3801554.1	-	8.27E-69	1.00E-16
Bacteroidota		Cytophagales	Flammeovirgaceae	<i>Flammeovirgaceae bacterium</i>	-	MAE83972.1	-	1.81E-34	8.91E-11
Planctomycetota				<i>Planctomycetota bacterium</i>	-	HVR72922.1	-	4.84E-68	1.09E-12

ANEXO III – Sequências consenso para a região de fosforilação da subunidade E1-alfa dos complexos BCKDH e PDH para diferentes grupos de organismos.

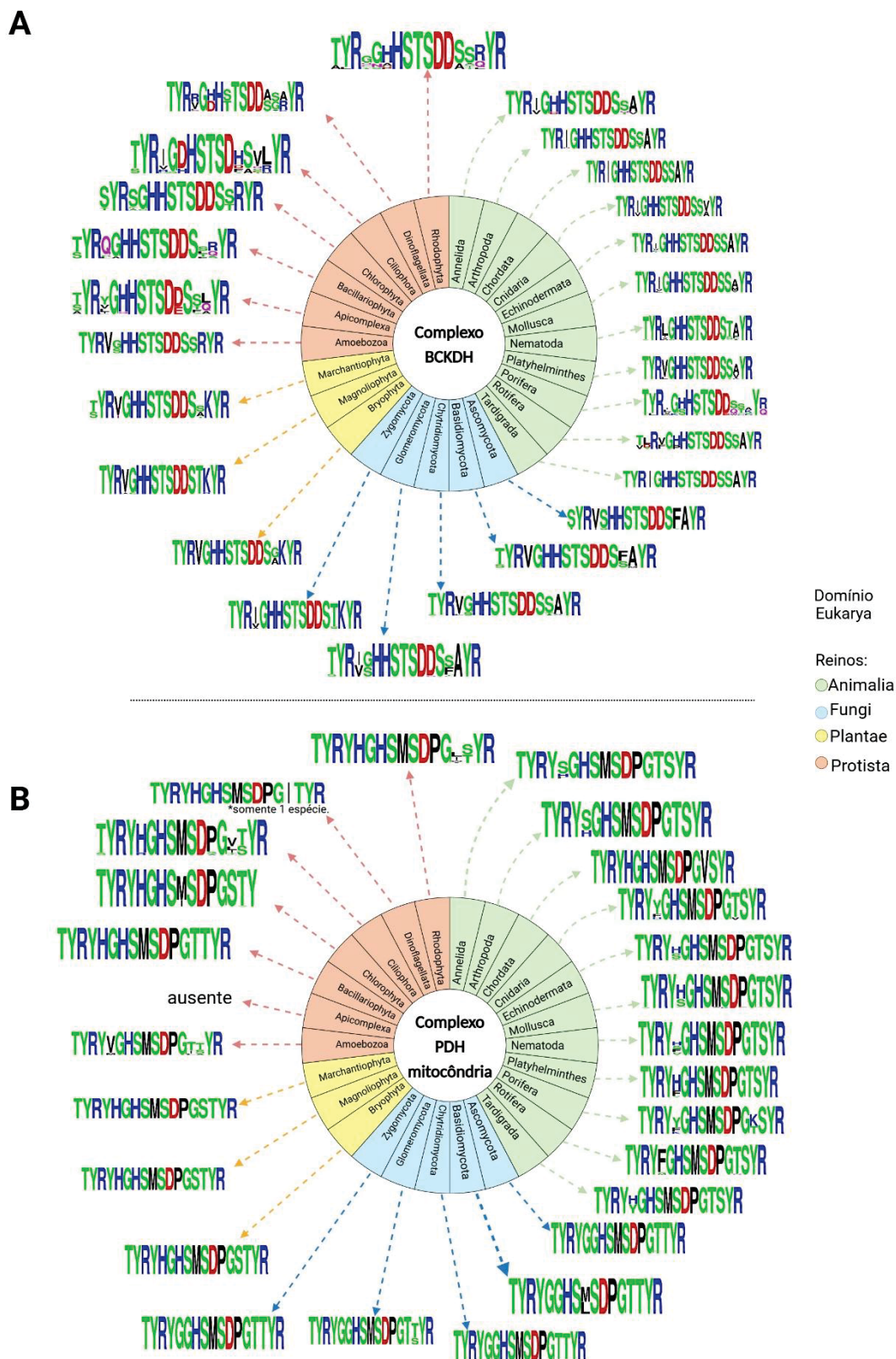


Figura 60. Sequências consenso para a região que contém o sítio de serina sujeito à fosforilação na subunidade E1-alfa dos complexos PDH e BCKDH de localização mitocondrial. Estão representados os organismos dos principais filos que compõem os reinos do Domínio Eukarya (eucariotos).

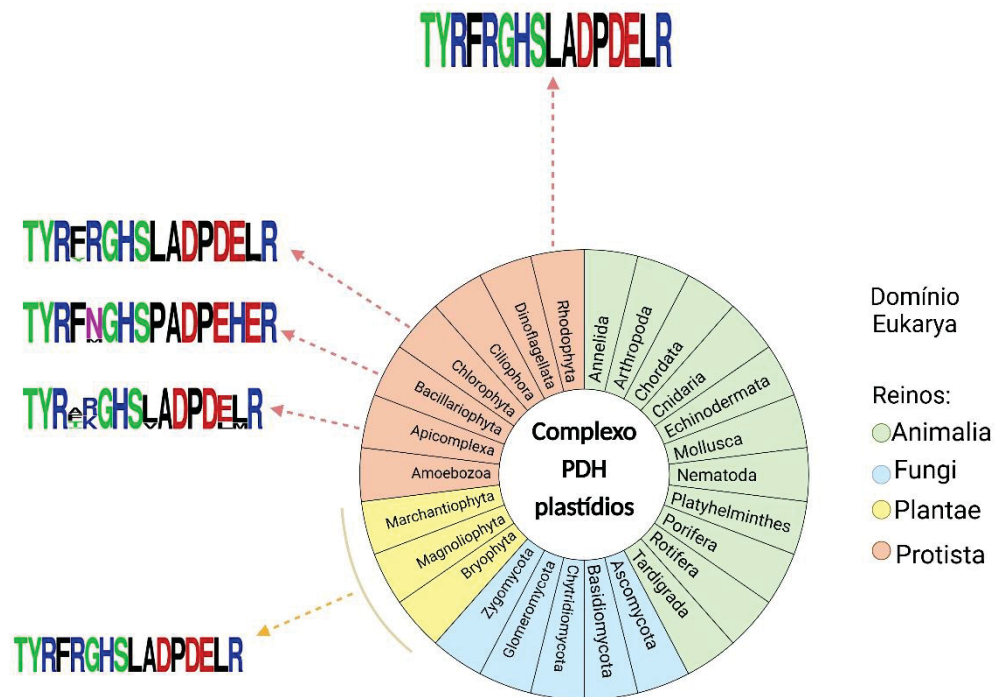


Figura 61. Sequências consenso para a região que contém o sítio de serina conservado na subunidade E1-alfa dos complexos PDH de plastídios. Estão representados os organismos dos principais filos que compõem os reinos do Domínio Eukarya (eucariotos).

ANEXO IV – Dados de proteômica relacionado à Imunoprecipitação dos complexos proteicos associados às quinases TgBCKDK e TgPDK em *Toxoplasma gondii*

Quadro 1. Dados das proteínas enriquecidas para as amostras de parasitos contendo etiqueta na proteína BCKDK, em relação a parasitas não etiquetados (controle), com o uso de tampão contendo 150 mM de cloreto de sódio

Protein IDs	Fasta headers	Média peptídeos RH	Média peptídeos BCKDK.HA	REPLICATAS RH	REPLICATAS BCKDK.HA	MÉDIA LFQ RH	MÉDIA LFQ BCKDK.HA	teste t
A0A125YPJ8	BCKDK	0,0	21,3	0	3	0,00E+00	2,80E+09	0,00
A0A125YFV7	Alveolin domain containing intermediate filament IMC1	27,3	25,7	3	3	4,69E+08	7,34E+08	0,00
A0A125YIN2	Alveolin domain containing intermediate filament IMC3	8,7	8,7	3	3	1,59E+08	2,68E+08	0,01
A0A125YY54; S8FZ33	Heat shock protein HSP20	6,0	8,3	3	3	6,50E+07	2,20E+08	0,01
S8GKG7	RRM domain-containing protein	8,0	7,7	3	3	1,08E+08	1,49E+08	0,05
A0A125YKB4	EF hand domain-containing protein	11,3	13,0	3	3	9,74E+07	1,32E+08	0,03
A0A125YNY5;S8EUC5	Ribosomal-ubiquitin protein RPL40	4,0	4,0	3	3	9,41E+07	1,32E+08	0,01
A0A125YQN0	Alveolin domain containing intermediate filament IMC12	9,0	10,0	3	3	7,84E+07	1,24E+08	0,01
A0A125YGQ9	Dense granule protein GRA15	6,0	6,3	3	3	5,98E+07	7,60E+07	0,01
A0A125YR47	Uncharacterized protein	4,3	6,7	3	3	2,97E+07	5,68E+07	0,00
A0A125YNR8	Inner membrane complex protein 18	6,7	7,3	3	3	3,41E+07	5,28E+07	0,02
A0A125YSS0	Endonuclease/exonuclease/ phosphatase family protein	4,3	8,0	3	3	1,67E+07	4,34E+07	0,00
A0A125YGR4	Alveolin domain containing intermediate filament IMC14	11,0	15,3	3	3	2,68E+07	4,27E+07	0,04
A0A125YFI4	PDI family protein	1,3	2,7	0	3	0,00E+00	3,64E+07	0,00
S8GB40	High molecular mass nuclear antigen	13,0	20,7	3	3	1,48E+07	3,41E+07	0,00
S8FBH9	Uncharacterized protein	6,7	8,7	3	3	2,20E+07	2,89E+07	0,04
S8EZT3	Transmembrane protein	8,0	10,0	3	3	2,32E+07	2,72E+07	0,03
A0A125YG72	Alveolin domain containing intermediate filament IMC13	2,3	3,3	2	3	9,66E+06	1,74E+07	0,05
A0A125YIE5	Uncharacterized protein	6,0	12,0	3	3	5,93E+06	1,60E+07	0,03
A0A125YKB1	Hexose transporter 1	2,0	2,7	1	3	9,45E+06	1,27E+07	0,04
S8EZW4	Uncharacterized protein	2,0	5,0	2	3	5,52E+06	1,12E+07	0,02
A0A125YU3	Leucine rich repeat-containing protein	2,0	3,3	3	3	6,23E+06	1,02E+07	0,01
A0A125YJJ9	Componente E2- BCKDH	2,00	2,7	2	3	4,62E+06	6,66E+06	0,11 (*p: 0,03 Kruskal-Wallis)

*Linhas em cinza indicam proteínas mitocondriais

Quadro 2. Dados das proteínas enriquecidas para as amostras de parasitos contendo etiqueta na proteína PDK, em relação a parasitas não etiquetados (controle), com o uso de tampão contendo 150 mM de cloreto de sódio

Protein IDs	Fasta headers	Média peptídeos RH	Média peptídeos PDK	REPLICATAS RH	REPLICATAS PDK	MÉDIA LFQ RH	MÉDIA LFQ PDK:HA	teste T
A0A125YFV7	Alveolin domain containing intermediate filament IMC1	27,3	27,3	3	3	4,69E+08	6,84E+08	0,00
S8F787	Transmembrane protein	29,3	27,3	3	3	5,05E+08	5,77E+08	0,05
S8EUE1	PDK	0,0	15,7	0	3	0,00E+00	4,53E+08	0,00
A0A125YPZ0	Alveolin domain containing intermediate filament IMC4	12,7	12,3	3	3	2,14E+08	3,17E+08	0,02
A0A125YMM3	PDI family protein	8,7	9,3	3	3	1,76E+08	2,30E+08	0,05
A0A125YIN2	Alveolin domain containing intermediate filament IMC3	8,7	9,7	3	3	1,59E+08	2,24E+08	0,05
S8GJM7	Alveolin domain containing intermediate filament IMC7	11,7	12,3	3	3	1,10E+08	2,07E+08	0,02
S8GE72	Transmembrane protein	5,0	6,3	3	3	1,18E+08	1,65E+08	0,05
A0A125YQN0	Alveolin domain containing intermediate filament IMC12	9,0	10,7	3	3	7,84E+07	1,63E+08	0,00
A0A125YLV0	Photosensitized INA-labeled protein PHIL1	7,0	8,3	3	3	1,05E+08	1,50E+08	0,04
S8GKG7	RRM domain-containing protein	8,0	7,7	3	3	1,08E+08	1,45E+08	0,02
A0A125YKB4	EF hand domain-containing protein	11,3	12,7	3	3	9,74E+07	1,28E+08	0,04
A0A125YGY9	Uncharacterized protein	2,0	4,3	2	3	4,94E+07	1,03E+08	0,04
S8EXL5	Transmembrane protein	12,0	12,3	3	3	9,70E+07	1,02E+08	0,04
S8F8Q1	Alveolin domain containing intermediate filament IMC6	8,0	10,0	3	3	4,57E+07	7,66E+07	0,01
S8F1Y1	Microtubule associated protein SPM1	11,0	12,7	3	3	5,34E+07	7,45E+07	0,03
A0A125YR47	Uncharacterized protein	4,3	9,0	3	3	2,97E+07	7,29E+07	0,02
S8G9G0	Rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	31,3	35,3	3	3	5,74E+07	6,97E+07	0,00
A0A125YWC0	Stripes inner membrane complex protein	4,0	5,0	3	3	4,59E+07	6,88E+07	0,01
A0A125YNR8	Inner membrane complex protein 18	6,7	7,0	3	3	3,41E+07	5,03E+07	0,02
A0A125YGR4	Alveolin domain containing intermediate filament IMC14	11,0	16,0	3	3	2,68E+07	4,21E+07	0,01
S8GB40	High molecular mass nuclear antigen	13,0	20,7	3	3	1,48E+07	3,54E+07	0,02
A0A125YSS0	Endonuclease/exonuclease/ phosphatase family protein	4,3	6,0	3	3	1,67E+07	3,12E+07	0,01
S8GEX7	CRAL/TRIO domain protein	5,7	7,0	3	3	2,44E+07	2,78E+07	0,02
S8F2F5	Glideosome-associated protein with multiple-membrane spans GAPM2B	2,3	3,7	3	3	1,83E+07	2,25E+07	0,02
S8F506	Uncharacterized protein	1,3	3,0	0	3	0,00E+00	1,51E+07	0,00
A0A125YIE5	Uncharacterized protein	6,0	9,3	3	3	5,93E+06	1,26E+07	0,02
S8ERD7	Plectin	0,0	3,7	0	3	0,00E+00	9,87E+06	0,00
A0A125YYU3	Leucine rich repeat-containing protein	2,0	3,3	3	3	6,23E+06	8,47E+06	0,01
A0A125YJJ9	Componente E2- BCKDH	2,0	2,0	2	3	4,62E+06	6,52E+06	0,11(*p: 0,03 Kruskal-Wallis)

*Linhas em cinza indicam proteínas mitocondriais

Quadro 3. Dados das proteínas enriquecidas para as amostras de parasitos contendo etiqueta na proteína BCKDK em relação ao controle, com o uso de tampão contendo 300 mM de cloreto de sódio

Protein IDs	Fasta headers	Média peptídeos RH	Média peptídeos BCKDK	REPLICATAS RH	REPLICATAS BCKDK.HA	média LFQ RH	média LFQ BCKDK.HA	teste T
A0A125YJPJ8	BCKDK	4,0	29,7	1	3	8,12E+06	1,42E+16	-
S8GHD8	Dense granule protein GRA12	18,0	21,0	3	3	9,96E+08	1,31E+09	0,00
A0A125YRT0	Microneme protein MIC8	21,3	29,3	3	3	1,48E+08	8,33E+08	0,00
A0A125YME4	Dense granule protein DG32	5,3	10,0	3	3	1,62E+08	6,30E+08	0,00
S8F8Y9	Perforin-like protein PLP1	28,7	31,3	3	3	4,88E+08	5,65E+08	0,01
S8F787	Transmembrane protein	28,0	31,7	3	3	3,94E+08	4,69E+08	0,01
A0A125YI90	Dense granule protein GRA7	9,0	9,3	3	3	2,79E+08	3,14E+08	0,03
S8GJB7	Mitochondrial association factor 1 form a1	12,7	13,7	3	3	2,16E+08	3,10E+08	0,00
A0A125YMU0	Ribosomal protein RPL21	1,0	2,3	0	3	0,00E+00	2,94E+08	0,00
A0A125YUK0	Eukaryotic porin protein	12,0	13,7	3	3	1,92E+08	2,88E+08	0,00
A0A125YSM1; A0A125YLK8	Histone H3	2,0	2,0	3	3	1,43E+08	2,85E+08	0,01
A0A125YY45	Dense granule protein GRA3	5,3	7,3	3	3	1,66E+08	2,75E+08	0,02
A0A125YPI1	Vacuolar ATP synthase subunit d, putative	19,0	23,3	3	3	1,48E+08	2,49E+08	0,00
A0A125YP81	Histone H2A	2,0	3,7	2	3	1,06E+08	2,48E+08	0,01
A0A125YHJ4	Transmembrane protein	5,0	5,7	3	3	8,58E+07	2,46E+08	0,00
A0A125YQ93	V-type proton ATPase subunit a	22,0	31,3	3	3	1,18E+08	2,28E+08	0,00
A0A125YY54;S8FZ33	Heat shock protein HSP20	5,7	10,3	3	3	5,53E+07	2,04E+08	0,00
S8F4H5	Transmembrane protein	27,7	39,7	3	3	1,08E+08	1,96E+08	0,00
S8G6N7	Serine/threonine specific protein phosphatase	6,0	12,3	3	3	1,18E+08	1,76E+08	0,00
A0A125YL18	Uncharacterized protein	7,7	8,3	3	3	1,20E+08	1,51E+08	0,01
A0A125YKL3	Elongation factor 1-alpha	10,0	12,3	3	3	1,09E+08	1,40E+08	0,01
A0A125YUG3	Ribosomal protein RPS2	4,7	8,7	3	3	1,18E+08	1,38E+08	0,03
A0A125YK96	Dense granule protein GRA14	9,7	12,0	3	3	9,01E+07	1,25E+08	0,03
A0A125YZM9	Small ribosomal subunit protein eS1	12,0	15,0	3	3	5,88E+07	1,14E+08	0,00
A0A125YT03	Ribosomal protein RPS16	7,0	7,3	3	3	9,21E+07	1,10E+08	0,03
A0A125YQR6	Ribosomal protein RPS11	8,0	9,0	3	3	8,04E+07	1,10E+08	0,00
A0A125YWK7	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	13,7	22,3	3	3	6,10E+07	9,74E+07	0,00
A0A125YNF9	Ribosomal protein RPS5	6,7	9,3	3	3	5,75E+07	9,72E+07	0,00
A0A125YP09	SAG-related sequence SRS29B	8,7	9,0	3	3	5,79E+07	9,63E+07	0,00
A0A125YJB6	SCP family extracellular subfamily protein	5,7	8,0	3	3	6,54E+07	9,54E+07	0,04
A0A125YQU0	Ribosomal protein RPS18	5,0	7,7	3	3	6,97E+07	9,45E+07	0,00
A0A125YRX2	Ribosomal protein RPS23	3,0	3,3	3	3	4,90E+07	8,54E+07	0,00
A0A125YQL5	Uncharacterized protein	3,3	4,7	3	3	6,58E+07	8,36E+07	0,01
A0A125YIJ3	SAG-related sequence SRS34A	2,0	2,7	3	3	4,78E+07	8,28E+07	0,00
S8EZS1	40S ribosomal protein S3	8,7	9,3	3	3	6,39E+07	8,01E+07	0,04
S8GJ92	Dense granule protein GRA12	3,7	7,7	3	3	5,60E+07	7,89E+07	0,01
A0A125YJY1	Ribosomal protein RPS4	6,0	7,7	3	3	3,60E+07	7,55E+07	0,01
A0A125YII1	60S ribosomal protein L13	6,3	9,7	3	3	5,77E+07	7,52E+07	0,02
A0A125YH73	Calcium binding protein, putative	8,3	8,7	3	3	6,96E+07	7,52E+07	0,05
A0A125YH22	Ribosomal protein RPS15	4,0	3,7	3	3	4,91E+07	7,40E+07	0,01
S8ESF3	Ribosomal protein RPL4	12,3	14,3	3	3	5,12E+07	7,08E+07	0,00
S8F116	Transmembrane protein	4,3	5,7	3	3	6,23E+07	7,00E+07	0,02
A0A125YT37	Transmembrane protein	2,7	5,3	3	3	3,70E+07	6,97E+07	0,01
S8EXL5	Transmembrane protein	8,3	12,0	3	3	4,59E+07	6,87E+07	0,01
A0A125YMW1	Ribosomal protein RPL19	3,0	3,3	3	3	3,65E+07	6,51E+07	0,00
A0A125YR48	Uncharacterized protein	5,3	7,7	3	3	4,48E+07	6,00E+07	0,01
A0A125YQ73	Microtubule-binding protein	15,0	19,3	3	3	5,08E+07	5,73E+07	0,02
S8EYU6	Transmembrane protein	2,7	2,3	3	3	3,10E+07	5,49E+07	0,02
S8EWH6	NTPase II (Fragment)	3,7	7,0	3	3	2,64E+07	5,48E+07	0,00
A0A125YRG3	Prohibitin	8,0	9,3	3	3	3,76E+07	5,47E+07	0,00
S8GT06	Transmembrane protein	16,0	19,0	3	3	4,59E+07	5,46E+07	0,05
S8F3H5	Vacuolar proton translocating ATPase subunit, putative	9,0	17,7	3	3	3,41E+07	5,41E+07	0,01
S8GPP3	Ribosomal protein RPL24	3,7	3,3	3	3	3,57E+07	5,41E+07	0,02
A0A125YWW4	Prohibitin	5,0	6,7	3	3	4,71E+07	5,31E+07	0,03
S8F069	Ribosomal protein RPS19	1,3	4,0	1	3	1,44E+07	5,16E+07	0,01
A0A125YLS6	ADP/ATP translocase	8,3	15,0	3	3	2,76E+07	5,14E+07	0,00
S8GNR6	Transmembrane protein	2,7	4,0	3	3	2,66E+07	4,63E+07	0,01
S8EZZ7	Transmembrane protein	19,3	24,7	3	3	3,86E+07	4,57E+07	0,03
A0A125YJX2	Ribosomal protein RPS15A	5,7	8,3	3	3	2,71E+07	4,47E+07	0,00
A0A125YHM6	SAG-related sequence SRS29C	4,0	3,3	3	3	3,15E+07	4,38E+07	0,03
A0A125YYY3	Ribosomal protein RPL31	1,0	3,0	0	3	0,00E+00	4,18E+07	0,00
A0A125YNH2	Heat shock protein HSP60	7,0	13,7	3	3	2,54E+07	4,18E+07	0,00
A0A125YPS2	CRAL-TRIO domain-containing protein	2,3	6,0	2	3	2,50E+07	4,07E+07	0,05
A0A125YSP5	60S ribosomal protein L18a	3,7	7,0	3	3	2,61E+07	4,01E+07	0,00

S8EW90	Transmembrane protein	1,0	2,0	0	3	0,00E+00	3,97E+07	0,00
A0A125YU06	Ribosomal protein RPL13A	7,0	8,3	3	3	2,76E+07	3,94E+07	0,02
A0A125YQZ8	Ribosomal protein RPL17	1,0	3,3	0	3	0,00E+00	3,83E+07	0,00
A0A125YXI9	Heat shock 70 kDa protein	10,0	14,7	3	3	3,01E+07	3,71E+07	0,01
A0A125YL14	Small GTPase Rab2, putative	5,3	9,7	3	3	2,34E+07	3,70E+07	0,02
A0A125YQG4	Calcium-dependent protein kinase CDPK3	11,0	15,3	3	3	2,67E+07	3,56E+07	0,03
A0A125YRM2	Ribosomal protein RPL9	2,0	3,0	3	3	1,87E+07	3,50E+07	0,01
A0A125YRB1	Ribosomal protein RPL18	3,3	5,0	3	3	2,34E+07	3,47E+07	0,01
A0A125YYK6	Uncharacterized protein	6,3	8,7	3	3	2,69E+07	3,35E+07	0,02
S8F371	Large ribosomal subunit protein eL28	1,0	4,3	0	3	0,00E+00	3,32E+07	0,00
S8F4B9	Transmembrane protein	8,7	11,3	3	3	2,49E+07	3,23E+07	0,00
A0A125YVC1	Thioredoxin, putative	7,3	15,7	3	3	1,94E+07	3,17E+07	0,02
A0A125YUF7	Ribosomal protein RPL7	2,3	5,7	3	3	1,77E+07	3,05E+07	0,01
A0A125YN52	40S ribosomal protein S8	5,3	5,3	3	3	2,34E+07	2,98E+07	0,00
A0A125YJN7	Ribosomal protein	4,0	5,3	3	3	2,08E+07	2,96E+07	0,00
A0A125YX57	Ribosomal protein L15	2,3	4,0	3	3	2,11E+07	2,81E+07	0,02
A0A125YTH5	Ribosomal protein RPL11	2,3	2,7	3	3	2,12E+07	2,72E+07	0,02
A0A125YWF6	Ribosomal protein RPS9	2,3	6,3	2	3	1,63E+07	2,65E+07	0,05
S8F5F3; A0A125YPM7	non-specific serine/ threonine protein kinase	3,0	7,7	1	3	1,22E+07	2,40E+07	0,01
S8EZK1	RNA helicase	2,3	7,7	3	3	1,24E+07	2,36E+07	0,01
A0A125YI56	Transmembrane protein	4,0	9,0	3	3	1,80E+07	2,20E+07	0,02
A0A125YTP4	Ribosomal protein RPL32	2,7	4,3	3	3	1,54E+07	2,10E+07	0,02
S8EXB9	Transmembrane protein	5,0	6,7	3	3	1,50E+07	2,00E+07	0,04
A0A125YHR0	Small GTP-binding protein sar1, putative	1,3	3,0	0	3	0,00E+00	1,96E+07	0,00
S8FBZ9	SAG-related sequence SRS25	1,7	2,0	2	3	9,97E+06	1,92E+07	0,02
A0A125YGX9	Ribosomal protein RPL30	2,0	4,0	3	3	1,39E+07	1,92E+07	0,05
A0A125YFT4	Ribosomal protein RPP2	1,0	2,0	0	3	0,00E+00	1,79E+07	0,00
A0A125YW58	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	5,7	10,7	3	3	1,33E+07	1,77E+07	0,02
A0A125YFP1	60S acidic ribosomal protein P0	0,0	2,3	0	3	0,00E+00	1,75E+07	0,00
S8EXW9	Ribosomal protein RPL6	0,0	3,3	0	3	0,00E+00	1,75E+07	0,00
S8EXP2	Rhomboid-like protease	6,7	10,7	3	3	1,44E+07	1,67E+07	0,02
S8G4M3	Transmembrane protein	1,0	2,7	0	3	0,00E+00	1,66E+07	0,00
S8EZC4	Transmembrane protein	1,0	2,7	0	3	0,00E+00	1,61E+07	0,00
A0A125YB4	IMC sub-compartment protein ISP1	1,3	2,0	0	3	0,00E+00	1,54E+07	0,00
A0A125YTH0	poly(ADP-ribose) glycohydrolase	5,7	9,0	3	3	1,05E+07	1,46E+07	0,00
A0A125YSG4	Ribosomal protein RPS13	1,3	2,7	1	3	8,10E+06	1,40E+07	0,02
S8F0M7	Transmembrane protein	4,3	4,7	3	3	1,03E+07	1,39E+07	0,00
S8F5K7	Translation elongation factor 2 family protein, putative	2,0	4,7	1	3	9,19E+06	1,34E+07	0,03
A0A125YYP6	Heat shock protein	3,0	8,3	3	3	7,27E+06	1,30E+07	0,02
A0A125YN63	40S ribosomal protein S12	1,0	2,7	0	3	0,00E+00	1,27E+07	0,00
A0A125YL83	Ubiquitin, putative	1,7	2,3	0	3	0,00E+00	1,22E+07	0,00
S8GP43	Rhoptry kinase family protein ROP33	1,0	3,0	0	3	0,00E+00	1,19E+07	0,00
S8F3E1	Sortilin, putative	1,0	6,7	0	3	0,00E+00	1,16E+07	0,00
S8EZ69	Uncharacterized protein	1,0	4,0	0	3	0,00E+00	1,13E+07	0,00
S8GFM4	Transmembrane protein	0,0	4,3	0	3	0,00E+00	1,11E+07	0,00
S8GNN2	Transmembrane protein	1,5	3,0	0	3	0,00E+00	1,09E+07	0,00
A0A125YXF3	Ribosomal protein RPL34	1,0	2,7	0	3	0,00E+00	1,07E+07	0,00
S8GAC8	Transmembrane protein	2,3	11,7	3	3	1,97E+06	1,06E+07	0,00
A0A125YLA1	Dipeptidyl peptidase 1	1,3	4,7	1	3	5,64E+06	9,89E+06	0,02
A0A125YS60	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha, mitochondrial	0,0	2,3	0	3	0,00E+00	9,58E+06	0,00
A0A125YKB1	Hexose transporter 1	2,0	2,3	3	3	8,29E+06	9,33E+06	0,03
A0A125YJJ8	Transmembrane protein	1,0	3,3	0	3	0,00E+00	8,86E+06	0,00
A0A125YJJ9	Componente E2-BCKDH	2,0	3,3	2	3	5,44E+06	8,82E+06	0,05
A0A125YYH8	Ribosomal protein RPL5	1,0	2,7	0	3	0,00E+00	8,75E+06	0,00
S8GEW7	Polyadenylate-binding protein	0,0	2,7	0	3	0,00E+00	8,41E+06	0,00
S8EN88	Transmembrane protein	1,0	4,7	0	3	0,00E+00	7,75E+06	0,00
S8F388	Transmembrane protein	2,0	5,7	2	3	4,37E+06	7,72E+06	0,05
A0A125YHZ4	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	1,0	4,7	0	3	0,00E+00	7,31E+06	0,00
A0A125YNR4	YagE family protein	1,0	3,3	0	3	0,00E+00	7,16E+06	0,00
A0A125YH30	Calcium-dependent protein kinase CDPK1	1,3	6,7	0	3	0,00E+00	6,98E+06	0,00
S8GIJ1	Citrate synthase	0,0	2,7	0	3	0,00E+00	6,72E+06	0,00
A0A125YJF1	dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase	0,0	2,3	0	3	0,00E+00	6,36E+06	0,00
S8F5T5	Transmembrane protein	0,0	2,3	0	3	0,00E+00	5,93E+06	0,00
A0A125YKK6	Transmembrane protein	1,0	2,7	0	3	0,00E+00	5,84E+06	0,00

*Linhas em cinza indicam proteínas mitocondriais

Quadro 4. Dados das proteínas enriquecidas para as amostras de parasitos contendo etiqueta na proteína PDK, em relação a parasitas não etiquetados (controle), com o uso de tampão contendo 300 mM de cloreto de sódio

Protein IDs	Fasta headers	Média peptídeos RH	Média peptídeos PDK.HA	REPLICATAS RH	REPLICATAS PDK.HA	média LFQ RH	média LFQ PDK.HA	teste t
S8GHD8	Dense granule protein GRA12	18,0	16,7	3	3	9,96E+08	1,21E+09	0,03
B6KV60	Rhoptry neck protein 2	47,0	52,7	3	3	6,56E+08	7,10E+08	0,02
S8EUE1	PDK Protein-serine/threonine kinase	0,0	18,3	0	3	0,00E+00	6,82E+08	0,00
S8F787	Transmembrane protein	28,0	29,3	3	3	3,94E+08	4,81E+08	0,02
A0A125YMU0	Ribosomal protein RPL21	1,0	2,0	0	2	0,00E+00	3,40E+08	-
S8F1T4	Rhoptry neck protein RON8	78,3	93,0	3	3	2,92E+08	3,15E+08	0,03
A0A125YME4	Dense granule protein DG32	5,3	8,3	3	3	1,62E+08	3,10E+08	0,00
A0A125YYZ6	Tubulin beta chain	18,7	22,0	3	3	2,62E+08	3,02E+08	0,02
A0A125YLG8	MSP (Major sperm protein) domain-containing protein	8,3	9,3	3	3	2,41E+08	2,84E+08	0,02
A0A125YRT0	Microneme protein MIC8	21,3	23,0	3	3	1,48E+08	2,77E+08	0,00
S8GJB7	Mitochondrial association factor 1 form a1	12,7	13,7	3	3	2,16E+08	2,70E+08	0,00
A0A125YPI1	Vacuolar ATP synthase subunit d, putative	19,0	22,0	3	3	1,48E+08	1,91E+08	0,01
A0A125YPZ0	Alveolin domain containing intermediate filament IMC4	12,3	13,0	3	3	1,50E+08	1,89E+08	0,04
A0A125YQ93	V-type proton ATPase subunit a	22,0	28,0	3	3	1,18E+08	1,76E+08	0,00
A0A125YUG3	Ribosomal protein RPS2	4,7	8,0	3	3	1,18E+08	1,48E+08	0,01
S8G6N7	Serine/threonine specific protein phosphatase	6,0	10,0	3	3	1,18E+08	1,48E+08	0,04
A0A125YHJ4	Transmembrane protein	5,0	5,7	3	3	8,58E+07	1,46E+08	0,01
A0A125YQR6	Ribosomal protein RPS11	8,0	8,3	3	3	8,04E+07	1,23E+08	0,00
S8GJM7	Alveolin domain containing intermediate filament IMC7	8,7	11,0	3	3	7,00E+07	1,22E+08	0,00
A0A125YT03	Ribosomal protein RPS16	7,0	7,7	3	3	9,21E+07	1,15E+08	0,02
A0A125YQU0	Ribosomal protein RPS18	5,0	6,3	3	3	6,97E+07	1,01E+08	0,01
A0A125YZM9	Small ribosomal subunit protein eS1	12,0	15,3	3	3	5,88E+07	9,34E+07	0,00
S8EZS1	40S ribosomal protein S3	8,7	9,3	3	3	6,39E+07	9,27E+07	0,01
S8G9G0	Rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	31,7	43,3	3	3	7,46E+07	9,26E+07	0,01
A0A125YQN0	Alveolin domain containing intermediate filament IMC12	6,7	10,0	3	3	4,53E+07	8,78E+07	0,02
A0A125YVX5	Uncharacterized protein	3,0	2,3	3	3	3,45E+07	8,73E+07	0,03
A0A125YNF9	Ribosomal protein RPS5	6,7	9,0	3	3	5,75E+07	8,42E+07	0,00
A0A125YWW4	Prohibitin	5,0	8,0	3	3	4,71E+07	8,06E+07	0,00
A0A125YWK7	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	13,7	21,0	3	3	6,10E+07	8,01E+07	0,00
A0A125YHZ2	Ribosomal protein RPS15	4,0	4,3	3	3	4,91E+07	7,86E+07	0,01
A0A125YRX2	Ribosomal protein RPS23	3,0	3,7	3	3	4,90E+07	7,34E+07	0,00
A0A125YII1	60S ribosomal protein L13	6,3	8,0	3	3	5,77E+07	6,99E+07	0,03
A0A125YRG3	Prohibitin	8,0	10,0	3	3	3,76E+07	6,40E+07	0,00
A0A125YYJ1	Ribosomal protein RPS4	6,0	7,7	3	3	3,60E+07	5,47E+07	0,00
A0A125YT37	Transmembrane protein	2,7	4,3	3	3	3,70E+07	5,43E+07	0,04
S8EXL5	Transmembrane protein	8,3	10,0	3	3	4,59E+07	5,34E+07	0,00
A0A125YMW1	Ribosomal protein RPL19	3,0	4,0	3	3	3,65E+07	5,25E+07	0,00
S8GPP3	Ribosomal protein RPL24	3,7	3,7	3	3	3,57E+07	5,20E+07	0,03
A0A125YRY4	Multi-pass transmembrane protein	2,7	4,0	3	3	2,37E+07	4,89E+07	0,01
S8F3H5	Vacuolar proton translocating ATPase subunit, putative	9,0	14,7	3	3	3,41E+07	4,59E+07	0,01
A0A125YWP9	Acyltransferase domain-containing protein	4,3	6,0	3	3	2,91E+07	4,40E+07	0,01
S8GAY1	40S ribosomal protein S25	3,0	6,7	3	3	3,16E+07	4,33E+07	0,00
A0A125YJX2	Ribosomal protein RPS15A	5,7	8,0	3	3	2,71E+07	4,02E+07	0,00
A0A125YNH2	Heat shock protein HSP60	7,0	13,0	3	3	2,54E+07	3,92E+07	0,02
S8F371	Large ribosomal subunit protein eL28	1,0	4,0	0	3	0,00E+00	3,63E+07	0,01
A0A125YNN9	Uncharacterized protein	1,7	3,3	1	3	2,67E+07	3,57E+07	0,04
S8GNR6	Transmembrane protein	2,7	4,0	3	3	2,66E+07	3,43E+07	0,03
A0A125YLS6	ADP/ATP translocase	8,3	10,7	3	3	2,76E+07	3,28E+07	0,03
A0A125YSP5	60S ribosomal protein L18a	3,7	8,0	3	3	2,61E+07	3,26E+07	0,04
A0A125YU06	Ribosomal protein RPL13A	7,0	8,3	3	3	2,76E+07	3,25E+07	0,05
A0A125YK6	Uncharacterized protein	6,3	9,0	3	3	2,69E+07	3,05E+07	0,02
S8EW90	Transmembrane protein	1,0	2,0	0	2	0,00E+00	2,92E+07	-
A0A125YNR8	Inner membrane complex protein 18	6,0	6,3	3	3	1,96E+07	2,83E+07	0,04
S8F069	Ribosomal protein RPS19	1,3	3,3	1	3	1,44E+07	2,81E+07	0,03
A0A125YJN7	Ribosomal protein	4,0	4,7	3	3	2,08E+07	2,65E+07	0,05
S8FBH9	Uncharacterized protein	7,3	9,0	3	3	2,26E+07	2,58E+07	0,01
A0A125YRM2	Ribosomal protein RPL9	2,0	2,0	3	3	1,87E+07	2,54E+07	0,02
S8EZK1	RNA helicase	2,3	8,0	3	3	1,24E+07	2,50E+07	0,03
A0A125YR47	Uncharacterized protein	1,0	3,3	0	3	0,00E+00	2,13E+07	0,02
S8G4M3	Transmembrane protein	1,0	2,3	0	3	0,00E+00	1,44E+07	0,00
A0A125YTH0	poly(ADP-ribose) glycohydrolase	5,7	6,7	3	3	1,05E+07	1,43E+07	0,01
A0A125YHR0	Small GTP-binding protein sar1, putative	1,3	2,0	0	3	0,00E+00	1,40E+07	0,00
A0A125YJ84	Elongation factor Tu	2,0	4,3	2	3	7,71E+06	1,26E+07	0,05
A0A125YYP6	Heat shock protein	3,0	7,3	3	3	7,27E+06	1,22E+07	0,02
A0A125YN63	40S ribosomal protein S12	1,0	3,0	0	3	0,00E+00	1,20E+07	0,00
A0A125YJ9	Componente E2 - BCKDH	2,0	4,7	2	3	5,44E+06	1,18E+07	0,01

S8GFM4	Transmembrane protein	0,0	2,3	0	3	0,00E+00	1,05E+07	0,00
A0A125YXF3	Ribosomal protein RPL34	1,0	2,0	0	3	0,00E+00	1,01E+07	0,00
A0A125YZK4	thioredoxin-dependent peroxiredoxin	0,0	2,0	0	3	0,00E+00	9,53E+06	0,00
A0A125YS60	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha, mitochondrial	0,0	2,7	0	3	0,00E+00	9,37E+06	0,00
S8GNN2	Transmembrane protein	1,5	3,0	0	3	0,00E+00	8,53E+06	0,00
A0A125YH24	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	1,0	3,0	0	3	0,00E+00	8,31E+06	0,00
A0A125YLA1	Dipeptidyl peptidase 1	1,3	3,0	1	3	5,64E+06	7,84E+06	0,04
S8GIJ1	Citrate synthase	0,0	2,0	0	3	0,00E+00	6,13E+06	0,00
S8EZW4	Uncharacterized protein	1,0	3,0	0	3	0,00E+00	6,00E+06	0,00
S8EPT0	P-type ATPase4, putative	1,0	2,0	0	3	0,00E+00	5,79E+06	0,00
A0A125YJF1	dihydrolypoyllysine-residue succinyltransferase	0,0	2,0	0	2	0,00E+00	5,29E+06	-

*Linhas em cinza indicam proteínas mitocondriais