MARCELL CRISPIM

**Caracterização bioquímica e molecular da glutamina sintetase
de *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

MARCELL CRISPIM

**Caracterização bioquímica e molecular da glutamina sintetase
de *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Ariel Mariano Silber

Versão original

São Paulo
2013

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

reprodução não autorizada pelo autor

Crispim, Marcell.

Caracterização bioquímica e molecular da glutamina sintetase de *Trypanosoma cruzi* / Marcell Crispim. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Ariel Mariano Silber.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Potenciais alvos para quimioterapia da Doença de Chagas.

Versão do título para o inglês: Biochemical and molecular characterization of glutamine synthetase of *Trypanosoma cruzi*.

1. *Trypanosoma cruzi* 2. Metabolismo 3. Glutamina
4. Glutamato 5. Amônio 6. Metionina sulfoximina I. Silber, Prof. Dr. Ariel Mariano II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0155/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marcell Crispim.

Título da Dissertação: Caracterização bioquímica e molecular da glutamina sintetase de *Trypanosoma cruzi*.

Orientador(a): Prof. Dr. Ariel Mariano Silber.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 97 nas fls. 107 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Ariel Mariano Silber**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*Caracterização da glutamina sintetase de Trypanosoma cruzi e verificação da sua viabilidade como alvo terapêutico para doença de chagas*" do qual participam o(s) alunos **Marcell Crispim**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **23.08.2011, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 25 de agosto de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Trabalho realizado com auxílios financeiros cedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças Infecciosas (INBEQMeDI) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Aos meus pais, Cida e Nei pelo apoio incondicional durante todo esse percurso e paciência no momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ariel Mariano Silber por me mostrar o caminho da ciência, pela oportunidade de fazer parte desse grupo incrível, pela orientação ao longo do percurso e pela amizade construída. Agradeço imensamente.

À Elizabeth Pral, técnica do laboratório, não só por todo o suporte técnico, mas também pelo exemplo de dedicação e conduta.

À María Julia Barísón, não tenho palavras para descrever a importância que seus ensinamentos tiveram durante meu mestrado. Agradeço pelos direcionamentos nos experimentos, discussão de resultados, pela amizade imensa, mas principalmente por ter acreditado em mim em momentos que nem mesmo eu acreditava, sua dedicação me fazia continuar. Você é incrível!

À Sandra Carla Rocha, primeira pessoa que conversei no laboratório e que plantou a semente de trabalhar com essa via, além disso uma grande amiga de coração.

Lisvane Paes e Brian Suarez, vocês foram as bases que edificaram e direcionaram minha pesquisa e me mostraram que o conhecimento e a ciência devem ser compartilhados. Obrigado por esse fundamento singelo e impressindível.

À minha família, em especial meus pais Nei e Cida, meu irmão Bruno e meus avós Regina, Euclides e Joana...vocês são meu porto seguro sempre.

Aos meus amigos de república Alex e Diego...porque não deve ter sido fácil me aturar em casa! A amizade, o convívio, as pizzas e frango frito (essas só com Alex...o Diego é um cara light) foram de extrema importância.

Aos meus amigos(as) do UDD: Sandrita Carla, Higo Fernando, Raíssa Melo, Carolina Manchola, Letícia Marchese, María Julia, Lud Nakamura, Carlos Gustavo, Rosana Duque, Flávia Damasceno, Flávia Zimbres, Thales Kronenberger, Kamila Anna, Jasmin Lindner, Giovanni Pumba, Yuri Panceta, Soraya Soledad e Frank Sauer, pelo apoio, ajuda, discussões e amizade. Um grupo grande, que apesar das diferenças culturais e de personalidade permanece unido!

Um agradecimento especial aos meus amigos Flávia Damasceno, Raíssa Melo, Thales Kronenberger e novamente María Julia Barísón. Além das boas risadas, fofocas e ajuda em momentos difíceis, laboratoriais ou não, participaram ativamente neste trabalho em experimentos...muitos resultados não seriam obtidos sem a contribuição de suas habilidades!

Aos antigos integrantes do Lab. 24: Inga, Jean e Denise, pela participação no início do Mestrado...agradeço a passagem marcante de vocês pelo laboratório.

À Janine Barcelos Chacon, seu apoio e paciência foram essenciais, obrigado por tudo.

Ao Prof. Dr. Carsten Wrenger, obrigado por toda sua ajuda e conselhos importantes além da dedicação celibatária ao laboratório, sem ela não teríamos o UDD... desejo-te mais sucesso ahn!

À todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Parasitologia (ICB-USP) pelo apoio e convivência.

Às agências financiadoras CNPq, FAPESP e INBEQMeDI e à USP EET pelo suporte financeiro durante o trabalho.

“...Quero vivê-lo em cada vão momento
E em seu louvor hei de espalhar meu canto
E rir meu riso e derramar meu pranto
Ao seu pesar ou seu contentamento...”

Soneto da Fidelidade – Vinícius de Moraes

RESUMO

Crispim M. Caracterização bioquímica e molecular da glutamina sintetase de *Trypanosoma cruzi* [dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Trypanosoma cruzi, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário sanguíneo com um ciclo de vida complexo. Nesse parasita, bem como em outros tripanosomatídeos, está bem estabelecido que os aminoácidos constituem uma importante fonte de energia e carbono. Particularmente em *T. cruzi*, foi descrita a participação dos aminoácidos em vários processos além do metabolismo energético, tais como diferenciação e resistência a diferentes tipos de estresse, e adesão à célula hospedeira. Dentre os aminoácidos destaca-se o glutamato, responsável tanto por fornecimento de energia quanto pela participação no processo de metacicloogênese. Sabe-se também da importância da glutamina na incorporação do nitrogênio no metabolismo de diversos organismos. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi estudar a enzima glutamina sintetase de *T. cruzi* (*TcGS*), sob a hipótese dessa enzima contribuir com a detoxificação de íons amônio, um dos substratos da enzima. A enzima recombinante foi expressa (fusionada a seis histidinas para a purificação, *TcGSr*) e uma vez pura utilizada na determinação dos parâmetros cinéticos (K_m , V_{max} , K_{cat} , pH ótimo) referentes aos três substratos da reação (L-glutamato, ATP e NH_4^+), adicionalmente foram feitos estudos cinéticos com extratos totais de *T. cruzi*, com parâmetros cinéticos semelhantes. Análises da enzima *TcGSr* revelaram que a conformação oligomérica mais estável é a octamérica (320 kDa). Estudos de imunolocalização, utilizando um anticorpo anti-GS comercial, indicaram uma localização citoplasmática, contudo ensaios com parasitas fracionados por digitonina sugerem dupla localização, apontando a necessidade de estudos posteriores mais aprofundados. Também foi observado que *TcGS* é preferencialmente expressa e ativa em amastigotas, forma replicativa intracelular altamente dependente da degradação de aminoácidos. Dois análogos de glutamato relatados como inibidores da GS foram avaliados em ensaios de atividade enzimática e sobre a proliferação do parasita; a 5-hidroxisina (HYL) e a metionina sulfoximina (MS). HYL não apresentou efeito em nenhum dos testes, enquanto que a MS inibiu a enzima de maneira competitiva e com alta afinidade. A MS afeta a proliferação de epimastigotas somente quando submetida a excessos extracelulares de amônio, revelando a participação da *TcGS* na detoxificação dessa molécula. Sabemos que, devido às particularidades do metabolismo das formas amastigotas, estas estariam em um ambiente rico em amônia e *TcGS* seria mais significativa nesse contexto. Assim, o tratamento com MS ao longo do ciclo intracelular reduziu a eclosão de formas tripomastigotas de células CHO-K₁ o que ressalta a importância da enzima GS no metabolismo de nitrogênio e no ciclo de vida de *T. cruzi*.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Metabolismo. Glutamina. Glutamato. Amônio. Metionina sulfoximina.

ABSTRACT

Crispim M. Biochemical and molecular characterization of glutamine synthetase of *Trypanosoma cruzi* [Masters thesis (Host-Pathogen Relationship Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Trypanosoma cruzi, the etiological agent of the Chagas Disease, has a complex life cycle. In this parasite and in other trypanosomatids, the amino acids metabolism is important for energy and carbon supply. Moreover, the amino acid pathways can participate in the differentiation process, resistance to different stress conditions and adhesion to the host cells. Glutamate and glutamine are important amino acids for *T. cruzi*. Glutamate is responsible to the energy supply and for metaciclogenesis, while glutamine is a substrate for pyrimidines biosynthesis. Even more, this amino acid participates in the cellular nitrogen administration in several organisms. In this context the objective of the present work was to study the glutamine synthetase from *T. cruzi* (*TcGS*), under the hypothesis that this pathway contributes to the ammonium detoxification. The recombinant enzyme was expressed (fused to a C-terminal 6-His tag, *TcGSr*), and the purified enzyme was used for kinetic characterization (establishment of K_m , V_{max} , K_{cat} , optimum pH and ion dependence) with the three enzyme substrates (L-glutamate, ATP e NH_4^+). Furthermore, structural analyses revealed that the octameric form (320 kDa) is the most stable conformation. Immunolocalization using a commercial anti-GS antibody, showed a cytoplasmatic localization, nevertheless, enzymatic assays with fractionated epimastigotes, suggested a double localization. Additional studies are needed to confirm this issue. In addition, it was shown that the *TcGS* is rather expressed and active in amastigotes, the intracellular and replicative form which is highly-dependent on amino acids degradation. Two glutamate analogs, 5-hydroxylysine (HYL) and the methionine sulfoximine (MS), were evaluated as GS inhibitors, and as parasite proliferation inhibitors. Interestingly, HYL did not show any effect on both, the enzyme activity or the epimastigotes growth, but MS efficiently inhibited the activity, with a competitive inhibition pattern. In spite of the fact that MS did not affect the epimastigotes proliferation, when supplemented in combination with high ammonium concentration it inhibited the parasite growth, revealing the participation of *TcGS* on the detoxification of NH_4^+ . Finally, due to the metabolic peculiarities of amastigotes, they are exposed to high intracellular concentrations of ammonium and *TcGS* would be more significant in intracellular forms. Hence, the treatment with MS along the intracellular cycle decreased the trypomastigote bursting from the CHO-K₁, demonstrating the importance of GS on the *T. cruzi* life cycle establishment and nitrogen metabolism.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Metabolism. Glutamine. Glutamate. Ammonium. Methionine sulfoximine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
Figura 2 – Enzimas envolvidas na interconversão glutamato-glutamina.....	19
Figura 3 – Reação da glutamina sintetase.	19
Figura 4 – Enzimas acopladas à reação da glutamina sintetase.	28
Figura 5 – Epítipo reconhecido pelo anticorpo α -GS comercial e identificação da enzima <i>TcGS</i>	31
Figura 6 - Predição de domínios conservados na sequência <i>TcGS</i>	38
Figura 7 - Alinhamentos das sequências de aminoácidos correspondente a glutamina sintetase no genoma de <i>T. cruzi</i>	38
Figura 8 – Filogenia de sequências protéicas de glutamina sintetase	39
Figura 9 - Alinhamento das sequencias de aminoácidos da <i>TcGS</i> com seus ortólogos em tripanossomatídeos	41
Figura 10 - Clonagem da sequência correspondente a <i>TcGS</i> em vetor pET28a.	42
Figura 11 – Influência da temperatura na expressão da <i>TcGS</i> e resultado da purificação em sistema de afinidade.....	43
Figura 12 – Eletroforese não-desnaturante em gel de poliacrilamida.	44
Figura 13 – Cromatograma da <i>TcGS</i>	45
Figura 14 – Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática	47
Figura 15 – Especificidade de substrato (L-glutamato)	48
Figura 16 – Efeito de íons divalentes na atividade enzimática	49
Figura 18 – Efeito do pH na atividade enzimática	51
Figura 19 – Efeito da temperatura na atividade enzimática	52
Figura 20 – Níveis de expressão gênica, expressão protéica e atividade enzimática da <i>TcGS</i> .54	
Figura 21 – Ensaio de permeabilização seletiva com digitonina	56
Figura 22 – Imunofluorescência com anticorpo α -GS	57
Figura 23 – Inibição da atividade enzimática.....	58
Figura 24 – Influência da concentração de MS nos parâmetros cinéticos K_m e V_{max}	59
Figura 25 – Constante de inibição	60
Figura 27 – Proliferação de formas epimastigotas na presença de NH_4OH	62
Figura 28 – Proliferação de formas epimastigotas na presença de 10 mM NH_4OH e de diferentes concentrações de MS.	62
Figura 29 – Liberação de formas tripomastigotas de cultivo na presença de MS.....	63
Figura 30 – Relação da atividade de GS, prolina intracelular e transporte de prolina e glicose ao longo do ciclo intracelular.	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ALAT – Alanina aminotransferase

ATP – adenosina trifosfato

CHO-K₁ – linhagem proveniente de hamster de ovário chinês

C_t – Threshold cycle

DC – Doença de Chagas

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – Deoxiribonucleosideo trifosfatado

E_a – Energia de ativação

EC – *Enzyme comission nomenclature*

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EEA – Ensaio de enzimas acopladas

EI – complexo enzima-inibidor

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay* / imunoensaio enzimático

ES – complexo enzima-substrato

EVM – Ensaio de verde malaquita

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GS – glutamina sintetase

HRP – *Horseadish peroxidase*

HYL – 5-hidroxilisina

IFI – Imunofluorescência indireta

IgG – Imunoglobulina G

IPTG – Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

K_{cat} – Constante catalítica

K_{cat}/K_m – Eficiência catalítica / *turnover number*

K_i – Constante de inibição

K_m – Constante de Michaelis-Menten

LB – Meio de cultura Luria-Bertani

LDH – Lactato desidrogenase

LIT – liver infusion – tryptose

MES – Tampão contendo ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico

MS – metionina sulfoximina

NADH – Dinucleotídeo de nicotiamida-adenina
NCBI – *National center for biotechnology and information*
NH₃ – amônia
NH₄⁺ - amônio
NTA – Ácido nitrilotriacético
P – precipitado
PBS – Tampão fosfato salino
PBS-T – PBS suplementado com 0,3% de tween 20
PCR – *polymerase chain reaction*
Pi – fosfato inorgânico
PK – Piruvato quinase
PMSF - *Phenylmethylsulfonyl fluoride*
RPMI – meio de cultivo para células de mamífero: Roswell Park Memorial Institute
S – sobrenadante
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – Eletroforese desnaturante de proteínas em gel poliacrilamida
SEC – Cromatografia de exclusão por massa molecular
SFB – soro fetal bovino
TAE – Tampão Tris Acetato EDTA
TAT – Tirosina aminotransferase
TcGS – Glutamina sintetase de *Trypanosoma cruzi*
TcGSr – Glutamina sintetase recombinante de *Trypanosoma cruzi*
TMB – 3,3',5,5'-teatrametilbenzidina
Tris – Tris (hidroximetil) aminometano
TSB – Tampão de extratos proteicos
UV – Ultravioleta
V_{max} – Velocidade máxima
vPBS – PBS modificado por Voorheis
X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Doença de Chagas (DC)	15
1.2 <i>T. cruzi</i> e o metabolismo de aminoácidos	17
2 MATERIAL E MÉTODO	20
2.1 Parasitas utilizados	20
2.1.1 <i>Epimastigotas</i>	20
2.1.2 <i>Células de mamífero</i>	20
2.1.3 <i>Tripomastigotas de cultivo</i>	20
2.1.4 <i>Cultura e purificação dos tripomastigotas metacíclicos</i>	20
2.1.5 <i>Formas amastigotas e epimastigotas intracelulares</i>	21
2.2 Manipulação de DNA	21
2.2.1 <i>Extração de DNA genômico de <u>T. cruzi</u></i>	21
2.2.2 <i>Eletroforese em gel de agarose</i>	22
2.2.3 <i>Amplificação, clonagem e sequenciamento do gene da GS de <u>T. cruzi</u></i>	22
2.2.4 <i>Sequenciamento de DNA</i>	23
2.2.5 <i>Extração de DNA plasmidial em pequena escala (Miniprep)</i>	23
2.3 Manipulação de RNA	23
2.3.1 <i>Extração de RNA</i>	23
2.3.2 <i>Quantificação dos transcritos do gene TcGS por PCR quantitativa (qRT-PCR)</i>	24
2.4 Manipulação de bactérias	25
2.4.1 <i>Bactérias</i>	25
2.4.2 <i>Transformação de bactérias competentes</i>	25
2.4.3 <i>Expressão de TcGS em <u>E. coli</u></i>	26
2.4.4 <i>Purificação da TcGS recombinante</i>	26
2.5 Extratos totais de <i>T. cruzi</i>	27
2.6 Ensaios de atividade enzimática	28
2.6.1 <i>Ensaio de enzimas acopladas (EEA)</i>	28
2.6.2 <i>Ensaio de verde malaquita (EVM)</i>	29
2.6.3 <i>Estabelecimento do pH ótimo para a enzima</i>	30
2.6.4 <i>Estabelecimento da temperatura ótima e calculo da Energia de ativação (E_a)</i>	30
2.7 Localização subcelular de GS em extratos de <i>T. cruzi</i>	30
2.7.1 <i>Extratos de epimastigotas de <u>T. cruzi</u> fracionados com digitonina</i>	30
2.7.2 <i>Anticorpo α-GS comercial</i>	31
2.7.3 <i>Imunolocalização por imunofluorescência indireta (IFI)</i>	31
2.8 Determinação da conformação oligomérica da TcGS	32

2.8.1 Cromatografia de exclusão por massa molecular ou Gel Filtração (SEC).....	32
2.8.2 Imunoensaio enzimático (ELISA).....	33
2.9 Perfil de expressão protéica de TcGS	33
2.9.1 Extratos protéicos de <i>T. cruzi</i>	33
2.9.2 Western Blotting	34
2.10 Efeito de análogos de L-glutamato sobre a glutamina sintetase e o <i>T. cruzi</i>	34
2.10.1 Análogos utilizados	34
2.10.2 Inibição da atividade de TcGS	35
2.10.3 Constante de inibição	35
2.10.4 Inibição do crescimento de epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	35
2.10.5 Efeito da Metionina Sulfoximina no ciclo intracelular de <i>T. cruzi</i>	36
3 RESULTADOS	37
3.1 Análises in silico e clonagem da TcGS	37
3.2 A enzima TcGS é um multímero	43
3.2.1 Expressão recombinante.....	43
3.2.2 Estado oligomérico.....	44
3.4 Caracterização enzimática da TcGS	46
3.4.1 A reação catalizada pela TcGS utiliza três substratos.....	46
3.4.2 A reação catalisada pela TcGS é dependente de íons divalentes.....	48
3.4.3 pH ótimo, influência da temperatura na atividade e cálculo da E_a	50
3.5 Análise da expressão e atividade da TcGS ao longo do ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	53
3.6 Localização subcelular da TcGS	55
3.7 A Metionina Sulfoximina interfere na atividade da TcGS e no ciclo intracelular do <i>T. cruzi</i>	58
4 DISCUSSÃO	64
4.1 Características da glutamina sintetase de <i>Trypanosoma cruzi</i>	64
4.2 Influência de Metionina Sulfoximina na atividade de TcGS e no metabolismo e proliferação de <i>T. cruzi</i>.....	66
5 CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas (DC)

Descoberta em 1909 pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas, a Tripanossomíase Americana ou DC, como é mais conhecida, é hoje uma das 13 doenças tropicais mais negligenciadas do mundo. Essa doença atinge aproximadamente oito milhões de pessoas na América Latina, das quais 30 a 40% desenvolvem os sintomas mais graves desta enfermidade (1), representando um grave problema de saúde pública para as áreas endêmicas. Possui como agente causador o *T. cruzi*, um protozoário da família Trypanosomatidae que apresenta um ciclo de vida complexo, representado por várias formas de desenvolvimento (2-4).

A transmissão do parasita ocorre entre mamíferos principalmente pela ação de insetos vetores hematófagos pertencentes à subfamília Triatominae. Acredita-se que essa via de transmissão é responsável por 80% dos casos de DC e estaria estritamente relacionada às características biológicas dos vetores, às condições precárias de infra-estrutura higiênico-sanitária do local de transmissão e à ação desordenada do homem sobre o meio ambiente. A transfusão sangüínea é responsável por 5 a 20% da transmissão, enquanto que a transmissão placentária representa em média 1% (5). Recentemente a relevância da via oral de transmissão tem sido reconhecida, constituindo uma via não vetorial importante (6-8).

O *T. cruzi* gera nos pacientes infectados uma fase aguda da infecção, com intensa parasitemia, e posteriormente, uma fase crônica caracterizada pela ausência de parasitemia e por altos níveis séricos de IgG específica. A fase aguda é também evidenciada pela presença do parasita em praticamente todos os órgãos e tecidos do organismo e pela ausência de resposta imune humoral. Geralmente quando apresenta sintomas estes são inespecíficos. Porém, em aproximadamente 10% dos casos os sintomas podem ser severos levando o paciente a óbito (9). Já na fase crônica a parasitemia é reduzida, podendo ser indetectável ao diagnóstico laboratorial, e em pacientes imunocompetentes caracteriza-se por robusta resposta imune humoral. Apesar da possibilidade de demonstrar a presença do DNA do parasita por PCR, não há visualização de parasitas por microscopia óptica (10, 11). Inicialmente, na fase crônica, existe uma forma indeterminada ou subclínica da doença, esse estado assintomático pode permanecer por toda a vida (3). Em um terço dos casos crônicos ocorrem manifestações clínicas, dentre elas destacam-se a cardiopatia chagásica (9) e manifestações gastrointestinais macro e microscópicas (12) fazendo com que os órgãos aumentem de volume (megavíceras) e diminuam sua função. Eventualmente ambas formas clínicas podem

ocorrer, e ainda, em casos de pacientes imunossuprimidos, manifestações cerebrais e outras manifestações clínicas severas.

No período de 1936 a 1960 houve um avanço na busca de compostos para o tratamento específico da DC mediante à avaliação da atividade biológica de inúmeras substâncias, extratos e misturas de compostos, porém com resultados não satisfatórios e relevância clínica reduzida. A partir de 1961, o desenvolvimento de pesquisas orientadas a encontrar uma alternativa terapêutica para essa doença baseou-se em estudos que optavam por modelos experimentais de infecção com *T. cruzi* em cobaias, o que permitiu avaliar a eficácia de algumas substâncias como a nitrofurazona (13). Por volta da década de 1970, dois compostos surgiram e representaram uma nova perspectiva no tratamento da doença, visto que a eficácia na fase aguda destes compostos era maior em relação à dos até então utilizados. Os novos compostos foram o nifurtimox (Lampit®, da Bayer®), 3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino)tetra-hidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido e o benzonidazol (Rochagan®, da Roche®), N-benzil-2-nitroimidazol acetamida e ainda hoje a quimioterapia contra a doença é baseada nessas drogas que, acarretam alta toxicidade em pacientes durante o tratamento. Além disso, a maioria dos pacientes infectados é diagnosticada durante a fase crônica da doença, quando a terapia é pouco eficiente, desse modo nota-se a necessidade do desenvolvimento de novas drogas que atuem contra o parasita *T. cruzi*, especialmente na fase crônica de sua manifestação clínica (14).

O parasita apresenta ciclo de vida complexo representado pela presença de várias formas de desenvolvimento, formas estas que se desenvolvem em um hospedeiro vertebrado (definitivo) e um invertebrado (intermediário). Basicamente três formas do parasita são reconhecidas: (1) amastigota, que se desenvolve no interior da célula do hospedeiro vertebrado; (2) tripomastigota, forma flagelada, não replicativa e infectiva que se encontra tanto no hospedeiro vertebrado quanto no invertebrado; (3) epimastigota, forma flagelada, replicativa e não infectiva encontrada majoritariamente no intestino do hospedeiro invertebrado (15, 16).

Em vários trabalhos, desde a descoberta da DC, foi descrito um estágio intermediário entre o amastigota e o tripomastigota, durante a infecção da célula hospedeira. A partir do fim do século XX e início do século XXI, essas formas foram caracterizadas e devido às suas características bioquímicas e morfológicas foram denominadas epimastigotas intracelulares (Figura 1) (2, 17).

Figura 1 – Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O parasita apresenta um ciclo de vida que alterna entre um hospedeiro invertebrado (hemípteros hematófagos da família Reduviidae) e um hospedeiro vertebrado. Formas descritas no ciclo: (**T**) tripomastigota sanguínea; (**E**) epimastigota; (**M**) tripomastigota metacíclica; (**A**) amastigota; (**Ei**) epimastigota intracelular. (2-4, 18).

Fonte: Adaptado de Chagas, 1909 (18)

1.2 *T. cruzi* e o metabolismo de aminoácidos

Sabe-se que os tripanossomatídeos são capazes de metabolizar tanto hidratos de carbono quanto aminoácidos, neste último caso com produção de amônio (19). Tem sido demonstrado que a prolina, o glutamato e o aspartato, são utilizados pelo *T. cruzi* como fonte energética e de obtenção de outros metabólitos (20). Leucina e isoleucina, glutamina e asparagina tem participação também no metabolismo energético (21, 22), sendo que esses aminoácidos podem ser convertidos a aspartato ou glutamato e incorporados ao Ciclo de Krebs, após deaminação, na mitocôndria.

Os aminoácidos desempenham um papel relevante e participam no metabolismo dos tripanossomatídeos. A arginina atua na administração dos recursos energéticos da célula ao ser substrato da enzima arginina quinase, de forma análoga à participação da creatina e a creatina quinase em mamíferos (23-25). Outros aminoácidos como a glicina, alanina, prolina e glutamato foram propostos como participantes na regulação do volume da célula, evitando desajustes osmóticos (26). Sabe-se ainda que a prolina, o glutamato e o aspartato são aminoácidos promotores da metaciclogênese em *T. cruzi*. Estudos têm relatado diferentes funções da prolina na biologia do parasita, dentre eles a capacidade de induzir a diferenciação de formas intracelulares de *T. cruzi* (27), o acúmulo desse aminoácido está relacionado com a resistência ao estresse oxidativo (28) e também como fonte de energia para os tripomastigotas

metacíclicos durante o processo de invasão das células do hospedeiro mamífero (29). Em síntese nota-se a importância dos múltiplos papéis dos aminoácidos e consequentemente de seus reguladores na manutenção e sobrevivência do *T. cruzi*. Diante disso, torna-se visível a necessidade da caracterização das vias metabólicas envolvidas nos processos de síntese, degradação e regulação dos aminoácidos, que possibilitariam novos estudos sobre abordagens terapêuticas de maneira eficiente e direcionada.

Desde 1961 existem relatos da presença de glutamato intracelular em *T. cruzi* e em 2006 nosso grupo demonstrou a capacidade do parasita de transportar esse aminoácido (30, 31) que, como já se sabe, pode ser convertido a α -cetoglutarato pela ação das enzimas alanina aminotransferase (ALAT) ou tirosina aminotransferase (TAT), que transferem um grupamento amino a outros cetoácidos, particularmente ao piruvato, formando alanina. O glutamato também pode ser deaminado pela ação da glutamato desidrogenase que transfere o grupamento amino para a H_2O gerando amônio (NH_3) (32). Além disso, nosso grupo demonstrou que análogos estruturais de glutamato foram capazes de atuar em formas epimastigotas em condições de estresse. (33). Neste mesmo trabalho, reforçou-se a existência de uma via de síntese de glutamina a partir de glutamato, que já havia sido reportada em 1980 (34).

O genoma de *T. cruzi* apresenta diferentes enzimas que vinculam os aminoácidos glutamina e glutamato (Figura 2). A reação de síntese da glutamina pela enzima glutamina sintetase (GS - EC: 6.3.1.2) a partir do glutamato requer amônio (NH_4^+) e ATP, e é unidirecional (Figura 3) (35). Diversas outras enzimas parecem atuar na conversão de glutamina em glutamato, este último pode ser convertido em um intermediário do Ciclo de Krebs (alfa-cetoglutarato) por ação de uma glutamato desidrogenase, favorecendo assim o metabolismo energético.

Figura 2 – Enzimas envolvidas na interconversão glutamato-glutamina

Enzimas envolvidas na via glutamato-glutamina. Glutamina sintetase (EC 6.3.1.2), glucosamina sintetase (EC 2.6.1.16), GMP sintetase (EC 6.3.4.1), carbamoil-fosfato sintetase (EC 6.3.5.5), asparagina sintetase (glutamina dependente) (EC 6.3.5.4) e glutaminil-tRNA sintetase (EC 6.1.1.18) (36).

A fim de se conhecer melhor os mecanismos metabólicos de *T. cruzi* e de desenvolver estratégias terapêuticas de maneira eficiente e direcionada, destaca-se a necessidade da caracterização das vias metabólicas que envolvem glutamato e glutamina seja na sua degradação, síntese ou regulação.

A GS foi escolhida como principal objeto de estudo desse trabalho sob a hipótese de que participa na incorporação do nitrogênio em *T. cruzi*.

Figura 3 – Reação da glutamina sintetase.

A reação de aminação mediada pela enzima GS ocorre em dois passos sequenciais: (i) fosforilação da molécula de L-glutamato pela ação do ATP gerando o intermediário γ -glutamil fosfato; (ii) reação do γ -glutamil fosfato com NH_4^+ formando fosfato inorgânico (P_i) e L-glutamina (37).

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Parasitas utilizados

2.1.1 *Epimastigotas*

Foi utilizada a cepa C.L., clone 14 de *T. cruzi* (38) cujas formas epimastigotas foram mantidas em fase exponencial de crescimento em meio LIT (Liver Infusion–Tryptose) pH 7,2, que contém infusão de fígado 5,0 g/L, Tryptose 5,0 g/L, NaCl 4,0 g/L, KCl 0,4 g/L, Na₂HPO₄ 8,0 g/L, glicose 2 g/L, hemina 10 g/L suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) a 28 °C (39).

2.1.2 *Células de mamífero*

Células da linhagem CHO-K₁ foram cultivadas a 37° C em meio RPMI 1640 (Cultilab) acrescido com 10% de SFB (Cultilab), 0,15% (m/v) NaHCO₃, sob atmosfera úmida e com manutenção da taxa de CO₂ em 5%.

2.1.3 *Tripomastigotas de cultivo*

Células CHO-K₁ foram infectadas com 3×10^7 tripomastigotas a cada garrafa em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. As células foram incubadas a 37 °C por 4 horas, sob atmosfera úmida com 5% de CO₂ (40). Após 4 horas, as células foram lavadas com PBS 1X, acrescidas de meio RPMI suplementado com 10% de SFB e incubadas durante 24 horas, nas mesmas condições descritas acima. No dia seguinte, as células foram lavadas com PBS 1X, acrescidas de meio RPMI suplementado 2% de SFB e incubadas a 33 °C. Os parasitas foram coletados entre o 5°-10° dia pós-infecção, contados em câmara de Neubauer e utilizados em experimentos posteriores.

2.1.4 *Cultura e purificação dos tripomastigotas metacíclicos*

As culturas contendo formas metacíclicas obtidas a partir da diferenciação de epimastigotas foram purificadas por retenção diferencial em matriz de troca iônica (DEAE-celulose) (41). A cultura contendo formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos foi

lavada duas vezes com PBS suplementado com 5,4% de glicose e ressuspendida em aproximadamente 2 mL da mesma solução. Esse volume foi adicionado à matriz de DEAE-celulose previamente alocada em uma coluna e equilibrada com 1 volume de coluna de PBS 5,4% de glicose. A saída dos tripomastigotas metacíclicos foi acompanhada por microscopia, analisando-se alíquotas de aproximadamente 0,5 mL recolhidas a partir do momento da aplicação do material à coluna. A porcentagem de tripomastigotas metacíclicos purificados foram então calculada e as frações com no máximo 15% de epimastigotas foram utilizadas nos ensaios posteriores.

2.1.5 Formas amastigotas e epimastigotas intracelulares

Essas formas foram obtidas a partir de infecção de células da linhagem CHO-K₁ por tripomastigotas em meio RPMI suplementado com 2% de SFB, incubadas por 4 horas a 37 °C em estufa com controle da atmosfera de CO₂ (40). Logo após a incubação, foram realizadas duas lavagens com PBS e incubação a 33 °C em meio RPMI com suplementação de 2% de SFB. Nessas condições descreitas alcança-se a sincronização do ciclo intracelular do parasita, tornando majoritária a obtenção de formas amastigotas entre o 2º e o 3º dia pós-infecção e de formas epimastigotas intracelulares entre o 4º e 5º dia pós-infecção. Nesse período as células CHO-K₁ contendo amastigotas ou epimastigotas intracelulares foram lavadas duas vezes com PBS e lisadas com solução de PBS contendo 0,01% de SDS. As células aderidas à garrafa foram removidas com o auxílio de um raspador celular e a solução resultante centrifugada a 480 x g durante 5 minutos, sedimentando os resíduos celulares. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 4300 x g por 10 minutos. O sedimento da última centrifugação foi lavado com PBS e ressuspensão em meio RPMI sem soro, contado em câmara de Neubauer e os parasitas intracelulares utilizados em experimentos posteriores.

2.2 Manipulação de DNA

2.2.1 Extração de DNA genômico de T. cruzi

O DNA genômico de *T. cruzi* foi obtido de formas epimastigotas, sua extração foi realizada com um Kit comercial (DNeasy® Blood & Tissue Kit; Qiagen, Hilden, Renânia do Norte-Vestfália, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação do DNA foi determinada em aparelho *NanoDrop* (Spectrophotometer ND-1000).

2.2.2 Eletroforese em gel de agarose

As eletroforeses do DNA ocorreram em gel de agarose 1% (p/v) com tampão TAE 1X (0,04 M TRIS, 1 mM EDTA, pH 8,0 ajustado com ácido acético). Para visualização das bandas de DNA, foi adicionado brometo de etídeo ao gel, na proporção de 1:20 (v/v; $\mu\text{L}/\text{mL}$) na agarose. Nas amostras de DNA adicionou-se tampão de amostras (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xileno cianol e 20% de glicerol). Os padrões de massa molecular utilizados foram: (i) 1 kb DNA *Ladder* (Fementas® Vilnius, Lithuania); (ii) 1 kb plus DNA *Ladder* (Fementas®). Os géis foram visualizados no transiluminador sob fonte de luz ultravioleta (UV) e fotografados em sistema ImageQuant® 300 (GE Healthcare).

2.2.3 Amplificação, clonagem e sequenciamento do gene da GS de *T. cruzi*

Foram encontrados duas sequências putativas de GS no banco de dados do genoma de *T. cruzi* da The EuPathDB Project Team (www.tritrypdb.org): (i) TcCLB.503405.10; (ii) TcCLB.508175.370. Segundo a predição do programa Phobius, ambas sequências apresentam domínio transmembranar nos primeiros 40 aminoácidos. Foram então desenhados oligonucleotídeos que amplificavam a parte conservada entre as sequências, excluindo a parte com a predição de alta hidrofobicidade, ainda mantendo os domínios catalíticos preditos. Esses oligonucleotídeos apresentavam sítios de clivagem para as endonucleases de restrição *XhoI* e *BamHI*.

Nas reações de PCR foram usadas 100 ng de DNA genômico, *buffer* Taq DNA polimerase 1X, oligonucleotídeos na concentração final 10 μM , dNTPs 10 mM, MgCl_2 15 mM e 1 U da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas®). As condições de amplificação compreenderam 35 ciclos com desnaturação inicial por 5 minutos, desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento dos oligos ao DNA molde a 60 °C por 1 minuto e 30 segundos e extensão da cadeia nucleotídica a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, além de uma extensão final adicional a 72 °C durante 10 minutos.

A sequência amplificada foi clonada em vetor linear (pGEMT-easy®) e subclonada em vetor de expressão (pET-28_{a(+)}). Nas reações foram utilizadas cerca de 1 unidade de enzima para cada μg de DNA e a mistura de reação foi então incubada por 1 hora à 37 °C. A separação e extração de fragmentos de DNA obtidos a partir dos cortes foram realizadas por corrida eletroforética em géis de agarose 1% e posterior purificação mediante uso do kit Gene

JET™ Gel Extraction (Fermentas®), de acordo com as indicações do fabricante. Nas reações de ligação, o vetor de interesse e o fragmento de DNA digeridos foram utilizados em uma relação quantitativa inserto:vetor de 4:1. Foi adicionada a reação a enzima T4 DNA ligase 1 U/μl (Fermentas®) em tampão adequado recomendado pelo fabricante (Fermentas®) à 4 °C *overnight*. Após a ligação os produtos foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* (DH5α), como está descrito em 2.4.2 A confirmação das construções ocorreu por sequenciamento, descrito a seguir, e pela análise dos produtos da digestão por enzimas de restrição mencionadas anteriormente.

2.2.4 Sequenciamento de DNA

As reações de sequenciamento foram realizadas pelo Método de Sanger (42), utilizando os oligonucleotídeos T7, M13 direto e reverso, e o kit de sequenciamento de DNA BigDye™ 3.1 (Applied Biosystems) segundo instruções do fabricante. As reações ocorreram no sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). Os alinhamentos e comparações entre as seqüências foram realizados mediante o uso dos programas Align versão 6.2.0, MUSCLE BLAST versão 2.2.19, BioEdit versão 7.0.0 e outros disponíveis.

2.2.5 Extração de DNA plasmidial em pequena escala (Miniprep)

Os DNAs plasmidiais dos clones obtidos nas transformações de células de *E. coli* competentes (DH10β), foram extraídos e purificados mediante recomendações do fabricante, utilizando kit comercial (PureLink™ Quick Plasmid Miniprep; Invitrogen, , Carlsbad, Califórnia, EUA). A integridade do DNA foi confirmada após eletroforese em gel de agarose 1% e marcação com brometo de etídio.

2.3 Manipulação de RNA

2.3.1 Extração de RNA

As células mantidas em fase exponencial de crescimento foram lavadas duas vezes por centrifugação com PBS. Após a última centrifugação, os precipitados foram homogeneizados em 1 mL do reagente TRIzol® (Invitrogen) e mantidos à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida foram acrescentados 200 μl de clorofórmio para cada 1 mL de TRIzol e

as misturas homogeneizadas em vórtex por 15 segundos, seguido de centrifugação 10.000 x g a 4 °C por 10 minutos. As fases aquosas (contendo o RNA) foram extraídas e precipitadas com 500 µl de isopropanol por incubação a -80 °C durante a noite. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g, 4 °C por 20 minutos, e os precipitados lavados com 1 mL de etanol 75% preparado em água tratada com DEPC (0,1% de dietilpirocarbonato, H₂O-DEPC).

2.3.2 Quantificação dos transcritos do gene *TcGS* por PCR quantitativa (*qRT-PCR*)

Os oligonucleotídeos específicos para o gene *TcGS* foram desenhados utilizando-se a plataforma *PrimerBlast* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), que permitiu a otimização do desenho dos oligonucleotídeos para a reação de PCR em tempo real. Para esta metodologia deve ser considerado que o produto de PCR ideal deve ter entre 50 e 150 pb e sua temperatura de dissociação deveria ser próxima aos 80 °C (43). As análises do mRNA por PCR em tempo real foram realizadas em equipamento Mastercycler® ep Realplex 1.5 (Eppendorf, Hamburgo, Hamburgo, Alemanha) utilizando-se o sistema de quantificação SYBR Green (Biotools, Kit Quantimix Easy Syg). As amostras de RNA foram inicialmente tratadas com DNase e inibidor de RNase para eliminar possíveis contaminações das amostras com DNA e a degradação do produto de interesse. A ausência de contaminação com DNA foi confirmada por PCR das amostras de RNA tratadas (ausência de produto de amplificação). Posteriormente foram realizadas as sínteses de cDNAs, utilizando 5 µg de RNA total previamente tratado com DNase, 200 U de transcriptase reversa SuperscriptII (Invitrogen), 50 ng de oligonucleotídeos, 2,5 mM de dNTPs, 10 mM de DTT, 40 U de RNase OUT e tampão 1X da transcriptase reversa, segundo instruções do fabricante (Invitrogen). Os cDNAs obtidos foram diluídos em água *milli-Q* para a concentração final de 2 ng/µL. Em seguida, foram realizadas as reações de PCR em tempo real utilizando 50-100 ng de cada cDNA como molde, 1,6 pmoles de cada oligonucleotídeo direto e reverso e 10 µL de SYBR Green (Quantimix EASY SYG, Biotools), sob os seguintes parâmetros: 95 °C por 2 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 62°C por 15 s, 68 °C por 20 s.

A análise de dados ocorreu no *software Realplex*. Foi utilizado como gene normalizador de expressão a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (44). A especificidade dos amplificadores foi verificada nas curvas de dissociação determinadas pelo termociclador. Os *Ct* (*threshold cycle*) obtidos são definidos como o número de ciclos que é necessário para que a fluorescência relativa à amplificação seja maior que a linha estabelecida

como base estatística. A razão relativa da quantidade de transcritos do gene GS e GAPDH foi calculada pela diferença entre a média do *Ct* de cada amostra e a média dos *Ct* do normalizador, de acordo com a fórmula $\Delta Ct = Ct_{amostra} - Ct_{normalizador}$.

2.4 Manipulação de bactérias

2.4.1 Bactérias

As linhagens de *E. coli* utilizadas foram crescidas a 37 °C em meio LB (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5g/L e NaCl 10 g/L) líquido ou sólido, suplementadas quando necessário com os antibióticos canamicina (30 µg/mL) e tetraciclina (50 µg/ml) para seleção de colônias portadoras de plasmídeo com marca de resistência, 20 µg/mL de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil β-galactopiranosídeo) e 1 mM de Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) para seleção de colônias brancas e azuis.

2.4.2 Transformação de bactérias competentes

Uma colônia isolada de bactéria (*E. coli* DH5-α, DH10β ou BL21-Codon Plus (DE3)) foi inoculada em 3 mL de meio LB na ausência de antibiótico e mantida a 37 °C por 12 horas com agitação (150 rpm). Após 12 horas, a cultura crescida foi diluída 1:100 em meio LB e incubada nas mesmas condições anteriores até atingir uma densidade óptica a 600 nm entre 0,5 e 0,6. As células foram então coletadas por centrifugação a 3.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sedimento obtido foi homogeneizado em 50 mL de solução gelada de CaCl₂ 0,1 M e incubado por aproximadamente 1 hora em gelo. Logo após a suspensão celular foi centrifugada a 3.000 x g por 15 minutos a 4 °C e o sedimento homogeneizado com 2 mL de solução gelada de CaCl₂ 0,1 M. As células competentes foram usadas imediatamente ou estocadas a -80 °C em glicerol 20% (v/v).

2.4.3 Expressão de *TcGS* em *E. coli*

A enzima recombinante *TcGS* foi expressa em bactérias *E. coli* fusionada a uma etiqueta de seis histidinas em seu extremo n-terminal. Este *Tag* permitiu a sua purificação por afinidade utilizando uma Ni^{2+} imobilizado em uma resina de agarose com nitrilotriacético (NTA). A resina carregada com níquel interage com os anéis imidazólicos das histidinas presentes na proteína recombinante.

O gene da *TcGS* foi subclonado no vetor pET28a₍₊₎ para expressão em *E. coli* linhagem BL21-Codon Plus (DE3)-RIL. Para isso, as bactérias contendo o plasmídeo foram crescidas em um pré-inóculo a 37 °C em meio LB com canamicina (30 µg/mL) e cloranfenicol (50 µg/ml) por 12 horas. Após esse período de incubação, o pré-inóculo foi diluído na proporção de 1:100 em LB e incubado a 37 °C, sob agitação (150 rpm) até a cultura atingir uma D.O. de 0,6.

Foi realizada a indução da expressão de *TcGS* recombinante com IPTG em duas diferentes concentrações (0,25 e 0,5 mM). Aliquotas foram retiradas ao longo do tempo e em distintas temperaturas.

Curiosamente, foi observada uma maior expressão de proteína recombinante na fração solúvel quando adicionado 100 µM de cada um dos substratos da enzima GS (L-glutamato, ATP – Adenosina tri-fosfato e NH_4Cl) no momento da indução. Esta condição foi mantida em todos os experimentos de expressão.

Após centrifugação, as amostras foram suspensas em tampão de amostra (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2,3%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01%, 20 mM mercaptoetanol), aquecidas a 95 °C por 5 minutos e utilizadas na técnica de eletroforese desnaturante de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue. Estabeleceu-se como condições ótimas de expressão: 500 mL de cultura, 0,25 mM de IPTG e 100 µM dos substratos da enzima.

2.4.4 Purificação da *TcGS* recombinante

Uma vez expressa a partir de um vetor pET, a GS recombinante possui 6 resíduos de histidinas no extremo N-terminal. Essa fusão possibilitou a purificação num único passo em coluna de afinidade de níquel Ni-NTA agarose (Qiagen®). Os procedimentos de purificação foram realizados a partir de extratos provenientes de culturas de bactérias crescidas em 500 mL de LB a 16 °C por 24 horas, induzidas com 0,25 mM de IPTG.

As culturas pós-indução foram centrifugadas a 5.000 x g por 15 minutos a 4 °C e os sedimentos homogeneizados em tampão de lise gelado (Tris-HCl 50 mM; NaCl 300 mM, pH 7,4) com adição de inibidores de proteases (E-64 0,04 mM, PMSF 1 mM e TLCK 10 µg/ml). Em seguida, as células foram submetidas à lise por sonicação com 4 pulsos de 1 minuto e intervalos de descanso em gelo de 1 minuto entre os pulsos. Após a sonicação, adicionou-se 0,1% de Triton X-100 ao lisado, seguida de centrifugação a 20.000 x g por 30 minutos a 4°C, separando-se a fração solúvel (sobrenadante) da insolúvel (precipitado). A fração solúvel foi utilizada para dar seguimento à purificação em coluna de resina de níquel (Ni-NTA agarose). Essa coluna foi previamente equilibrada com 5 volumes de coluna (V) com tampão A (Tris-HCL 20 mM; 500 mM NaCl e 10 mM de imidazol pH 7,4). O sobrenadante foi então aplicado à coluna, seguido de lavagem com 10 V de tampão B (Tris-HCL 50 mM; 150 mM NaCl e 20mM de imidazol, pH 7,4) para a retirada de proteínas não ligantes à coluna. A proteína recombinante foi eluída com 5 V de tampão C (Tris-HCL 20 mM; 500 mM NaCl e 500 mM de imidazol pH 7,4). As frações contendo a proteína recombinante foram concentradas por ultrafiltração usando filtros Amicon-ultra/50.000 MWCO (Millipore). As proteínas foram quantificadas como descrito a seguir, e posteriormente, as frações obtidas foram analisadas em gel SDS PAGE 10%.

2.5 Extratos totais de *T.cruzi*

Foram utilizadas formas epimastigoas em fase exponencial de crescimento ($5 \text{ a } 6 \times 10^7$ parasitas mL⁻¹) ou outro estágio do desenvolvimento do parasita sem essa especificação de concentração. As células foram centrifugadas (1000 x g por 10 minutos) e lavadas três vezes com PBS 1X. Após a última centrifugação da lavagem o *pellet* foi ressuspensionado em 1ml de tampão de extratos protéicos - TSB (Tris-HCl 30mM pH 7,6; Sacarose 0,25 M; EDTA 1 mM; PMSF 1 mM; TLCK 10 µg/ml; E64 0,04 mM). Esta mistura foi então sonicada com 3 pulsos de vinte segundos a 40% de potência e centrifugada (1500 x g por 5 minutos a 4 °C). Ao fim, o sobrenadante que contém a parte solúvel onde se apresentam as enzimas foi mantido a 4 °C até o início das medições de atividade.

2.6 Ensaios de atividade enzimática

Para a verificação da atividade de glutamina sintetase, tanto utilizando a enzima *TcGS* recombinante como o extrato total de *T. cruzi*, foram fixados como condições iniciais a temperatura de 28 °C, o pH 7, agitação constante. Dois diferentes protocolos foram estabelecidos e comparados em alguns dos parâmetros bioquímicos. Estas metodologias estão descritas nos tópicos abaixo.

2.6.1 Ensaio de enzimas acopladas (EEA)

A atividade enzimática foi determinada mediante a monitoração da absorbância por espectrofotometria a 340 nm da oxidação de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina (NADH), substrato da enzima lactato desidrogenase (LDH), utilizada nesse ensaio (Figura 4) (33, 45).

Em duas cubetas de quartzo (Amostra e Branco), foram adicionados os seguintes reagentes com suas respectivas concentrações: tampão imidazol HCl (34 mM), fosfoenolpiruvato (33 mM), cloreto de magnésio (2 mM), cloreto de potássio (18,9 mM), β -NADH (0,25 mM), piruvato quinase (PK) (28 unidades) e LDH (40 unidades). Em uma primeira avaliação de atividade os substratos específicos da GS – L-glutamato, ATP e NH_4^+ – foram ajustados para uma concentração final de 1 mM. As medições eram iniciadas com a enzima recombinante ou extrato de *T. cruzi* e a final oxidação de NADH recordada a 340nm.

Figura 4 – Enzimas acopladas à reação da glutamina sintetase.

A atividade de GS foi avaliada utilizando o sistema clássico de acoplamento com piruvato quinase e lactato desidrogenase.

2.6.2 Ensaio de verde malaquita (EVM)

O método de detecção de fosfato livre P_i (46), foi padronizado e utilizado no estabelecimento de alguns parâmetros cinéticos, visto que este protocolo elimina a utilização de enzimas acopladas, quantificando de maneira direta e colorimétrica a presença de um dos produtos. Deve-se ressaltar que todas as vidrarias foram lavadas e os reagentes preparados e em H_2O livre de P_i

Antes de iniciar a pipetagem da reação as seguintes soluções foram preparadas:

1. Solução de heptamolibdato de amônio: Foram adicionados cuidadosamente 32 mL de H_2SO_4 em 100 mL de H_2O_{miliq} no gelo e sob capela de exaustão. Paralelamente foram dissolvidas 3,7 gramas de molibdato de amônio (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA) em 50 mL de H_2O_{miliq} . As duas soluções foram então misturadas e foram adicionados 200 mL de H_2O_{miliq} . A solução foi mantida à temperatura ambiente e protegido da luz.
2. Solução de Verde Malaquita: 1 g de álcool polivinílico foi dissolvido em 50 mL de H_2O_{miliq} . A solução foi então filtrada e 18,5 mg de verde de malaquita (Sigma-Aldrich®) foram adicionadas. A solução foi misturada e estocada à temperatura ambiente e protegido da luz.

Em um tubo foram adicionados os seguintes reagentes: $TcGSr$ 5 μg ; tampão imidazol HCl 34 mM (MES ou Tris HCl 100 mM); $MgCl_2$ 2 mM; L-glutamato 1 mM; NH_4Cl_2 ; 30 μL de inibidor de antifosfatase (Sigma-Aldrich®). ATP (1 mM) foi adicionado como iniciador da reação. Para cada amostra foram aferidos os tempos de 0, 1, 3, 6, 8, 10, 15 e 20 minutos.

Para cada ponto, 100 μL da reação foram removidos e colocados em um tubo contendo 700 μL de água e 200 μL de solução de heptamolibdato de amônio (1) a fim de parar a reação. No momento todas as reações finalizaram, 200 μL de solução de Verde de Malaquita (2) foram adicionado e as soluções incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Logo após, foram aliquoteadas triplicatas de 100 μL de cada reação em uma placa de 96 poços e realizada a leitura da absorbância a 620 nm.

2.6.3 Estabelecimento do pH ótimo para a enzima

Concentrações saturantes para os substratos foram mantidas nas reações, porém foi estabelecido um gradiente do potencial hidrogeniônico da reação (pH de 5 à 9) nos tampões MES, imidazol HCl e Tris HCl e então medida a atividade da enzima, utilizando tanto TcGSr como o extrato de epimastigotas.

2.6.4 Estabelecimento da temperatura ótima e calculo da Energia de ativação (E_a)

Concentrações saturantes para os substratos foram mantidas nas reações, porém foi variada a temperatura de incubação da reação (de 10 à 60 °C). Os valores de atividade foram utilizados na fórmula de Arrhenius para o cálculo da Energia de Ativação (E_a).

$$[\ln(k) = \frac{-E_a}{R} \frac{1}{T} + \ln(A)]$$

2.7 Localização subcelular de GS em extratos de *T. cruzi*

2.7.1 Extratos de epimastigotas de *T. cruzi* fracionados com digitonina

A metodologia utilizada foi a mesma que a explicitada em 2.5 para o crescimento dos parasitas, deste modo os parasitas foram lisados na presença do tampão TSB e inibidores de proteases, porém foi estabelecida uma quantidade fixa de parasitas necessária para cada reação com digitonina, um glicosídeo usado como detergente e que facilmente solubiliza lipídeos. Após três lavagens os parasitas foram ressuspensos em 2 mL de TSB, contados em câmara de Neubauer e adicionado 7.10^8 parasitas por reação com o detergente e volume ajustado com TSB. Realizou-se um gradiente de concentrações de digitonina que variou de 0 à 5 mg/mL. Os tubos contendo parasitas e digitonina foram incubados a temperatura ambiente por cinco minutos, tempo necessário para sua ação detergente sobre as membranas celulares.

Após esse tempo os tubos foram centrifugados (8000 x g por 2 minutos a 25 °C). As frações do sobrenadante (S) foram mantidas a 4 °C e as frações do precipitado (P) ressuspensas em TSB, sonicadas e centrifugadas nas mesmas condições que em 2.5 e mantidas a 4 °C até o início das medições de atividade. A concentração de proteína das frações S e P foram determinadas pelo método de Bradford (47). As atividades enzimáticas da

piruvato quinase como marcador citosólico, da hexoquinase como marcador glicossomal e citrato sintase como marcador mitocondrial e da GS foram medidas em todas as frações S e P.

2.7.2 Anticorpo α -GS comercial

O anticorpo α -GS produzido em coelho (Sigma-Aldrich®), foi utilizado em ensaios de *Western Blotting*, ELISA e imunofluorescência indireta baseado no fato de reconhecer um epítopo 59,4% idêntico e 76,47% conservado em relação ao epítopo presente na sequência de *TcGS* (Figura 5).

Figura 5 – Epítopo reconhecido pelo anticorpo α -GS comercial e identificação da enzima *TcGS*.

O anticorpo comercial α -GS (Sigma-Aldrich®) reconhece um epítopo (1a) que apresenta-se conservado (76,47%) e relação à sequência de aminoácidos de *TcGS* (1b). Foi confirmada a capacidade desse anticorpo de reconhecer a enzima recombinante gerada nesse estudo (*TcGS*). Essa proteína foi expressa em sistema heterólogo e após corrida eletroforética: (a) Marcador de massa molecular; (b) lisado e lavagens antes da eluição da proteína recombinante; (c) frações de eluição; (d) Eluições concentradas com coluna de celulose Amicon® Ultra-4 50K; (e, f e g) a proteína indicada pela seta, foi imobilizada em uma membrana de nitrocelulose após corrida eletroforética e utilizada em ensaio de western blotting com o anticorpo Anti-GS comercial na incubação primária nas diluições de 1:3000, 1:2000 e 1:1000 respectivamente.

2.7.3 Imunolocalização por imunofluorescência indireta (IFI)

Parasitas nas diversas fases do ciclo celular: epimastigotas; tripomastigotas metacíclicos; amastigotas; epimastigotas intracelulares e tripomastigotas, na quantidade de 5×10^6 células em 2 mL foram centrifugados à $3000 \times g$ por 5 minutos, à 4°C e lavadas duas vezes com PBS modificado por Voorheis (vPBS; 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 16 mM

Na_2HPO_4 , 3 mM KH_2PO_4 , 46 mM sacarose, 10 mM glucose, pH 7.6). Por fim, as células foram ressuspensas em 200 μl de vPBS e distribuídas na lâmina (50 μl por poço) e fixadas com p-formaldeído 2% por 20 minutos. As células foram novamente lavadas com vPBS, permeabilizadas com Triton-0,05% por 5 minutos e bloqueadas com vPBS-Soro Fetal Bovino 20% durante 30 minutos.

Posteriormente, as lâminas foram incubadas com anticorpo comercial α -GS (1:100) por 1 hora e 30 minutos. Após, as lâminas foram lavadas com vPBS e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) na diluição de 1:2500 por 45 minutos à 25 °C. Depois de realizadas mais duas lavagens, foi adicionado às lâminas o corante de DNA total Hoechst 33258 (1:2000), por um minuto. Finalmente, as lâminas foram montadas com Fluomount G. As preparações foram analisadas em microscópio confocal Carl Zeiss Meta System (modelo LSM 510 NLO) (Thornwood, NY, USA). Foram usadas para o FITC os comprimentos de excitação de 490 nm e de emissão 525 nm, para a detecção do Hoechst 33258, 346 nm de excitação e de emissão 460 nm. O software ImageJ para Windows foi utilizado para análises das imagens.

2.8 Determinação da conformação oligomérica da TcGS

2.8.1 Cromatografia de exclusão por massa molecular ou Gel Filtração (SEC)

A fim de determinar o tamanho da proteína em seu estado nativo foi usado o método de SEC em uma coluna de Sephadex 200 (16 por 60 cm). Este baseia-se na capacidade de adesão que esferas de polissacarídeos ligados (dextran com epiclolorohidrina) semipermeáveis, conferem às proteínas. Um fluxo de tampão é necessário para que ocorra a separação da proteína relacionada ao tempo, sendo que frações de 2 mL do tampão são coletadas.

O princípio é que moléculas menores terão sua difusão dificultada pela adsorção às esferas, enquanto que as maiores serão excluídas da coluna e eluídas no início do fluxo de tampão, separando-as, portanto, segundo seu tamanho. Para calibrar a técnica, foi corrido um conjunto de proteínas com massa molecular pré-determinada e detectado em qual fração cada proteína era eluída. Foi utilizado o tampão KH_2PO_4 com 200 mM de KCl. O sal reduz a possibilidade de formação de interações inespecíficas e a formação de aglomerados protéicos que incrementam erro ao resultado.

Logo após as frações coletadas foram avaliadas quanto a presença de proteínas pelo método de Bradford (47). Após essa análise as frações foram imobilizadas em uma membrana

de nitrocelulose e utilizadas em um *Dot blot* com o anticorpo Anti-GS . Essas frações foram utilizadas para ensaio de ELISA utilizando o mesmo anticorpo, imobilizando a proteína em placas de poliestireno como descrito com mais detalhe em 2.8.2. Além disso, uma faixa de frações foi utilizadas em ensaios de atividade enzimática, a fim de demonstrar qual fração apresentava a maior atividade e por consequência qual o estado oligomérico mais ativo da TcGS.

2.8.2 Imunoensaio enzimático (ELISA)

Nesse ensaio utilizou-se s frações obtidas do ensaio de SEC descrito em 2.8.1. Foram adicionados 50 µL de cada fração em uma placa de 96 poços de poliestireno e esta incubada por dois dias a 4 °C a fim de imobilizar a proteína recombinante TcGS na placa. Após esse período adicionou-se 100 µL da solução de PBS 1X suplementado com leite desnatado 5% por 1 hora a 4 °C. Este passo permite que sejam bloqueadas ligações inespecíficas nos espaços não preenchidos com a proteína. Posteriormente foram incubados 100 µL por poço de anticorpo primário α-GS na diluição 1:2500 em solução de PBS 1X suplementado com leite desnatado 1%; essa incubação ocorreu em 1 hora a 4 °C sem agitação. O próximo passo foi realizar 3 lavagens consecutivas com PBS 1X-tween20 0,01%. Foram adicionados 100 µl da solução de cor (1 µM H₂O₂ + 1 µM TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) e a placa incubada 10 minutos na ausência de luz. A reação foi parada com 50 µ de solução 0,16 M de ácido sulfúrico

2.9 Perfil de expressão protéica de TcGS

2.9.1 Extratos protéicos de *T. cruzi*

Os extratos protéicos foram obtidos de células em fase exponencial de crescimento (5×10^7 de células/mL). As células foram lavadas três vezes por centrifugação com PBS e homogeneizadas em TSB. Os parasitas foram lisados por sonicação com de 5 ciclos de 30 segundos e intervalos de descanso em gelo de 30 segundos entre os ciclos. Após centrifugação a 12.000 x g por 30 minutos os sobrenadantes contendo os extratos protéicos foram empregados nos ensaios de atividade enzimática e *western blotting*. A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo clássico método de Bradford (48), utilizando-se uma

solução de BSA (albumina bovina sérica) como padrão para a construção de curvas de calibração.

2.9.2 Western Blotting

Os extratos protéicos foram obtidos como descrito no item 2.5. As proteínas, separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE), foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Supported Nitrocellulose Membrane, Bio-Rad) utilizando o sistema Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) (49). Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S (0,1% diluído em ácido acético 10%) e descoradas em água corrente, possibilitando a avaliação da eficiência da transferência. As membranas foram bloqueadas por 2 horas com PBS-Tween20 0,3% (PBS-T) suplementado com 5% de leite desnatado. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário – α -GS (1:1000) agitando gentilmente por 1 hora e 30 minutos à 4 °C e depois lavadas três vezes por 5 minutos com PBS-T. Após, realizou-se a incubação durante 45 minutos com o anticorpo secundário, conjugado a enzima HRP (1:2.500) (*horseradish peroxidase*-GE Healthcare), seguido de lavagens como descrito acima. Procedeu-se então a revelação por quimiluminescência utilizando o reagente SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, de acordo com o manual do fabricante.

2.10 Efeito de análogos de L-glutamato sobre a glutamina sintetase e o *T. cruzi*

2.10.1 Análogos utilizados

Foram utilizados nesse estudo dois diferentes análogos de L-glutamato: L-metionina sulfoximina (MS - CID 16118) e 5-hidroxisina (HYL - CID 1029). Estes compostos foram selecionados por serem propostos como inibidores da glutamina sintetase de *Micobacterium tuberculosis* e por, no caso da MS, demonstrar aumento da sobrevivência de camundongos com insuficiência hepática aguda, além de diminuir os efeitos da encefalopatia hiperamoniêmica no mesmo modelo experimental. (50-53)

2.10.2 Inibição da atividade de TcGS

Foram verificados os efeitos dos análogos MS e HYL na atividade de GS tanto em extratos de epimastigotas como na enzima recombinante TcGS. Para isso foram realizadas três metodologias: **(i)** Foram utilizados parasitas na fase epimastigota em fase exponencial de crescimento (5 a 6×10^7 parasitas.mL⁻¹). Estes foram tratados com concentrações diferentes de droga e parasitas não tratados foram utilizados como controle negativo. Posteriormente foi verificada a influência dessa aplicação em extrato total de parasita; **(ii)** Foi realizado extrato total de epimastigotas como descrito em 2.5. Este extrato foi incubado a 28 °C na presença de diferentes concentrações dos compostos antes das medições de atividade a fim de avaliar a influência especificamente na via correspondente à GS. **(iii)** A enzima TcGS purificada como descrito em foi utilizada em ensaio de atividade, porém em cada reação de atividade foi adicionada uma concentração de composto diferente, possibilitando avaliar a influência estritamente sobre a enzima em questão.

2.10.3 Constante de inibição

A K_i ou constante de inibição é usualmente calculada para se obter informações sobre a inibição enzimática. Essa constante está relacionada com a afinidade do inibidor pela enzima e pode ser definida como a concentração de inibidor que reduz a K_m pela metade. A metodologia para o cálculo da constante consiste em reestabelecer os parâmetros cinéticos da reação na presença de diferentes concentrações do inibidor em questão. Os valores resultantes V_{max} são divididos pelos de K_m 's aparentes e o resultado é analisado em função da concentração do inibidor e ajustado a uma função linear. O valor de intersecção no eixo X corresponde a $-K_i$ (54).

2.10.4 Inibição do crescimento de epimastigotas de *T. cruzi*

Foram utilizados parasitas na fase epimastigota em fase exponencial de crescimento (5 a 6×10^7 parasitas.mL⁻¹). Estes foram tratados com concentrações diferentes de droga, parasitas não tratados foram utilizados como controle negativo e como controle positivo de inibição os parasitas foram tratados com rotenona (60 µM) e antimicina (0,5 µM). À uma concentração de $2,5 \cdot 10^6$ parasitas x mL⁻¹, os parasitas foram transferidos para placas de cultura de 96 poços. A placa foi incubada à 28 °C e a proliferação dos parasitas foi

acompanhada durante 8 dias com leituras diárias de absorbância a 620 nm. Os valores de absorbância foram convertidos à densidade de parasitas (parasitas.mL⁻¹) utilizando como padrão concentrações crescentes de parasita ajustadas a uma regressão linear. Cada composto foi avaliado em quadruplicata em cada experimento e os resultados apresentados foram obtidos de pelo menos três ensaios independentes. Para cada ensaio foi realizada uma curva de calibração.

2.10.5 Efeito da Metionina Sulfoximina no ciclo intracelular de *T. cruzi*

A fim de se avaliar o efeito da MS no parasita durante seu ciclo intracelular, formas tripomastigotas de cultivo foram utilizadas para infectar células CHO-K₁. 5 x 10⁴ destas células por poço foram mantidas em placas de 24 poços em meio RPMI suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) a 37 °C. Após 24 horas de incubação as células estavam aderidas à placa sendo possível infectá-las com formas tripomastigotas (2,5 x 10⁶ por poço) e tratá-las com diferentes concentrações do composto.

Os parasitas ficaram em contato com as células por um período de 4 horas. Após esse período, os parasitas ainda presentes no sobrenadante e que, portanto, não infectaram as células, foram removidos juntamente com o meio de cultura ocorrendo logo em seguida uma lavagem com PBS 1X. As células infectadas foram lavadas duas vezes com PBS e foi adicionado meio RPMI suplementado com 10% de SFB. A placa foi mantida a 37 °C por 16 horas e, após isso, o meio foi trocado para RPMI suplementado com 2% de SFB, seguido de uma diminuição da temperatura para 33 °C. No quinto dia de incubação os tripomastigotas liberados pelas células presentes no sobrenadante foram contados em câmara de Neubauer. O valor de IC₅₀ foi determinado pelo ajuste dos dados em uma equação sigmoidal dose-resposta. É importante salientar que toxicidade de MS em células de mamífero foi avaliada em trabalho prévio (33), que afirmou não-toxicidade em linhagem celular CHO-K₁ até a concentração de 10 mM.

3 RESULTADOS

3.1 Análises in silico e clonagem da *TcGS*

No banco de dados do Sanger Center (www.genedb.org), foram encontrados dois genes putativos que codificam para a GS de *T. cruzi*, com os seguintes números sistemáticos TcCLB.503405.10 e TcCLB.508175.370. A presença de domínios ou motivos protéicos putativos foi analisada na base de dados Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). Esta análise resultou na detecção de dois domínios característicos de GS: Gln-synt_N e Gln-synt_C (Figura 6). Foi realizado também um alinhamento de aminoácidos e observou-se que tais sequências diferiam, principalmente, em sua porção N-terminal (Figura 7). Foi verificado posteriormente que, havia a predição de domínios transmembranares em ambas as sequências em um trecho de aproximadamente 40 aminoácidos na porção N-terminal. Optamos por amplificar a região em comum às duas sequências disponíveis nos bancos de dados, preservando os domínios característicos da enzima, porém excluindo os domínios preditos transmembrana, a fim de facilitar a futura expressão e purificação recombinante. Finalmente, a sequência de nucleotídeos do gene obtido, que daqui em diante denominaremos *TcGS*, possui uma fase de aberta de leitura de 1043 bases e codifica uma sequência de 381 aminoácidos com massa molecular predita de aproximadamente 42,8 kDa.

TcGS ainda pode ser relacionada a sequências de outros eucariotas. A sequência de aminoácidos apresenta 40,648% de identidade com a sequência humana e se mostrou bastante conservada em relação a sequências de GS de outros tripanossomatídeos (Figura 8 e 9). Vale ressaltar que até o presente momento nenhuma glutamina sintetase foi estudada nesses organismos.

Figura 6 - Predição de domínios conservados na sequência *TcGS*

A busca por domínios conservados foi realizada na base de dados *Interproscan* com a sequência sem a região transmembrana (*TcGS*) utilizando os parâmetros padrão. Os códigos de acesso dos domínios nas bases de dados Pfam, GENE3D, Prosite, Panther e Superfamily estão mostrados à esquerda da figura. Não foram preditos domínios transmembrana ou peptídeo sinal pelos algoritmos de *Signalp* e *TMHMM*.

Figura 7 - Alinhamentos das sequências de aminoácidos correspondente a glutamina sintetase no genoma de *T. cruzi*

Alinhamento das duas sequências de aminoácidos anotadas como glutamina sintetase de *T. cruzi* (TcGSa e TcGSb) com a sequência utilizada nesse trabalho (TcGS) . Os destaques em verde e azul, correspondem respectivamente aos domínios Gln-synt_N (beta-Grasp) e Gln-synt_C (domínio catalítico) de acordo com o banco de dados Pfam.

Figura 8 – Filogenia de sequências protéicas de glutamina sintetase

A filogenia apresentada foi inferida utilizando as sequências protéicas de GS de diferentes eucariotos obtidas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Destacam-se três clados – (i) em azul, organismos do gênero *Trypanosoma*: *Trypanosoma cruzi* Cepa CL Brener (**TrCru_GSA e TrCru_GSB**); *Trypanosoma cruzi* cepa Sylvio (**TrCruPGLU**); *Trypanosoma vivax* (**TrVivPGLU**); *Trypanosoma congolense* (**TrConGLU**); *Trypanosoma brucei* TREU 27 (**TrBru**); *Trypanosoma brucei* gambiense DAL972 (**TrBruGamGLU**) – (ii) Em destaque amarelo gênero *Leishmania*: *Leishmania brasiliensis* (**LeBraPGLU**); *Leishmania mexicana* (**LeMexGS1 e LeMexGS2**); *Leishmania major* (**LeMajPGLU1**); *Leishmania infantum* (**LeInfPGLU e LeInfPGLU_1**) – (iii) Em vermelho diversos eucariotas de referência: *Drosophila melanogaster* (**DrMelGLNA1_DROME**); *Danio rerio* (**DaRerQ08CT3_DANRE**); *Gallus gallus* (**GaGalGLNA_CHICK**); *Homo sapiens* (**HoSapA1L199**); *Mus musculus* (**MuMusGLNA_MOUSE**); *Rattus norvegicus* (**RaNorGLNA_RAT**); *Arabidopsis thaliana* **ArThaC0Z2C2_ARATH**; *Saccharomyces cerevisiae* (**SaCer**); *Aspergillus niger* (**AsNigA2R2P3_ASPNC**); *Dictyostelium discoideum* (**DisDisGLNA1**). A árvore foi enraizada no ancestral comum de fungos representado pela espécie *Dictyostelium discoideum* e *Aspergillus niger*, por serem grupos externos.

Figura 9 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da *TcGS* com seus ortólogos em tripanossomatídeos

Alinhamento das sequências de aminoácidos preditas como glutamina sintetase em tripanossomatídeos. Os destaques em verde e azul, correspondem respectivamente aos domínios beta-Grasp e domínio catalítico de acordo com o banco de dados Pfam.

A partir da sequência do gene identificado, foram desenhados oligonucleotídeos específicos. Através da técnica de PCR, utilizando DNA genômico de *T. cruzi* (cepa CL, clone 14) como molde, a sequência foi amplificada. Inicialmente foi determinada a temperatura de anelamento ótima para o par de iniciadores, obtendo a temperatura de 60°C a qual gerou, após corrida em eletroforese em gel de agarose, uma banda única de aproximadamente 1100 pb correspondente ao tamanho esperado para esse amplificado. O produto de PCR foi purificado a partir da mistura de reação, e clonado em vetor linear do tipo T: pGEM-T Easy (Promega®). Posteriormente o fragmento de DNA foi subclonado por corte e ligação no vetor de expressão pET28a utilizando as enzimas de restrição adequadas (Figura 10). Esta construção, por sua vez, foi utilizada para a transformação de bactérias *E. coli* cepa DH5 α . Através de PCR de colônias, pôde-se selecionar as cepas positivas em para a presença do DNA heterólogo foi escolhido. Os plasmídeos presentes nessas bactérias foram isolados, analisados por sequenciamento e utilizando enzimas de restrição adequadas, foram obtidos os padrões de digestão esperados (Figura 10).

Figura 10 - Clonagem da sequência correspondente a *TcGS* em vetor pET28a.

(a) Marcador de massa molecular; (b) pET28*TcGS*; (c) pET28*TcGS* + *Bam*HI; (d) pET28*TcGS* + *Bam*HI e *Xho*I; (e) Marcador de massa molecular; (f) PCR utilizando DNAg de *T. cruzi* cepa CL 14 como molde; (g) PCR utilizando a construção pET28 *TcGS* como molde. Na amplificação foi utilizada Taq DNA polimerase e os oligonucleotídeos específicos para a sequência *TcGS*.

3.2 A enzima TcGS é um multímero

3.2.1 Expressão recombinante

Diferentes condições de expressão e purificação da TcGS foram testadas, porém somente quando esta foi expressa associada a uma cauda de seis histidinas em seu extremo N-terminal (TcGS-6xHis), em cepa de *E. coli* BL21-códon plus que obteve-se um rendimento satisfatório. Contudo, com níveis de expressão solúvel maior, foi estabelecida a temperatura de 16°C, tempo de indução de 24h, concentração de IPTG 0,25 mM e a adição de 100 µM dos substratos da reação da GS (L-glutamato, ATP e NH₃) como parâmetros ideais de expressão (Figura 11).

Figura 11 – Influência da temperatura na expressão da TcGS e resultado da purificação em sistema de afinidade.

(A) Eletroforese em gel SDS-PAGE 10% dos sobrenadantes das culturas de onde se variou a temperatura de incubação, mostrando a influência da variação deste fator na eficiência da expressão solúvel da enzima *TcGS*: em (a) marcador de massa molecular; (b) 16 °C; (c) 17 °C; (d) 18 °C; (e) 19 °C; (f) 20 °C; (g) 25 °C; (h) 30 °C; (i) 37 °C. A cultura foi induzida com IPTG 0,25 mM em vetor pET28a;e adicionado L-glutamato, ATP e NH_4Cl 100 μM na cultura no momento da indução. (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% mostrando o perfil de purificação de *TcGS* expressa no vetor pET28a após 24h de indução a 16 °C. (a) Marcador de massa molecular; (b) Sobrenadante de cultura - Fração solúvel; (c) Fração solúvel após passagem em coluna de Ni-Agarose; Frações de lavagem da coluna Ni-Agarose com solução de (d) 5 mM de Imidazol; (e) 10 mM; (f) 25 mM; (g) 60 mM; (h até l) Eluições utilizando solução de 500 mM de Imidazol; (m) Concentração das eluições anteriores em coluna de celulose Amicon® Ultra-4 50K.(C) Ensaio de *western blotting* com o anticorpo anti-His tag utilizando a proteína recombinante como alvo. Verificou-se a marcação de uma banda única com tamanho próximo ao esperado (42 kDa) nas eluições E3, E4 e E5 (a, b e c respectivamente), as mesmas eluições mostradas em (B).

3.2.2 Estado oligomérico

Com a proteína expressa e purificada, pôde-se avaliar seu estado oligomérico, inicialmente utilizando eletroforese não desnaturante, foi verificado que a proteína possui uma massa molecular entre 242 e 480 kDa (Figura 12). Visto que cada subunidade catalítica possui aproximadamente 42 kDa este ensaio revela que a enzima é um multímero.

Figura 12 – Eletroforese não-desnaturante em gel de poliacrilamida.

Eletroforese em gel SDS-PAGE 10% utilizando a enzima *TcGS* após a purificação em coluna de Ni-Agarose. **M(kDa)**: Marcador de massa molecular. **TcGS**: Enzima recombinante.

Além disso, utilizando a técnica de cromatografia de exclusão por massa molecular, foi observado na fração 32 era eluída uma maior quantidade de *TcGS* e que também nessa fração a proteína era mais ativa (Figura 13). Com base na calibração da coluna, estipulou-se que quando eluída nessa fração a enzima apresenta uma massa molecular de 320 kDa, fato que acrescenta informação ao resultado obtido com a eletroforese não desnaturante. Com isso, infere-se que o estado oligomérico mais favorável para a *TcGS* é o octamérico.

Figura 13 – Cromatograma da *TcGS*

(A) Utilizando cromatografia de exclusão por massa molecular, foram coletadas frações de 2 mL. Essas frações foram usadas para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford (47), para a identificação e quantificação específica da enzima *TcGS* pela técnica de ELISA descrita em 2.8.2 e para a determinação da atividade específica de glutamina sintetase como descrito em 2.6.1. **(B)** Representação gráfica da calibração do experimento que fornece a massamolecular da proteína segundo a fração em que é eluída.

3.4 Caracterização enzimática da TcGS

TcGSr foi utilizada para a determinação dos parâmetros cinéticos os quais foram comparados com os obtidos de extratos totais de epimastigotas. Utilizando também TcGSr foram comparadas duas metodologias para medição de atividade (EEA e EVM). A compilação de todos os parâmetros obtidos neste trabalho está representada na tabela no fim deste capítulo (Tabela 1).

3.4.1 A reação catalizada pela TcGS utiliza três substratos

A glutamina sintetase é uma enzima que utiliza três substratos em uma reação de dois passos (55, 56), nos quais ocorrem uma fosforilação com gasto de ATP e a adição de um grupamento amina ao substrato carbonado, incorporando, portanto, NH_4^+ ao glutamato.

Com a variação da concentração dos substratos da reação (L-glutamato, ATP e NH_4^+) foram estabelecidos individualmente os parâmetros V_{max} , K_m e K_{cat} . Para isso foi utilizado o ensaio descrito em 2.6. Após o estabelecimento destes parâmetros, foram fixadas nos próximos experimentos concentrações saturantes para os substratos (Figura 14).

Na tentativa de se avaliar a especificidade da enzima pelos substratos diferentes aminoácidos e também moléculas estruturalmente semelhantes ao L-glutamato foram substituídos no ensaio de atividade EVM (Figura 15). mas não se pode concluir que a enzima utiliza esses análogos para a formação de produto glutamina, mas sim que consegue fosforilar essas moléculas e que podem inclusive ser exploradas como inibidores).

Figura 14 – Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática

Influência da variação da concentração dos substratos (A) L-glutamato, (B) ATP e (C) NH_4^+ na atividade de glutamina sintetase de extratos totais de *T. cruzi* (1); e da enzima recombinante *TcGS* (2). Os dados representados pelos símbolos sem preenchimento (Δ , $\circ$ e $\square$) foram obtidos utilizando a metodologia EVM enquanto que os representados pelos símbolos preenchidos ($\blacktriangle$, $\bullet$ e $\blacksquare$) pela metodologia em que se utilizam enzimas acopladas à reação (EEA). Os dados foram ajustados à clássica função hiperbólica de Michaelis-Menten e os valores estão representados na Tabela 1.

Figura 15 – Especificidade de substrato (L-glutamato)

A atividade da enzima *TcGS* recombinante foi medida na presença dos três íons divalentes os quais a enzima é dependente (Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Co^{2+}). Foram utilizadas concentrações saturantes para os outros dois substratos (NH_3 e ATP) e a concentração de 1 mM de cada um dos análogos de glutamato (A). Em (B) verifica-se o efeito na atividade causado pela substituição do substrato natural da enzima (L-glutamato) por outros aminoácidos.

3.4.2 A reação catalisada pela *TcGS* é dependente de íons divalentes

A enzima recombinante se mostrou mais ativa na presença de Mg^{2+} , além disso, se mostrou capaz de utilizar Mn^{2+} e Co^{2+} com menor eficiência tanto em extratos como na *TcGS* (Figur 16A). Foi verificado também que a reação não ocorre na ausência de íons divalentes, sendo a atividade marcadamente inibida por EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) de maneira dose dependente (Figura 16B e 16C). Também foi observado que o íon Ca^{2+} é capaz de inibir a atividade da enzima de maneira dose dependente (Figura 17) na presença de Mg^{2+} .

Figura 16 – Efeito de íons divalentes na atividade enzimática

A atividade da enzima *TcGS* recombinante (pelo método *EEA*) foi medida na presença de 1 mM de diferentes íons divalentes. Em **(A)** observa-se que somente Mg²⁺, Mn²⁺ e Co²⁺, foram capazes de manter a atividade enzimática utilizando a enzima recombinante e o extrato de epimastigotas. O íon divalente Zn²⁺ foi capaz de manter a atividade enzimática somente da enzima recombinante e com baixa eficiência. Foi constatado também que a atividade da *TcGS* só ocorre na presença de algum íon divalente e que concentrações crescentes de EDTA, molécula quelante de íons, inibem a atividade enzimática utilizando qualquer um dos três íons capazes de manter alguma atividade enzimática **(B)** e que os valores de inibição gerada pelo EDTA se apresentam em um padrão dose-resposta **(C)** com valores de IC₅₀ distintos para cada um dos íons testados: Mg²⁺ = 19,57 ± 0,03555; Mn²⁺ = 8,032 ± 0,05077; Co²⁺ = 4,201 ± 0,06678.

Figura 17 – Efeito do Ca^{2+} na atividade enzimática

(A) Efeito do cálcio na atividade da enzima *TcGS*, a qual é marcadamente inibida de maneira dose-dependente (B) com valor de $\text{IC}_{50} = 205,7 \pm 2,754$. A cada reação, foram adicionadas concentrações crescentes de CaCl_2 , na presença dos substratos da reação em concentração saturante e na presença de 1 mM de MgCl_2 .

3.4.3 pH ótimo, influência da temperatura na atividade e cálculo da E_a

O efeito do pH na reação catalisada pela *TcGS* mostrou que a enzima é mais ativa em pH 8 com tampão Imidazol HCl 100 mM (Figura 18). Esse resultado foi observado especialmente utilizando a enzima recombinante e o protocolo *EVM*, visto que esta metodologia de atividade enzimática não se utiliza de enzimas acopladas à reação. Uma vez que o pH ótimo para uma enzima é a condição relativa ao número de grupos ionizáveis apresentados pela mesma e seus substratos, as enzimas acopladas que são utilizadas no protocolo *EEA* sofreriam interferência na sua eficiência. Do mesmo modo, a influência de um gradiente de temperatura na atividade da reação em saturação de substratos, foi mais bem avaliada na metodologia *EVM* já que a temperatura pode interferir na conformação das enzimas acopladas, utilizadas no outro protocolo. A enzima *TcGS* apresentou um acréscimo linear de atividade a medida em que a temperatura era elevada, sendo portanto dependente da desse fator. Não foi observada desnaturação térmica até a temperatura de 65 °C (Figura 19A).

Pôde-se então calcular a energia de ativação (E_a) da enzima, que é a necessária para que a o(s) substrato(s) ultrapasse(em) os limites de velocidade impostos pelo estado de transição. O gráfico de Arrhenius resultante para esses valores de temperatura ajustaram utilizando ambos protocolos de atividade, com valores similares ($EEA = 1,304 \pm 0,1044$

KJ.mol^{-1} ; $EVM = 1,517 \pm 0,0680 \text{ KJ.mol}^{-1}$), mas utilizando *EEA* só foi possível a o cálculo com a função de Ahrrenius até a temperatura de 37°C (Figura 19B). A hidrólise do ATP

Figura 18 – Efeito do pH na atividade enzimática

O gráfico apresentado representa os valores de atividade alterando-se o potencial hidrogeniônico da solução de reação. Foram utilizados três tampões diferentes para alterar o pH das reações: (1) Tampão MES 100 mM; (2) Tampão Imidazol HCl 100 mM e (3) Tris HCl 100 mM. Em ($\blacktriangle$) foi utilizada a enzima recombinante *TcGS* e o protocolo de atividade *EVM*. Em ($\blacksquare$) observa-se a alteração no padrão de atividade da enzima recombinante em função do pH quando foi utilizada a metodologia de atividade *EEA* que utiliza de enzimas acopladas à reação e foi a metodologia de escolha para a determinação de parâmetros cinéticos como V_{max} , K_m e K_{cat} . Curiosamente utilizando extratos totais de epimastigotas e o protocolo *EEA*, em ($\bullet$), observou-se um padrão semelhante ao verificado em ($\blacktriangle$) porém os desvios desse experimento foram altos. Ao fim concluiu-se que ao se quantificar diretamente um dos produtos da reação (P_i) em protocolo de atividade, evita-se o uso de enzimas acopladas à reação que podem ser sensíveis a variações de pH e que o pH ótimo da reação é 8,0.

Figura 19 – Efeito da temperatura na atividade enzimática

O gráfico A representa os valores de atividade alterando-se a temperatura de incubação da reação de atividade. Foi fixado o pH 7,1 utilizando tampão Imidazol HCl 100 mM. Foi utilizada para essa avaliação a enzima recombinante TcGS. O protocolo de atividade que necessita de enzimas acopladas à reação (■) e o que quantifica o P_i (▲) foram utilizados. Em B todos os dados foram ajustados à função linear cuja inclinação corresponde à energia de ativação (E_a). Os gráficos de Arrhenius obtidos revelam valores de E_a semelhantes (■ = $1,304 \pm 0,1044$; ▲ = $1,517 \pm 0,0680$), porém em ■ nem todos os dados obtidos do experimento ajustavam à função de Arrhenius.

Tabela 1 – Compilação dos parâmetros cinéticos da glutamina sintetase de *T. cruzi*

	Substrato	V_{max} ¹	K_m ²	K_{cat} ³	K_{cat}/K_m ⁴	E_a ⁵	pH ótimo
Enzima recombinante (Método EEA)	L-glu	0,9766	441,8	391,9	$8,9 \times 10^5$	1,517	n.a.
	ATP	0,9872	375,7	396,1	$10,5 \times 10^5$		
	NH ₄ ⁺	1,33	789	535	$6,8 \times 10^5$		
Enzima recombinante (Método EVM)	L-glu	0,9059	413,5	356,7	$8,6 \times 10^5$	1,304	8,0
	ATP	0,9108	386,7	358,6	$9,3 \times 10^5$		
	NH ₄ ⁺	1,22	778,3	480,3	$6,2 \times 10^5$		
Extrato de epimastigotas (Método EEA)	L-glu	1,061	318,6	n.a.	n.a.	n.a.	8,0
	ATP	2,163	203,2	n.a.			
	NH ₄ ⁺	1,542	698	n.a.			

A tabela acima compila todos os parâmetros cinéticos da glutamina sintetase em *Trypanosoma cruzi* sendo portanto o painel geral de caracterização bioquímica desta enzima.

¹ AE (μmol de NAD⁺.min⁻¹.mg⁻¹ ou nM de P_i.min⁻¹.mg⁻¹)

² μM

³ s⁻¹

⁴ M⁻¹.s⁻¹

⁵ KJ.mol⁻¹

n.a.: Não aplicável

3.5 Análise da expressão e atividade da TcGS ao longo do ciclo de vida do *T. cruzi*

Um dos objetivos desse trabalho foi analisar qual fase do ciclo de vida de *T. cruzi* a enzima TcGS está mais expressa e ativa. Pouco se sabe sobre a participação da glutamina em processos ao longo do ciclo *T. cruzi*, porém sabe-se da necessidade de adição de glutamato, substrato da enzima TcGS em culturas de ensaios de metaciclogênese. A quantificação do mRNA da enzima GS foi realizada por RT-PCR quantitativo (RT-PCRq). Observou-se que o perfil de expressão gênica da enzima varia pouco ao longo do ciclo de vida de *T. cruzi* com excessão da fase amastigota que possui a maior quantidade de mRNA (Figura 20A). As demais formas do possuem um padrão de transcrição similar. Quando foi analisado o nível protéico da TcGS por *western blotting* observou-se que a banda que corresponde ao peso molecular esperado para TcGS foi detectada também com maior intensidade na forma amastigota (Figura 20C), resultado melhor visualizada quando realizada densitometria de bandas (Figura 20D). Como sistema de normalização, foi utilizado um anticorpo contra a proteína GAPDH, como previamente descrito (44). O perfil apresentado no *western blotting* é compatível com o observado pela quantificação do mRNA revelado pelo RT-PCR quantitativo. Ao mesmo modo a atividade de glutamina sintetase foi mais elevada em extratos da forma amastigota, seguida da forma tripomastigota metacíclica (Figura 20B), levando à conclusão de que a forma amastigota é mais dependente da enzima GS.

Figura 20 – Níveis de expressão gênica, expressão protéica e atividade enzimática da *TcGS*.

(A) Quantificação dos transcritos relativos ao gene *TcGS* nos distintos estágios do *T. cruzi*. A determinação do mRNA ocorreu pela técnica de qRT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para um fragmento do gene de interesse. O gene *TcGAPDH* foi utilizado como normalizador (*in-house keeping*). A razão de expressão foi calculada em função do estágio epimastigota utilizando o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, cujo valor por definição é 1. O cDNA de células CHO-K₁ foi utilizado como controle negativo visto que esta linhagem é utilizada para a obtenção das formas intracelulares de *Trypanosoma cruzi*. A diferença entre os perfis de expressão foi avaliada através do teste de ANOVA-uma via (valor $p < 0,05$). Em **(B)** a atividade específica à *TcGS* também foi avaliada nos distintos estágios do *T. cruzi*. A medição da atividade enzimática foi realizada como descrito previamente para extratos de parasita. **(C)** Ensaio de *western blotting* realizado com extratos protéicos das fases do ciclo de *T. cruzi*. Os extratos foram resolvidos em gel de poliacrilamida desnaturante (10% Acrilamida), transferidas à uma membrana de nitrocelulose e incubadas com o anticorpo anti-Glutamine Synthetase (Sigma-Aldrich®) na diluição de 1:1000, que reconhece uma banda de 42 kDa. Após sucessivas lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho (a) (Sigma-Aldrich®) na diluição de 1:1000 e reveladas por quimioluminescência. Após a revelação as membranas passaram por um processo de *stripping* adicionando-se NaOH 0,2M. Após duas lavagens com PBS 1X foi realizado o mesmo processo de incubação descrito anteriormente, porém alterando-se o anticorpo primário para Anti-GAPDH (b) (Sigma-Aldrich®). (1) Epimastigota; (2) Amastigota; (3) Tripomastigota; (4) Epimastigota Intracelular/Epi-like; (5) Tripomastigota metacíclico; (6) CHO-K₁. Em **(D)** realizada também a densitometria das bandas visualizadas em (C).

3.6 Localização subcelular da TcGS

Como já relatado através de análises da sequência de aminoácidos, não houve consenso em relação à predição de localização subcelular em preditores *online*.

Para validar a distribuição subcelular da enzima GS em *T. cruzi* foi realizado um ensaio de permeabilização seletiva de epimastigotas com digitonina. Este ensaio baseia-se no fato de que diferentes conteúdos de esteróis das membranas celulares fazem estas sensíveis a diferentes concentrações de digitonina. A digitonina é um esterol glicosilado que se liga a 3- β -hidroxiesteróis não esterificados (predominantemente o colesterol) para formar o complexo digitonina-esterol. Esse complexo produz alterações na membrana plasmática tornando-a permeável. Assim, essa membrana, com alto conteúdo de esteróis é especificamente permeabilizada a baixas concentrações do detergente digitonina. O perfil exposição da atividade da GS foi comparado com três marcadores enzimáticos: (i) a enzima piruvato quinase (PK), (ii) hexoquinase (HK), (iii) citrato sintase (Figura 21). As enzimas PK e HK são enzimas envolvidas no metabolismo de glicose, porém a PK localiza-se no citoplasma e a HK no glicossomo (19, 57). A CS participa do ciclo do ácido cítrico presente portanto na matriz mitocondrial (58). Na concentração de digitonina 1,5 mg/mL, cerca de 90% de exposição da atividade do marcador citosólico (PK) foi obtido, nesta mesma condição cerca de 25% de atividade da GS foi medida. Contudo, na concentração de digitonina 2,5 mg/mL, os marcadores mitocondrial e glicossomal (HK) já começam a ser liberados e a atividade GS detectada (Figura 23 A).

Através de ensaios de microscopia de imunofluorescência, utilizando o anticorpo α -GS e também o marcador Hoechst 33258, foram observadas marcações correspondentes a TcGS em todos os estágios do ciclo de vida de *T. cruzi*. Essas marcações revelaram um perfil de localização citoplasmática (Figura 22). Como mencionado anteriormente, a especificidade do anticorpo α -GS foi avaliada por *western blotting* utilizando a enzima recombinante como alvo.

Figura 21 – Ensaio de permeabilização seletiva com digitonina

Foi realizada a permeabilização seletiva de 7×10^8 parasitas com concentrações crescentes de digitonina (0-5 mg.mL⁻¹). Após solubilização, os sobrenadantes (S) e precipitado (P) foram utilizados na medição de atividade das seguintes enzimas: ● piruvato quinase (citoplasmática – 2.7.1.40); ■ hexoquinase (glicossomal – 2.7.1.1); ▲ citrato sintase (mitocondrial – 4.1.3.7); ▼ glutamina sintetase (6.3.1.2). A concentração de proteína de cada amostra foi determinada pelo clássico método de Bradford. A porcentagem de atividade foi calculada com a

$$\text{seguinte fórmula: \% de Atividade} = \left[\frac{Atv_{sobrenadante}}{(Atv_{sobrenadante} - Atv_{precipitado})} \right] \times 100.$$

Figura 22 – Imunofluorescência com anticorpo α -GS

Parasitas (5×10^6 células mL^{-1}) das formas epimastigota (E), tripomastigota metacíclico (M), amastigota (A), epimastigota intracelular (Ei) e tripomastigota advindo de infecção em células CHO-K₁ (T), foram lavadas, aderidas a lâminas de vidro e fixadas com 3% de *p*-formaldeído (p/v) e permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 (v/v). Os parasitas foram bloqueados com PBS+2% FCS e incubados com o anticorpo α -GS (1:100). O próximo passo foi incubar as amostras com um anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à sonda *Alexa Fluor-488* (Invitrogen®) (a). O DNA foi marcado com a sonda *Hoechst 33258* (Invitrogen®) (1:2000), por 5 minutos (b). As diluições foram realizadas em solução tampão PBS + 2% FCS. A visualização das lâminas ocorreu em microscópio *Axio Imager motorized M.2* (Carl Zeiss®). A sobreposição (d) e edição das imagens foram realizadas no programa *ImageJ* v1.4p (NIH). As setas indicam as regiões que correspondem à co-localização entre as marcações (azul claro).

3.7 A Metionina Sulfoximina interfere na atividade da *TcGS* e no ciclo intracelular do *T. cruzi*

A glutamina sintetase de *T. cruzi* é marcadamente inibida por metionina sulfoximina de maneira dose-dependente (Figura 23). A presença de concentrações crescentes ainda gera uma condição em que se elevam os valores calculados dos parâmetros cinéticos relacionados ao L-glutamato. Especificamente, na presença MS os valores de K_m aparente, que se relacionam à afinidade ao substrato, se tornam maiores sem alterar significativamente a velocidade máxima da reação. Em vista disso conforma-se que esta molécula se liga ao sítio ativo responsável pela estabilização do glutamato, podendo assumir uma conformação similar ao do substrato em questão, evitando a formação do produto em uma inibição competitiva característica (Figura 24).

Figura 23 – Inibição da atividade enzimática

Tanto o extrato de epimastigotas (●) como a enzima recombinante *TcGS* (■) foram incubados com diferentes concentrações de MS durante 30 minutos. Após esse passo, foi medida a atividade específica e calculada a % de inibição dessa atividade em relação ao controle sem inibição. Os valores foram ajustados à uma curva dose-resposta e o IC_{50} obtido para ● foi de $38,85 \mu\text{M} \pm 0,07895$ e para ■ $20,72 \mu\text{M} \pm 0,07203$. Os dados apresentados correspondem à sobreposição de três ensaios independentes.

Figura 24 – Influência da concentração de MS nos parâmetros cinéticos K_m e V_{max}

Tanto o extrato de epimastigotas **(1)** como a enzima *TcGSr* **(2)** foram incubados com diferentes concentrações de Metionina Sulfoximina durante 30 minutos. Após esse passo, foi medida a atividade específica em diferentes concentrações de L-glutamato e os valores foram ajustados à função hiperbólica de Michaelis-Menten **(1A e 2A)**. A concentrações dos outros reagentes necessários para a atividade enzimática foram mantidas constantes. **B** e **C** demonstram as diferenças entre os parâmetros calculados, sendo que os valores de V_{max} aparentes não se alteram e ocorre aumento estatisticamente significativo (ANOVA $p < 0.05$) entre os valores de K_m aparente de extratos de epimastigotas **(1C)** e da enzima recombinante *TcGS*. Este fato afirma o mecanismo de inibição do composto MS como competitivo ao sítio de ligação do L-glutamato.

Inibidores competitivos interagem com a enzima formando um complexo enzima-inibidor (EI). A formação de EI em detrimento à formação do complexo enzima-substrato (ES) ocorre segundo a quantidade de inibidor disponível e da afinidade que ambos possuem pelo sítio ativo. A constante de inibição (K_i) está relacionada com a afinidade do inibidor pela enzima assim como a K_m pela afinidade do substrato. Neste trabalho metionina sulfoximina apresentou uma K_i de aproximadamente 4,6 μM e 3,9 μM quando avaliada com extratos totais de epimastigotas e *TcGSr* respectivamente. (Figura 25)

Figura 25 – Constante de inibição

Os valores de K_m e V_{max} aparentes foram relacionados com a concentração de inibidor (MS) fornecendo na interseção no eixo X, o valor de $-K_i$. Este parâmetro é definido como a concentração de inibidor necessária para reduzir 50% da K_m sem alterar a V_{max} , sendo portanto a constante relacionada à velocidade de formação de um complexo enzima-inibidor (EI) em detrimento ao complexo enzima-substrato (ES). A K_i foi estimada tanto em extrato de epimastigotas (●) como a enzima recombinante *TcGS* (■) com valores de 3,85 μM e 4,559 μM .

Como descrito previamente na literatura (33) e comprovado neste trabalho, MS não afeta a proliferação de epimastigotas até 1 mM (Figura 26) apresentando um efeito dependente da dose em concentrações mais elevadas com um valor de $\text{IC}_{50} = 17.0 \pm 0.3 \text{ mM}$.

Ao se pensar na reação da GS, nota-se sua capacidade de incorporar NH_4^+ , amplamente conhecido como molécula tóxica se em excesso nas células (59-61). Sabe-se também que a degradação de aminoácidos gera amônia (NH_3) como um dos seus produtos finais e que a forma epimastigota de *T. cruzi* alternar seu metabolismo, optando por glicose ou aminoácidos como fonte principal de carbono e energia. Este fato gera a hipótese de que esta forma esteja exposta a uma menor concentração de NH_3 que outras formas do ciclo, como a forma amastigota, mais dependentes do metabolismo de aminoácidos, e que portanto não seria tão dependente da *TcGS*.

Deste modo, buscou-se estabelecer uma condição em que a forma epimastigota estivesse exposta a um estresse de NH_3 (Figura 27), mas curiosamente a proliferação parasitária não se altera mesmo em concentrações altas de NH_4OH (até 50 mM).

Ainda assim, uma concentração de NH_4OH (10 mM), considerada alta foi utilizada como uma mantenedora de excesso de NH_3 extracelular e foi realizado o mesmo ensaio de proliferação parasitária na presença de MS (Figura 12). Nesta condição os parasitas se mostraram sensíveis ao composto, com IC_{50} de $475,8 \mu\text{M} \pm 6,016$, e que possivelmente

parasitas na presença de concentrações elevadas de NH_3 se tornam mais dependentes da $TcGS$.

Figura 26 – Proliferação de formas epimastigotas na presença de MS

Curva de proliferação de formas replicativas de *T. cruzi*. Os parasitas ($2,5 \times 10^6$ células $\times \text{mL}^{-1}$) foram cultivados somente em meio LIT (C-) e também em LIT acrescido de diferentes concentrações de MS (de 50 a 1000 μM dissolvido em PBS 1X). Como controle positivo, a mesma quantidade de parasitas foi cultivada em LIT acrescido de 10 μM de rotenona e 0,5 μM de antimicina A. A densidade celular foi monitorada diariamente através de leituras de absorvância ($\lambda_{620 \text{ nm}}$) em placas de 96 poços. A leitura de um número de parasitas conhecido e previamente contados em câmara de Neubauer foi utilizada como calibração.

Figura 27 – Proliferação de formas epimastigotas na presença de NH_4OH .

Curva de proliferação de formas replicativas de *T. cruzi*. Os parasitas ($2,5 \times 10^6$ células $\times \text{mL}^{-1}$) foram cultivados somente em meio LIT (C-) e também em LIT acrescido de diferentes concentrações de NH_4OH (de 50 a 1000 μM dissolvido em PBS 1X). Como controle positivo, a mesma quantidade de parasitas foi cultivada em LIT acrescido de 10 μM de rotenona e 0,5 μM de antimicina A. A densidade celular foi monitorada diariamente através de leituras de absorbância ($\lambda_{620 \text{ nm}}$) em placas de 96 poços. A leitura de um número de parasitas conhecido e previamente contados em câmara de Neubauer foi utilizada como calibração.

Figura 28 – Proliferação de formas epimastigotas na presença de 10 mM NH_4OH e de diferentes concentrações de MS.

(A) Curva de proliferação de formas replicativas de *T. cruzi*. Os parasitas ($2,5 \times 10^6$ células $\times \text{mL}^{-1}$) foram cultivados somente em meio LIT + NH_4OH 10 mM (C-) e também em LIT + NH_4OH 10 mM acrescido de diferentes concentrações de MS (de 10 a 50000 μM). Como controle positivo, a mesma quantidade de parasitas foi cultivada em LIT acrescido de 10 μM de rotenona e 0,5 μM de antimicina A. A densidade celular foi monitorada diariamente através de leituras de absorbância ($\lambda_{620 \text{ nm}}$) em placas de 96 poços. A leitura de um número de parasitas conhecido e previamente contados em câmara de Neubauer foi utilizada como calibração. Ao quinto dia de crescimento, foi calculada a porcentagem de inibição gerada pelo composto em relação ao controle negativo e os valores se mostraram dependentes da dose (B) com IC_{50} calculado no 5º dia de crescimento com valor de $475,8 \mu\text{M} \pm 6,016$.

Visto que epimastigotas se tornaram sensíveis ao composto em um excesso de NH_3 e que a *TcGS* estava mais transcrita, expressa e ativa na forma amastigota, o efeito de MS ao longo do ciclo celular foi avaliado. O composto mostrou-se eficaz na diminuição da eclosão de formas tripomastigotas a partir de células CHO-K₁ quando realizado tratamento após a invasão, ao longo do ciclo celular (Figura 13).

Figura 29 – Liberação de formas tripomastigotas de cultivo na presença de MS

(A) Efeito da MS no processo de eclosão de formas tripomastigotas a partir de células de mamífero (CHO-K₁). As células (5×10^4 células por poço) foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas em meio RPMI+SFB 10% a 37 °C em atmosfera controlada, com 5% de CO₂. Em seguida, os parasitas ($2,5 \times 10^5$ tripomastigotas por poço) foram colocados para infectar as células, por 4h. Após esse período ocorreu uma lavagem com PBS 1X, a fim de remover os parasitas que não infectaram e que poderiam alterar a sincronicidade da infecção. Foi então adicionado meio RPMI suplementado com 10% de SFB e a placa mantida 16h a 37°C e logo após o meio foi substituído por RPMI suplementado com 2% de SFB, seguido da redução da temperatura de incubação para 33 °C. No quinto dia pós-infecção os tripomastigotas eclodidos e presentes no sobrenadante foram contados em câmara de Neubauer. Foi então calculada a porcentagem de inibição em cada tratamento e este valor foi plotado *versus* o logaritmo da concentração de MS e a curva resultante mostrada em (B), foi ajustada à função sigmóide para o cálculo do IC₅₀ ($20,02 \mu\text{M} \pm 7,876$) utilizando o programa *GraphPad Prism* 5.0.

4 DISCUSSÃO

A L-glutamina é um aminoácido não essencial, sintetizado pela ação da glutamina sintetase, a qual ocorre em praticamente todos os organismos conhecidos, com pelo menos evidências no genoma. Esta enzima atua na conversão de glutamato em glutamina, consumindo NH_4^+ no processo, apresentando diferentes graus de relevância biológica, dependendo do organismo, da necessidade dos produtos, toxicidade de algum dos substratos e do local onde é expressa e/ou ativada. A presença de uma glutamina sintetase em *T. cruzi* foi previamente descrita (19, 33), por meio da investigação da atividade enzimática em extrato de parasitas e de um inibidor dessa enzima em epimastigotas sob estresse oxidativo.

4.1 Características da glutamina sintetase de *Trypanosoma cruzi*

Em procariotas e em alguns eucariotas existe uma rota de interconversão de glutamato em glutamina que é composta por três enzimas: (i) glutaminase; (ii) glutamato sintase; (iii) glutamina sintetase (62-64). Em *T. cruzi* somente a atividade de glutamina sintetase foi comprovada e não há predição para as outras duas enzimas exclusivamente envolvidas, sendo que esta via de interconversão, a princípio, não está completa. Apesar desse fato, sabe-se que glutamina estimula o consumo de O_2 o que pode relacionar o aminoácido ao metabolismo energético (22). Além disso, trabalhos relatam a sua participação como substrato inicial para a síntese de pirimidinas em tripanossomatídeos (65-68). Existe ainda a anotação de outros sistemas enzimáticos putativos que utilizam glutamina como substrato e geram glutamato.

Sabe-se que essa enzima utiliza o ATP para fosforilar preferencialmente o glutamato, mas também diferentes análogos estruturais e alguns aminoácidos com menos eficiência, provavelmente sem gerar glutamina. Isto faz com que muitos desses compostos possam ser explorados como inibidores da enzima (Figura 10).

Os valores de K_m e V_{max} estipulados para os três substratos da reação da reação foram comparáveis aos reportados para GS de outras espécies. Segundo o banco de dados UNIPROT, existem estudos bioquímicos da enzima GS em centenas de organismos diferentes. Além disso, a eficiência catalítica e os parâmetros cinéticos estabelecidos foram semelhantes para todos os protocolos utilizados nesse trabalho (Tabela 1).

A reação da TcGS é dependente da presença de íons divalente para ocorrer, preferencialmente Mg^{2+} . Porém, foi observado também que acontece em presença de Mn^{2+} e Co^{2+} (Figura 7) como reportado para outros organismos (69, 70). Acredita-se que estes íons

estabilizam a posição do ATP no sítio ativo, garantindo assim a interação dessa molécula com os resíduos necessários para o seu posicionamento, favorecendo a reação (71).

Conforme reportado (72), o íon Ca^{2+} , pode inibir a atividade da GS. Acredita-se que este metal compete com os reais íons cofatores, deslocando-os do sítio ativo, e portando reduzindo a atividade enzimática total. Esses fatos foram observados também para a *TcGS*, tendo resultado a sua inibição por CaCl_2 dose-dependente (Figura 13) com IC_{50} de 205,7 μM .

A glutamina sintetase de *T. cruzi* apresenta-se em maior abundância e mais ativa sob a conformação octamérica (Figura 8). A atividade enzimática da *TcGS* se mostrou dependente da temperatura da reação. Quando utilizada a metodologia *EEA*, o gráfico de Arrhenius ajustou a uma linha reta até a temperatura de 37 °C. A partir dessa temperatura a atividade enzimática diminuiu drasticamente. Não foi possível estabelecer se essa queda deveu-se à: 1. perda de atividade da *TcGS*, ou 2. perda de atividade das enzimas utilizadas para revelar a reação (LDH e PK de camundongo). Deve-se ressaltar que ambas as enzimas apresentam seu máximo de atividade a 37 °C. Quando utilizou-se um método alternativo, *EVM*, que não depende de enzimas acopladas para a detecção da reação, o gráfico de Arrhenius ajustou a uma linha reta até a temperatura de 60 °C, apontando para a segunda possibilidade. Apesar disso, os dois métodos puderam ser utilizados para determinar a E_a da reação, que resultaram em valores semelhantes ($EEA = 1,304 \text{ kcal mol}^{-1} \pm 0.1044$; $EVM = 1,517 \text{ kcal mol}^{-1} \pm 0.0680$). De maneira geral a *TcGS* se mostrou muito resistente a variações de temperatura, incrementando sua atividade proporcionalmente ao aumento da mesma.

A temperatura ótima para a enzima (60 °C) é bem maior do que as temperaturas enfrentadas por *T. cruzi* ao longo do seu ciclo de vida nos distintos hospedeiros (28, 33, 37 °C), porém este fato é comum para muitas enzimas visto que a probabilidade de colisão dos substratos com sítio ativo aumenta com o acréscimo da temperatura e, portanto favorece a velocidade da reação. O decaimento da atividade geralmente depende de um equilíbrio entre a probabilidade de encontro entre os substratos e o sítio ativo, e o processo de denaturação por temperatura.

De modo semelhante à temperatura, o pH ótimo foi avaliado utilizando os dois protocolos padronizados. Quando utilizada a metodologia *EEA* notou-se que o pH altera a eficiência da metodologia, tanto em extratos de epimastigotas como na *TcGSr*. Quando utilizada a metodologia *EVM* foi verificado que um pH levemente alcalino (pH = 8,0) favorece a atividade enzimática.

Em estágios intracelulares (A e Ei) a degradação de aminoácidos gera como um dos produtos finais amônia (NH_3), esta molécula, em meio aquoso, forma íons amônio (NH_4^+) e

OH^- , este último que em excesso no meio eleva o pH e portanto faz sentido que a *TcGS* (que utiliza NH_4^+ como substrato) esteja mais ativa nessas condições. Corroborando com esses dados foi verificado que tanto o perfil transcricional da enzima como a expressão protéica e atividade enzimática estão aumentadas na forma amastigota. Essa forma parece ser mais dependente da enzima GS a fim de detoxificar íons NH_4^+ . A forma transiente epimastigota intracelular, apesar de possuir quantidade significativa de *TcGS*, não apresentou atividade enzimática relevante. Sabe-se que *T. cruzi* não possui ciclo da Uréia funcional e as formas intracelulares não transportam glicose do meio (41) e se nessa forma GS está inativa por motivo ainda não conhecido, outros sistemas enzimáticos poderiam suprir a necessidade de detoxificar NH_4^+ . Em vista disso, outros estudos envolvendo metabolismo de nitrogênio em *T. cruzi* são necessários.

4.2 Influência de Metionina Sulfoximina na atividade de *TcGS* e no metabolismo e proliferação de *T. cruzi*

Sabendo da capacidade da enzima de utilizar NH_4^+ como substrato, espera-se que *T. cruzi* em condições normais de disponibilidade de nutrientes resista, em certo grau, a excessos extracelulares dessa molécula. De fato, epimastigotas se mostraram altamente resistentes a excessos extracelulares de NH_4^+ , não alterando sua proliferação até concentrações extracelulares de 50 mM. Nestas circunstâncias, presume-se que sejam mais solicitados sistemas enzimáticos que incorporem NH_4^+ , dentre eles GS e que a inibição dessa via reduziria a capacidade do parasita de proliferar. Neste trabalho a MS, se mostrou um eficiente inibidor da *TcGSr* e da atividade enzimática em extratos de epimastigotas, competindo com uma alta afinidade pelo sítio de ligação do L-glutamato assim como ocorre em outros organismos (63, 73, 74). Ademais, MS mostrou ter efeito na proliferação de epimastigotas somente quando esses parasitas foram expostos a um concentração extracelular de 10 mM de NH_4^+ . Esse fato chama atenção para a capacidade da GS de detoxificar NH_4^+ e que essa enzima está envolvida na capacidade de resistência dos epimastigotas a esse tipo de estresse.

Sabendo disso, concluiu-se que o inibidor afeta *T. cruzi* em situações em que o parasita enfrenta aumentos de NH_4^+ . Este fato que ocorre naturalmente nas formas intracelulares do parasita, que como dito no tópico anterior são altamente dependentes do metabolismo de aminoácidos. Além disso, ao longo do ciclo intracelular observa-se que as quantidades relativas de atividade da GS acompanham as de prolina intracelular (Figura 30), o que faz sentido já que GS poderia suprir a necessidade metabólica do parasita de incorporar

NH_4^+ gerada pela degradação de aminoácidos. Deste modo o tratamento com MS ao longo do ciclo intracelular poderia ser tão ou mais efetivo que seu tratamento em epimastigotas expostas a altas concentrações de NH_4^+ . Corroborando com essa hipótese, foi verificado que MS reduziu eficientemente a eclosão de tripomastigotas a partir de células CHO-K₁ infectadas. Visto que amastigotas, que são intracelulares, apresentam maiores quantidades de GS ativa, estas formas são possivelmente a mais dependente dessa via para detoxificar NH_4^+ e por consequência seja a mais afetada por MS, reduzindo a infecção.

Figura 30 – Relação da atividade de GS, prolina intracelular e transporte de prolina e glicose ao longo do ciclo intracelular.

Quantidades relativas, dadas em porcentagem, de: transporte de prolina (preto); transporte de glicose (verde); prolina intracelular (azul); atividade de GS (vermelho).

5 CONCLUSÃO

Diante do exposto concluímos que:

- O gene *TcGS* codifica para uma glutamina sintetase funcional.
- Os parâmetros cinéticos V_{max} , K_m , E_a e a dependência de pH ótimo e íons divalentes foram estabelecidos.
- O estado oligomérico mais abundante e ativo da *TcGS* é o octamérico.
- Até o momento a localização da enzima é citoplasmática, mas necessita estudos mais aprofundados.
- *TcGS* é mais transcrita, expressa e ativa na forma amastigota do parasita.
- MS é inibidor da *TcGS* e compete pelo sítio de ligação do L-glutamato.
- Formas epimastigotas de *T. cruzi* são altamente resistentes a estresses de amônio induzidos no ambiente extracelular.
- MS diminui a proliferação de formas epimastigotas somente sob excesso extracelular de NH_4^+ . Deste modo, o inibidor da GS torna as formas epimastigotas mais sensíveis a estresse de NH_4^+ e relaciona a enzima com a detoxificação dessa molécula.
- O tratamento com MS ao longo do ciclo celular reduz a eclosão de formas tripomastigotas de células CHO-K₁ o que ressalta a importância da enzima GS no metabolismo de nitrogênio e estabelecimento do ciclo de vida de *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS*

1. Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. The Lancet. 2010 17 abr. 2010;375(9723):1388-402.
2. Almeida-de-Faria M, Freymuller E, Colli W, Alves MJ. *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. Exp Parasitol. 1999 Aug;92(4):263-74.
3. Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Martins Reis M, Metzger M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. Cardiovasc Res. 2003 Oct 15;60(1):96-107.
4. Alves MJM, Colli W. *Trypanosoma cruzi*: Adhesion to the Host Cell and Intracellular Survival. IUBMB Life. 2007;274-9.
5. Aras R, Gomes I, Veiga M, Melo A. Vectorial transmission of Chagas' disease in Mulungu do Morro, Northeastern of Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2003 Jun. 2003;36.
6. Coura JR. Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. Rev Soc Bras Med Trop. 2006;39 Suppl 3:113-7.
7. Yoshida N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 Jul;104 Suppl 1:101-7.
8. Coura JR, Junqueira AC, Fernandes O, Valente SA, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. Trends Parasitol. 2002 Apr;18(4):171-6.
9. Moncayo A, Yanine MIO. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). Annals of Tropical Medicine and Parasitology [Internet]. 2006;100:663-77.
10. Apt W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. Drug Des Devel Ther. 2010;4:243-53.
11. Teixeira AR, Nascimento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in chagas disease--a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006 Aug;101(5):463-91.
12. Gattuso JM, Kamm MA. The management of constipation in adults. Aliment Pharmacol Ther. 1993 Oct;7(5):487-500.
13. Dias LC, Dessoy MA, Silva JJN, Thiemann OH, Oliva G, Andricopulo AD. Chemotherapy of Chagas' disease: state of the art and perspectives for the development of new drugs. Quím Nova. 2009;32.

* De acordo com:

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

14. Silber AM, Colli W, Ulrich H, Alves MJ, Pereira CA. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 2005 Mar;5(1):53-64.
15. Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol*. 1973;27:347-82.
16. Andrade LO, Andrews NW. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *J Exp Med*. 2004 Nov 1;200(9):1135-43.
17. Faucher JF, Baltz T, Petry KG. Detection of an "epimastigote-like" intracellular stage of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*. 1995;81(5):441-3.
18. Chagas C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1909;1(2):159-218.
19. Cazzulo JJ. Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J Bioenerg Biomembr*. 1994 Apr;26(2):157-65.
20. Sylvester D, Krassner SM. Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp Biochem Physiol B*. 1976;55(3B):443-7.
21. Mancilla R, Naquira C, Lanas C. Protein biosynthesis in trypanosomidae. II. The metabolic fate of DL-leucine-1-C14 in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. 1967 Oct;21(2):154-9.
22. Zeledon R. Comparative physiological studies on four species of hemoflagellates in culture. II. Effect of carbohydrates and related substances and some amino compounds on the respiration. *J Parasitol*. 1960 Oct;46:541-51.
23. Pereira CA, Alonso GD, Paveto MC, Iribarren A, Cabanas ML, Torres HN, et al. *Trypanosoma cruzi* arginine kinase characterization and cloning. A novel energetic pathway in protozoan parasites. *J Biol Chem*. 2000 Jan 14;275(2):1495-501.
24. Pereira CA, Alonso GD, Torres HN, Flawia MM. Arginine kinase: a common feature for management of energy reserves in African and American flagellated trypanosomatids. *J Eukaryot Microbiol*. 2002 Jan-Feb;49(1):82-5.
25. Pereira CA, Alonso GD, Ivaldi S, Silber AM, Alves MJ, Torres HN, et al. Arginine kinase overexpression improves *Trypanosoma cruzi* survival capability. *FEBS Lett*. 2003 Nov 6;554(1-2):201-5.
26. Rohloff P, Docampo R. A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitology*. 2008. Epub 10 mai. 2007.
27. Tonelli RR, Silber AM, Almeida-de-Faria M, Hirata IY, Colli W, Alves MJM. L-Proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. 2004;6(8):733-41.

28. Magdaleno A, Ahn IY, Paes LS, Silber AM. Actions of a proline analogue, L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*. PLoS One. 2009;4(2):e4534.
29. Martins RM, Covarrubias C, Rojas RG, Silber AM, Yoshida N. Use of L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion. Infect Immun. 2009 Jul;77(7):3023-32.
30. Williamson J, Desowitz RS. The chemical composition of trypanosomes. I. Protein, amino acid and sugar analysis. Exp Parasitol. 1961 Sep;11:161-75.
31. Silber AM, Rojas RL, Urias U, Colli W, Alves MJ. Biochemical characterization of the glutamate transport in *Trypanosoma cruzi*. Int J Parasitol. 2006 Feb;36(2):157-63.
32. Zelada C, Montemartini M, Cazzulo JJ, Nowicki C. Purification and partial structural and kinetic characterization of an alanine aminotransferase from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 1996 Aug;79(2):225-8.
33. Magdaleno A, Mantilla BS, Rocha SC, Pral EMF, Silber AM. The involvement of glutamate metabolism in the resistance to thermal, nutritional and oxidative stress in *Trypanosoma cruzi*. Enzyme Research. 2011.
34. Caldas RA, Araujo EF, Felix CR, Roitman I. Incorporation of ammonium in amino acids by *Trypanosoma cruzi*. J Parasitol. 1980 Apr;66(2):213-6.
35. Eisenberg D, Gill HS, Pfluegl GMU, Rotstein SH. Structure-function relationships of glutamine synthetases. Biochim Biophys Acta. 2000;1477(1-2):122-45.
36. KEGG PATHWAY Database [Internet]. 2013. [cited from 2013 Jun 2]. Available from: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>.
37. BRENDA - The Comprehensive Enzyme Information System [Internet]. 2013. [cited from 2013 Jun 2]. Available from: Disponível em: <http://www.brenda-enzymes.org/>.
38. Brener Z, Chiari E. Morphological variations observed in different strains of *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1963 Sep-Oct;19:220-4.
39. Camargo EP. Growth and Differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1964 May-Jun;12:93-100.
40. Tonelli RR, Silber AM, Almeida-de-Faria M, Hirata IY, Colli W, Alves MJ. L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Cell Microbiol. 2004 Aug;6(8):733-41.
41. de Sousa MA. A simple method to purify biologically and antigenically preserved bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* using DEAE-cellulose columns. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1983 Jul-Sep;78(3):317-33.
42. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 Dec;74(12):5463-7.

43. Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol.* 2003 Oct 13;3:18.
44. Silber AM, Tonelli RR, Lopes CG, Cunha-e-Silva N, Torrecilhas AC, Schumacher RI, et al. Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2009 Nov;168(1):102-8.
45. Hassall H, Lunn PJ, Ryall-Wilson J. Detection of histidase and urocanase after disc electrophoresis on polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 1970 Jun;35(2):326-34.
46. Parre E, de Virville J, Cochet F, Leprince AS, Richard L, Lefebvre-De Vos D, et al. A new method for accurately measuring Delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase activity. *Methods Mol Biol.* 2010;639:333-40.
47. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
48. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry.* 1976 May 7;72:248-54.
49. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Sep;76(9):4350-4.
50. Cooper AJ. Possible treatment of end-stage hyperammonemic encephalopathy by inhibition of glutamine synthetase. *Metab Brain Dis.* 2013 Jun;28(2):119-25.
51. Jambekar AA, Palma E, Nicolosi L, Rasola A, Petronilli V, Chiara F, et al. A glutamine synthetase inhibitor increases survival and decreases cytokine response in a mouse model of acute liver failure. *Liver Int.* 2011 Sep;31(8):1209-21.
52. Nordqvist A, Nilsson MT, Rottger S, Odell LR, Krajewski WW, Evalena Andersson C, et al. Evaluation of the amino acid binding site of *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase for drug discovery. *Bioorg Med Chem.* 2008 May 15;16(10):5501-13.
53. Lamar C, Jr. The duration of the inhibition of glutamine synthetase by methionine sulfoximine. *Biochem Pharmacol.* 1968 Apr;17(4):636-40.
54. Kakkar T, Boxenbaum H, Mayersohn M. Estimation of K_i in a competitive enzyme-inhibition model: comparisons among three methods of data analysis. *Drug Metab Dispos.* 1999 Jun;27(6):756-62.
55. Meek TD, Villafranca JJ. Kinetic mechanism of *Escherichia coli* glutamine synthetase. *Biochemistry.* 1980 Nov 25;19(24):5513-9.

56. Liaw SH, Eisenberg D. Structural model for the reaction mechanism of glutamine synthetase, based on five crystal structures of enzyme-substrate complexes. *Biochemistry*. 1994 Jan 25;33(3):675-81.
57. Caceres AJ, Portillo R, Acosta H, Rosales D, Quinones W, Avilan L, et al. Molecular and biochemical characterization of hexokinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2003 Feb;126(2):251-62.
58. Juan SM, Cazzulo JJ, Segura EL. The citrate synthase from *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol*. 1977 Oct;63(5):921-2.
59. Martinelle K, Haggstrom L. Mechanisms of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: transport across cell membranes. *Journal of biotechnology*. 1993 Sep;30(3):339-50.
60. Muller T, Walter B, Wirtz A, Burkovski A. Ammonium toxicity in bacteria. *Current microbiology*. 2006 May;52(5):400-6.
61. Ota Y, Hasumura M, Okamura M, Takahashi A, Ueda M, Onodera H, et al. Chronic toxicity and carcinogenicity of dietary administered ammonium sulfate in F344 rats. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2006 Jan;44(1):17-27.
62. Yadav SK. Computational structural analysis and kinetic studies of a cytosolic glutamine synthetase from *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *Protein J*. 2009 Dec;28(9-10):428-34.
63. Berlicki L. Inhibitors of glutamine synthetase and their potential application in medicine. *Mini Rev Med Chem*. 2008 Aug;8(9):869-78.
64. Blanco F, Alana A, Llama MJ, Serra JL. Purification and properties of glutamine synthetase from the non-N₂-fixing cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *J Bacteriol*. 1989 Feb;171(2):1158-65.
65. Gao G, Nara T, Nakajima-Shimada J, Aoki T. Novel organization and sequences of five genes encoding all six enzymes for de novo pyrimidine biosynthesis in *Trypanosoma cruzi*. *J Mol Biol*. 1999 Jan 8;285(1):149-61.
66. Hashimoto M, Morales J, Fukai Y, Suzuki S, Takamiya S, Tsubouchi A, et al. Critical importance of the de novo pyrimidine biosynthesis pathway for *Trypanosoma cruzi* growth in the mammalian host cell cytoplasm. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jan 20;417(3):1002-6.
67. Nara T, Gao G, Yamasaki H, Nakajima-Shimada J, Aoki T. Carbamoyl-phosphate synthetase II in kinetoplastids. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Sep 8;1387(1-2):462-8.
68. Nara T, Hashimoto M, Hirawake H, Liao CW, Fukai Y, Suzuki S, et al. Molecular interaction of the first 3 enzymes of the de novo pyrimidine biosynthetic pathway of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Feb 3;418(1):140-3.

69. Maurizi MR, Pinkofsky HB, Ginsburg A. ADP, chloride ion, and metal ion binding to bovine brain glutamine synthetase. *Biochemistry*. 1987 Aug 11;26(16):5023-31.
70. Krishnan IS, Singhal RK, Dua RD. Purification and characterization of glutamine synthetase from *Clostridium pasteurianum*. *Biochemistry*. 1986 Apr 8;25(7):1589-99.
71. Nilsson MT, Krajewski WW, Yellagunda S, Prabhumurthy S, Chamarahally GN, Siddamadappa C, et al. Structural basis for the inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase by novel ATP-competitive inhibitors. *J Mol Biol*. 2009 Oct 23;393(2):504-13.
72. Shankar RA, Anderson PM. Purification and properties of glutamine synthetase from liver of *Squalus acanthias*. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1985 May 15;239(1):248-59.
73. Shin D, Park C. N-terminal extension of canine glutamine synthetase created by splicing alters its enzymatic property. *J Biol Chem*. 2004 Jan 9;279(2):1184-90.
74. Crespo JL, Guerrero MG, Florencio FJ. Mutational analysis of Asp51 of *Anabaena azollae* glutamine synthetase. D51E mutation confers resistance to the active site inhibitors L-methionine-DL-sulfoximine and phosphinothricin. *Eur J Biochem*. 1999 Dec;266(3):1202-9.