Robert Leonardo Galvez Rojas

**Análise do Transporte de Glutamato e
GABA em epimastigotas de *Trypanosoma
cruzi***

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo
para a obtenção de título de mestre em
Ciências.

São Paulo, 2007

Robert Leonardo Galvez Rojas

**Análise do Transporte de Glutamato e GABA em
epimastigotas de *Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo
para a obtenção de título de mestre em
Ciências.

Área de concentração:
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador:
Ariel Mariano Silber

São Paulo, 2007

A minha mãe e família por seu amor, paciência e compreensão.

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que conviveram e colaboraram ao longo deste trabalho, em especial:

A Ariel, pelo acolhimento em seu laboratório, ensinamentos, conversações, amizade, apoio, paciência e confiança depositada durante todos estes anos.

A Lisvane, Merari, Anissa e Paloma, pela amizade, estímulo, incentivo, e imensa colaboração durante todo o desenvolvimento desta tese.

A meus amigos do laboratório de Ariel, Josué, Anahí, Mario, Heloisa e Brian, pela amizade e apoio durante o desenvolvimento desta tese.

A Carla, por seu apoio, companhia, incentivo e paciência nos momentos mais difíceis, que se fazem mais difíceis ainda quando a família está longe.

A meus amigos chilenos aqui em São Paulo, Esteban, Mauro e Sergio por seu apoio, amizade, companhia e valiosas discussões e colaboração.

Aos meus grandes Andréas, Leonardo, Marcio, Eduardo, Ricardo, Mario, Daniel, pela convivência e por serem verdadeiros amigos presentes na minha etapa aqui em São Paulo.

A todo o pessoal do laboratório da professora Lucile Floeter-Winter pela companhia, apoio, discussões e amizade. Em especial a professora Lucile....

A todo o pessoal do Departamento de Parasitologia (ICB-II) e Departamento de Fisiologia (IB), alunos, técnicos e professores pela convivência e amizade.

Este trabalho contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“A mente é como um pára-quedas: só serve se estiver aberta”.

PREFÁCIO

“Esta tese foi elaborada de acordo com as normas da CPG/ICB relativas a outras formas de elaboração de tese de mestrado que permitem a inclusão, como anexos, de resultados já publicados ou submetidos em periódicos internacionais indexados em língua inglesa. Permitem ainda que detalhes metodológicos e resultados sejam aqueles contidos nos artigos anexados ao corpo da tese”.

RESUMO

A importância de aminoácidos em tripanossomatídeos vai além da síntese de aminoácidos, envolvendo processos tais como a diferenciação, osmorregulação e metabolismo energético. A disponibilidade dos aminoácidos envolvidos nessas funções depende, entre outras coisas, de seu transporte para o interior da célula. Aqui, caracterizamos os processos de transporte de glutamato e GABA no parasito protozoário humano *Trypanosoma cruzi*. No transporte de glutamato dados cinéticos amostram um único sistema saturável com uma K_m de 0.30 mM e uma velocidade máxima de $98.34 \text{ pmoles min}^{-1}$ per 2×10^7 células para epimastigotas e $20 \text{ pmoles min}^{-1}$ per 2×10^7 células para trypomastigotas. O transporte de GABA foi caracterizado em formas epimastigotas, apresentando uma K_m de 0.40 mM uma $V_{\max}$ de $84.45 \text{ pmoles/min/}20 \times 10^6$ células. Nenhum dos dois processos apresentou alterações em condições de jejum de até 3 horas. Aspartato, alanina, glutamina, asparagina, metionina, oxaloacetato e alfa-cetoglutarato competiram com o glutamato quando avaliados em concentrações dez vezes em excesso respeito do substrato. Interessantemente, o transporte de glutamato aumentou na presença de GABA. O transporte de glutamato foi dependente do pH, mas não de concentrações de Na^+ e K^+ no médio extracelular, enquanto que o transporte de GABA foi dependente da presença de K^+ além de H^+ . Estes dados foram consistentes com uma sensibilidade dos sistemas de transporte ao ionóforo de H^+ FCCP, demonstrando que o gradiente de concentração de H^+ através da membrana plasmática é fundamental nesses processos. Os dados obtidos sugerem um paralelismo entre o metabolismo de glutamato e GABA em *T. cruzi* e em determinadas regiões do sistema nervoso central, onde esses dois aminoácidos são fundamentais na neurotransmissão.

ABSTRACT

The role of amino acids in trypanosomatids goes beyond protein synthesis, involving processes such as differentiation, osmoregulation and energy metabolism. The availability of the amino acids involved in those functions depends, among other things, on their transport into the cell. Here we characterize the transport process for glutamate and GABA in the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. In the glutamate transport, data kinetics show a single saturable system with a K_m of 0.30 mM and a maximum velocity of 98.34 pmoles min^{-1} per 2×10^7 cells for epimastigotes and 20 pmoles min^{-1} per 2×10^7 cells for trypomastigotes. The GABA transport was characterized for epimastigote forms showing a K_m of 0.4 mM and a $V_{\max}$ de 84.45 pmoles/min/ 2×10^6 cells. None of these processes were affected by parasite nutrient starvation for up to 3h. Aspartate, alanine, glutamine, asparagine, methionine, oxaloacetate and alpha-ketoglutarate competed with glutamate when evaluated in 10-fold excess concentrations with respect to the substrate. Interestingly, the glutamate transport was strongly increased in the presence of GABA. Glutamate uptake was dependent on pH, but not on Na^+ or K^+ concentrations in the extracellular medium, while the GABA transport was dependent of K^+ besides H^+ . These data were consistent with the sensitivity of both systems to the H^+ ionophore FCCP, demonstrating that H^+ gradient across the cytoplasm membrane is fundamental for these processes. The obtained data suggest some parallelism between glutamate and GABA metabolism between *T. cruzi* and some regions of the central nervous system, where both amino acids are fundamental for the neurotransmission.

Título:

Análise do Transporte de Glutamato e GABA em epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Nome: Robert Leonardo Galvez Rojas
Orientador: Ariel Mariano Silber
Departamento de Parasitologia, ICB-II, USP

ABREVIATURAS

ALAT	Alanina aminotransferase
AAAP	Em português, permeases de aminoácidos/auxina
FCCP	Trifluorometoxifenil- carbonil hidrazona
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GAD	Glutamato decarboxilase
GS	Glutamina sintetase
GABA –T	GABA transaminase
NMDA	N–metil–D–aspartato
PAG	Glutaminase dependente de fosfato
SNC	Sistema Nervoso Central
SSDAH	Succinil semialdeído desidrogenase
ORFs	Fase aberta de leitura
TCA	Ácido tricloroacético
PBS	Buffer fosfato salino
μCi	micro Curie
ATP	Adenosina Trifosfato
cpm	Contas por minuto

SUMÁRIO

PREFÁCIO.....	7
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Considerações sobre a patogenia, epidemiologia, clínica e quimioterapia da doença Chagas.....	14
1.1.2 Quimioterapia contra a Doença Chagas.....	17
1.1.3 Procura de alvos terapêuticos no metabolismo de Aminoácidos no <i>T. cruzi</i>	18
1.1.4 Principais vias metabólicas de aminoácidos no <i>T. cruzi</i>	19
1.1.5 Transportadores de aminoácidos em tripanossomatídeos.....	22
1.1.6 A conexão Glutamato-GABA em diferentes modelos celulares.....	24
2 HIPOTESE E OBJETIVOS.....	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 Reagentes.....	30
3.2 Parasitas.....	30
3.3 Ensaios de Transporte.....	30
3.4 Ensaios bioquímicos.....	31
3.5 Incorporação de glutamato a proteínas.....	32
3.6 Análises de Dados.....	32
4 RESULTADOS.....	34
4.1 Transporte de glutamato em <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
4.2 Transporte de GABA em <i>Trypanosoma cruzi</i>	43
5 DISCUSSÃO.....	50

6 CONCLUSÕES.....	56
7 REFERENCIAS.....	57
8 ANEXO IA.....	70
9 ANEXO IIB.....	71
10 ANEXO II.....	72

1 INTRODUÇÃO.

1.1 Considerações sobre a patogenia, epidemiologia, clínica e quimioterapia da doença Chagas.

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, a qual afeta aproximadamente 16 a 18 milhões de pessoas nas Américas, e estima-se ainda que existam 100 milhões sob risco de infecção (<http://www.who.int/ctc/chagas/disease.htm>). Esse parasita apresenta um ciclo de vida complexo, envolvendo vários hospedeiros invertebrados e vertebrados (fig. 1). Nos hospedeiros invertebrados, o *T. cruzi* se replica como uma forma flagelada e não infetante denominada epimastigota, a qual frente a estímulos ambientais se diferencia em uma forma flagelada denominada tripomastigota metacíclico, não replicativa e infectante. Quando essas formas infectam o hospedeiro vertebrado devem invadir as suas células para, no citoplasma, diferenciar-se em uma forma intracelular aflagelada denominada amastigota. Essas formas dividem-se por fissão binária, e diferenciam-se para as formas flageladas denominadas tripomastigotas sanguíneas (Brener, 1973), passando por uma forma de transição denominada epimastigota intracelular (Almeida-de-Faria *et al.*, 1999; Tyler e Engman, 2001; Tonelli *et al.*, 2004). A transmissão da doença ocorre principalmente pelo inseto vetor transmissor (80% - 90%), transfusão sanguínea (5% - 20%) e vias congênitas (0.5% - 8%) (Rodrigues Coura e de Castro, 2002).

Em seres humanos, depois da infecção e período de incubação, a fase aguda da doença é iniciada, na ausência de tratamento específico, com sintomas que persistem ao longo de aproximadamente dois meses com uma taxa de mortalidade de 2 - 8%, especialmente em crianças. *T. cruzi* é hábil para invadir e multiplicar-se dentro de diferentes tipos celulares nos seus hospedeiros mamíferos, incluindo macrófagos, células de músculo estriado e liso, fibroblastos, e até, neurônios. A primeira reação do

hospedeiro frente ao parasita e uma reação inflamatória mononuclear focal devido à ruptura de células infetadas. Dentro de alguns dias a semanas, podem ser detectadas no soro a presença de complexos imunes e necrose no foco inflamatório. A inflamação severa e acompanhada por necrose de células parasitadas e não parasitadas, especialmente no coração. Tem sido demonstrado que a agregação plaquetária, degranulação dos eosinófilos, patologia microvascular, edema, trombose, estases sangüíneas e isquemia acompanham a patologia chagásica (Andrade, 1999).

Depois da infecção aguda, os pacientes apresentam um aumento da resposta imune, mas permanecem infetados. Vários são os mecanismos descritos em *T. cruzi* relacionados com a evasão da resposta imune. A proliferação da infecção para diferentes tecidos e órgãos leva à produção de lesões inflamatórias focais que podem estar bastante distribuídas no organismo. Em biopsias, formas amastigotas podem ser detectadas por microscopia convencional, por imunofluorescência e marcadores genômicos como hibridação *in situ*. A combinação de fenômenos como o aumento da resposta imune humoral e a supressão imunológica (hipersensibilidade e a redução de uma reação inflamatória), parecem ser as principais vias que caracterizam a fase indeterminada da doença Chagas (Andrade, 1999), além de uma fase indeterminada com leves infiltrados celulares em tecidos cardíacos e intestinais (Texeira *et al*, 2006).

Na fase crônica da doença de Chagas, muitos pacientes permanecem assintomáticos, com um 20 – 50% dos casos, conforme a área endêmica analisada, desenvolvendo os sintomas característicos desta fase, principalmente, distúrbios cardíacos, digestivos e neurológicos (ver revisão de Brenner, 2000). A miocardite crônica ativa e tem sido atribuída à hipersensibilidade a antígenos parasitários, neo-antígenos ou automunidade. A presença de antígenos que reagem cruzadamente entre células de miocárdio e *T. cruzi* tem sido demonstrada, mas a auto-imunidade não

consegue explicar completamente a fase cardíaca da doença de Chagas. A positividade na avaliação da infecção por métodos diretos tais como xenodiagnóstico ou hemocultivo, e reação de reativação da doença crônica por imunossupressão demonstram a presença da parasita na fase crônica. A elevada frequência de parasitas e antígenos associados com a inflamação miocárdica é um importante indicador para os procedimentos terapêuticos na fase crônica.

A patologia da doença Chagas não é completamente entendida e bem definida, apresenta duas lesões inflamatórias básicas, uma focal e outra difusa. A lesão focal está relacionada à presença do parasita, e ocorre quando o parasita é liberado da célula infectada. A lesão difusa não está relacionada ao número de parasitas. Durante a infecção aguda há lesões difusas no coração e lesões focais em outros órgãos. Na fase crônica, fibroses e lesões inflamatórias não parecem estar relacionadas com a presença de *T. cruzi* (Andrade, 1999; Higuchi, 1999). Dois mecanismos foram propostos para entender a patogênese chagásica:

- a) A persistência do parasita resulta numa reação inflamatória crônica, o que induz uma resposta imune contra antígenos específicos de tecido cardíaco (ver revisão de Tarleton, 2001). Vários reportes clínicos confirmam esse mecanismo (Higuchi, 1993, 1997; Jones *et al*, 1993; Anez *et al.*, 1993).
- b) Signos clínicos da doença são evidentes em tecidos na ausência de parasitas.

Fig. 1 Esquema do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (gentilmente cedido pela Dra. Renata Rosito Tonelli).

1.1.1 Quimioterapia contra a Doença Chagas.

A quimioterapia da doença Chagas ainda é insatisfatória. As poucas drogas disponíveis são limitadas em relação à eficácia e tolerância. As mais importantes são Nifurtimox, um nitrofurano (da Bayer, recentemente descontinuado), e Benzonidazole, um derivado nitroimidazólico (da Roche). Ambos têm atividade significativa na fase aguda da doença, mas a efetividade na fase crônica é controversa (Cancado, 1997; Sosa Estani, *et al*, 1998; Croft *et al*, 1997). Estudos básicos nas últimas duas décadas tem contribuído para decifrar as bases moleculares da atividade anti-*T. cruzi* e toxicidade de esses componentes (Docampo, 1986-1990). O Nifurtimox atua via a redução de um grupo nitro a radicais nitroaniônicos, os quais reagem para produzir metabólitos de oxigênio altamente tóxicos (superóxidos e peróxidos). O *T. cruzi* não tem mecanismos

eficientes de detoxificação para metabólitos de oxigênio, particularmente peróxido de hidrogênio, sendo mais sensível ao estresses oxidativo que outras células de vertebrados (Stoppani, 1999; Docampo, 1990). Benzonidazole parece atuar por um mecanismo diferente (estresse redutivo), o qual implica modificações covalentes de macromoléculas por intermediários de nitro redução (Stoppani, 1999; Docampo, 1986-1990). Outros estudos sobre os mecanismos de ação de nitrofuranos e nitroimidazoles mostraram que células de *T. cruzi* que superexpressam superóxido dismutase incrementaram a sensibilidade a benzonidazole e violeta genciana (Temperton, 1998). Os efeitos colaterais dessas drogas incluem anorexia, vômitos, polineuropatia periférica e alergia dermatica, provavelmente derivadas de danos oxidativos e redutivos nos tecidos do hospedeiro. Como dito anteriormente, a principal limitação dessas drogas e sua baixa efetividade na fase crônica da doença, fase na qual é diagnosticada a maior parte dos casos (Cancado, 1997).

Perante esse panorama, novos alvos para uma quimioterapia específica estão sendo analisados. Uma compreensão maior das vias da biosíntese *de novo* de esteróis, proteólise mediada por cruzipaina, metabolismo de pirofosfato, sínteses de tripanotona, via da diidrofolato redutase, biosíntese de fosfolípídeo e prenilação e acilação de proteínas poderão eventualmente contribuir á busca de novas alternativas terapêuticas (Rassi *et al*, 2003; Urbina e Docampo, 2003).

1.1.2 Procura de alvos terapêuticos no metabolismo de aminoácidos no *T. cruzi*.

A relevância de aminoácidos durante o ciclo de vida de *T. cruzi* está bem estabelecida. Os primeiros trabalhos de Zelédon (1960) e Sylvester e Krassner (1976) mostraram a habilidade de epimastigotas para oxidar certos aminoácidos. A adição de três aminoácidos e glicose a um médio definido que imita as características

fisicoquímicas da urina de barbeiro promove a diferenciação de epimastigotas a tripomastigotas metacíclicos (metaciclogênese): a adição de glicose, aspartato, glutamato e prolina induz a metaciclogênese numa diversidade de cepas de *T. cruzi* (Contreras *et al.*, 1985). No hospedeiro invertebrado está bem estabelecido que os aminoácidos apresentem vários papéis na biologia dos tripanossomatídeos, além da sua participação na síntese de proteínas (Contreras *et al.*, 1985; Silber *et al.*, 2005). A habilidade de formas epimastigotas de *T. cruzi* de metabolizar asparagina, glutamina, aspartato, glutamato, leucina (Mancilla *et al.*, 1967; Zeledon, 1960), prolina e isoleucina (Sylvester e Krassner, 1976) foi bem demonstrada (ver revisão por Silber *et al.*, 2005). Por outro lado, a presença de uma arginina quinase, a qual reversivelmente converte arginina em fosfoarginina (Pereira *et al.*, 2000) envolve a arginina em processos onde o controle dos recursos energéticos da célula é crítico: crescimento celular e sobrevivência em condições de estresse (Pereira *et al.*, 2002, 2003). Alguns aminoácidos neutros e ácidos, principalmente glicina, alanina, prolina, glutamato e aspartato também promovem a metaciclogênese, processo pelo quais as formas epimastigotas diferenciam-se para formas tripomastigotas metacíclicas (Contreras *et al.*, 1985; Krassner *et al.*, 1990; Homsy *et al.*, 1989). Além disso, foi recentemente demonstrado que prolina é essencial para a diferenciação de epimastigotas intracelulares nas formas tripomastigotas sangüíneas, no interior das células hospedeiras (Tonelli *et al.*, 2004). Finalmente, alguns aminoácidos estão associados a vacúolos citoplasmáticos e relacionados a processos de osmoregulação (Docampo *et al.*, 2004).

1.1.3 Principais vias metabólicas de aminoácidos no *T. cruzi*.

Já faz três décadas que se mostrou que asparagina, glutamina, aspartato, glutamato, leucina, isoleucina e prolina são metabolizados por *T. cruzi* (Zeledon, 1960;

Sylvester e Krassner, 1976; Mancilla *et al*, 1967). É pensado que esses aminoácidos são oxidados através da sua conversão a glutamato e aspartato, os quais podem ser transportados do citoplasma até a mitocôndria, e podem ser processados via o ciclo de Krebs (fig. 2). Glutamato, aspartato e alanina estão diretamente associados como fonte de intermediários do ciclo de Krebs. O grupo $-NH_2$ do glutamato pode ser transferido a piruvato pela alanina aminotransferase (ALAT) e, em alguma medida, por tirosina aminotransferase (TAT) produzindo α -cetoglutarato e alanina. Consequentemente, quando a glicólise é ativa, alanina é produzida (Zelada *et al*, 1996). Outra via pela qual glutamato pode ser convertido a α -cetoglutarato é pela via das glutamato desidrogenase, uma enzima bem estudada que se apresenta em duas formas: uma mitocondrial e outra citoplasmática (Cazzulo *et al.*, 1979; 1994). Glutamato desidrogenase converte glutamato ao α -cetoglutarato, transferindo os grupos $-NH_2$ a H_2O , isto deveria explicar as altas concentrações de NH_3 presentes em meios de cultivos celulares (Yoshida e Camargo, 1978). Aspartato está também vinculado ao ciclo de Krebs a través de uma aspartato aminotransferase. Esta enzima, com características bioquímicas similares aquelas de mamíferos, transferiu o grupo $-NH_2$ do aspartato a α -cetoglutarato, produzindo glutamato e oxaloacetato (Cazzulo *et al*, 1979). Varias copias de genes que codificam para uma provável aspartato aminotransferase mitocondrial foram recentemente identificados no genoma do *T. cruzi* (www.genedb.org) (com numeração Tc00. 1047053510945.70, Tc00. 1047053503679.10 e Tc00. 1047053503841.70). O glutamato obtido como um produto pode ser oxidado através do ciclo de Krebs. Uma atividade aspartato aminotransferase foi demonstrada para a TAT. Esta enzima possui uma abrangente atividade aminotransferase, e pode também transaminar os aminoácidos aromáticos e alanina. Entre os aceptores de $-NH_2$ estão piruvato (convertido a alanina), α -cetoglutarato (convertido a glutamato) e oxaloacetato (convertido a aspartato)

(Montemartini *et al*, 1993-1995). Porém, sua principal função parece ser a conversão de piruvato em alanina (Frydman *et al.*, 1990). As duas isoformas de glutamato desidrogenase também participam na biosíntese de aminoácidos por sua habilidade para incorporar NH_3 a α -cetoglutarato produzindo glutamato (Caldas *et al.*, 1980). Foi também demonstrado que glutamina pode ser sintetizado de glutamato e NH_3 na presença de glutamina sintetase (Caldas *et al.*, 1980). Como esta reação é reversível glutamina podem ser oxidadas pela via de glutamato. Não há evidência bioquímica sobre a presença de uma asparagina sintetase. Além disso, dois fases abertas de leitura (ORFs) foram encontradas no genoma do *T. cruzi* codificando para uma provável asparagina sintetase, a qual catalisa a conversão reversível de aspartato em asparagina (no genoma de *T. cruzi* a numeração para estes prováveis genes são Tc00.1047053503625.10 e Tc00.1047053503899.90). Além disso, uma ORF correspondente a uma provável asparaginase foi identificada, a qual catalisa a conversão de asparagina em aspartato numa via irreversível (GB AAV31748). A presença de genes possivelmente codificantes para algumas de essas enzimas sugere que asparagina poderia ser oxidada via sua conversão em aspartato.

Fig. 2. Esquema das principais vias metabólicas da glicose e aminoácidos sobre as quais se tem informação direta ou indireta em *T. cruzi*. Em linhas descontinua: passos metabólitos inferidos a partir de informação do Projeto genoma de *T. cruzi* ou de dados bioquímicos indiretos. Em linhas contínuas: passos metabólicos cuja ocorrência foi bioquimicamente demonstrada. (Adaptado de Silber *et al.*, 2005).

1.1.4 Transportadores de aminoácidos em tripanossomatídeos.

Apesar da sua reconhecida relevância no metabolismo, a estrutura e mecanismos moleculares dos transportadores de metabólitos em *T. cruzi* são majoritariamente desconhecidos. O único gene que foi clonado e cuja função foi demonstrada mediante expressão funcional num sistema heterólogo é o transportador de glicose (Tetaud *et al.*, 1997; Barrett *et al.*, 1998). Vários transportadores de aminoácidos foram primeiro caracterizados bioquimicamente por Hampton (1970-1971). Sua presença foi confirmada por outros investigadores (Goldberg *et al.*, 1976) que demonstraram a provável presença de vários transportadores de aminoácidos, com diferentes especificidades e cinéticas. Mais recentemente, a incorporação de arginina, prolina e

glutamato e aspartato foram estudadas. Arginina é ativamente transportado por pelo menos dois sistemas de transporte, um de alta afinidade e outro de baixa afinidade. (Pereira *et al*, 1999; Canepa *et al*, 2004). Sistemas de alta e baixa afinidade para o transporte de prolina foram também caracterizados em *T. cruzi*. O transportador de glutamato em *T. cruzi* apresenta algumas semelhanças com um dos transportadores de prolina (sistema A) de *T. cruzi*, cuja fonte de energia é o gradiente de H^+ na membrana citoplasmática da parasita (Silber *et al*, 2006). Recentemente, um análise pós-genômico foi feito para procurar genes prováveis que codificam para uma família de genes transportadores de auxina e aminoácidos (AAAP devido ao nome em inglês Auxin/Amino Acids Permease). Esta família de genes compreende transportadores com características de symporter H^+ /aminoácidos, e foi escolhido devido a que, como mencionado anteriormente, existem evidências bioquímicas da presença desse tipo de transportadores em *T. cruzi*. Nesse trabalho, foram identificados 60 genes codificantes para prováveis transportadores AAAP no genoma de *T. cruzi* (Bouvier *et al*, 2004).

Em outros parasitas da família dos tripanossomatídeos, outros transportadores de aminoácidos que também foram caracterizados bioquimicamente foram os transportadores de prolina em *Leishmania tropica* (Law e Mukkada, 1978), serina em *Leishmania (L.) amazonensis* (Dos Santos *et al*, submetido), prolina em *Trypanosoma brucei* (L'Hostis *et al*, 1993), glutamato em *L. (L.) amazonensis* (Galvez Rojas *et al*, manuscrito em preparação), é prolina em *Crithidia deanei* (Galvez Rojas *et al*, submetido) onde foi demonstrado a participação de um endossimbionte regulando o processo de transporte deste aminoácido no parasita. Finalmente, a caracterização molecular e a funcionalidade de um gene codificante para um transportador de aminoácido só têm sido feito em *Leishmania (V.) donovani*. Foi identificada uma ORF

codificante para uma proteína com atividade de transportador de arginina (Shaked-Mishan *et al*, 2006).

1.1 5 A conexão Glutamato-GABA em diferentes modelos celulares.

Apesar da conhecida participação de vários aminoácidos em diferentes aspectos da biologia do *T. cruzi*, o processo de transporte de aminoácidos permanece relativamente pouco estudado (Silber *et al.*, 2005). Nosso laboratório vem estudando o transporte e metabolismo de alguns desses aminoácidos (Silber *et al*, 2002 Canepa *et al*, 2004-2005). Dentro desse panorama, resolvemos focalizar o estudo na análise do transporte de glutamato e outros transportadores de aminoácidos estruturalmente relacionados, como o transporte de GABA.

Glutamato é um metabólito intermediário entre prolina, um aminoácido reconhecido como fonte de carbono e energia, e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Krassner e Flory, 1972; ter Kuile e Oppendoes, 1992; Obungu *et al*, 1999; Lamour *et al.*, 2005) e está, juntamente com a alanina e o aspartato, diretamente envolvido no fornecimento de intermediários do ciclo de Krebs (ver revisão de Silber *et al*, 2005). O glutamato pode ter o grupo amino transferido ao piruvato através da enzima alanina aminotransferase (ALAT) e, em algumas situações, através da enzima tirosina aminotransferase (TAT), produzindo α -cetoglutarato e alanina (Cazzulo, 1994). Eventualmente, esse metabólito pode ser desaminado por alguma das duas enzimas glutamato desidrogenases (Juan *et al.*, 1978; Cazzulo *et al.*, 1979) que possuem localização citoplasmática e mitocondrial, respectivamente (Duschak e Cazzulo, 1991). Genes codificantes para ALAT, TAT e glutamato desidrogenase têm sido clonados permitindo a demonstração das atividades bioquímicas dos produtos por eles codificados (ver revisão de Silber *et al*, 2005). Ainda, a presença de uma prolina

oxidase e pyrrolina-5-carboxilato desidrogenase foi indiretamente demonstrada através da habilidade destas parasitas para degradar prolina a CO_2 e H_2O . Esta via metabólica envolve obrigatoriamente o glutamato como intermediário metabólico importante no metabolismo de *T. cruzi* (ver revisão de Silber *et al.*, 2005).

Em geral, glutamato na literatura é considerado o principal mediador do sinal excitatório no sistema nervoso central (SNC) de células de mamíferos e, provavelmente, está envolvido em muitos aspectos da função do cérebro normal (Fonnum, 1984; Ottersen e Storm-Mathisen, 1984; Collingridge e Lester, 1989; Headly e Grillner, 1990). Glutamato tem uma participação no desenvolvimento do SNC, incluindo a indução e término da sinapse, migração, diferenciação e morte celular (ver revisão de Danbolt, 2001). Muitos neurônios e células gliais têm receptores e transportadores de glutamato (Hosli e Hosli, 1993; Vernadakis, 1996; Bergler *et al.*, 2000). Glutamato também tem funções sinalizadoras em órgãos e tecidos periféricos e a participação na homeostase de células endócrinas (Moriyama *et al.*, 2000). No SNC, glutamato em altas concentrações no meio extracelular é altamente tóxico e sua dinâmica de controle é dependente de um sistema de transportadores e receptores de glutamato, que participam eficientemente da função sináptica (ver revisão de Danbolt, 2001). A magnitude da concentração de glutamato no meio extracelular determina a magnitude dos receptores e transportadores de glutamato nas células neuronais (ver revisão de Danbolt, 2001). Em contraste, glutamato intracelular é geralmente não tóxico e pode servir como segundo mensageiro, fonte de energia e ter uma participação fundamental na regulação dos receptores e transportadores de glutamato (ver fig. 3) na superfície da célula (ver revisão de Danbolt, 2001)

Fig. 3. Representação (adaptado de Bak *et al*, 2006, J. of Neurochem., 98: 641-653) do ciclo glutamato-glutamina numa sinapse glutamatérgica. Glutamato é liberado no médio intersináptico por uma célula presináptica. Posteriormente glutamato pode ser incorporado a uma célula adaptadora das funções da sinapse, como os astrócitos, sendo incorporado um grupo amino por uma glutamina sintetase (GS) usando amônio livre do médio citoplasmático para formar glutamina (Gln). Assim, os astrócitos liberam glutamina ao neurônio presináptico sendo incorporado, no citoplasma, a glutamato por uma reação dependente de uma glutaminase dependente de fosfato (PAG), liberando amônio no médio. Tem sido demonstrado que toda bioquímica da sinapse dependente de glutamato e regulada por receptores é transportadores de glutamato (ver revisão de Danbolt, 2001).

Um análogo estrutural de glutamato que poderia ter uma participação importante na biologia e metabolismo do *T. cruzi*, é o aminoácido ácido *gamma*-aminobutírico (GABA). GABA na literatura pode ser encontrado no SNC participando ativamente como um dos neurotransmissores das sinapses neuronais (Schousboe e Waagepetersen, 2007), e também

em plantas, onde GABA tem uma função sinalizadora fundamental no desenvolvimento

Fig. 4. Representação (adaptado de Bak *et al*, 2006, J. of Neurochem., 98: 641-653) do ciclo GABA-glutamina numa sinapse GABAérgica. A partir de glutamato pela presença de uma glutamato decarboxilase (GAD) é obtido o aminoácido GABA. GABA é liberado no médio intersináptico por uma célula presináptica. Posteriormente GABA pode ser incorporado a uma célula adaptadora das funções da sinapse, como os astrócitos, sendo incorporado para ser metabolizado como succinato no ciclo de Krebs para formar cetoglutarato e posteriormente a glutamato. Posteriormente, mediante uma glutamina sintetase (na presença de amônio) é transformado a glutamina, que, finalmente é incorporada na célula presináptica na presença de uma glutaminase dependente de fosfato (de similar característica a via glutamatérgica). Tem sido demonstrado que toda bioquímica da sinapse dependente de GABA é regulada por receptores e transportadores de GABA (ver revisão de Back *et al.*, 2006).

tecidual (Bouché e Fromm, 2004). GABA é um aminoácido de 4 carbonos encontrado praticamente em todos os organismos procariontes e eucariontes. Em plantas GABA é sintetizado por uma decarboxilação de glutamato em uma reação acelerada pela glutamato decarboxilase (GAD). Assim, GABA é metabolizado por uma reação reversível de

transaminação por uma GABA transaminase (GABA-T). O produto da transaminação, semialdeído succínico, é oxidado a succinato em uma reação irreversível pela succinil semialdeído desidrogenase (SSADH). Estas três reações são consideradas como a via “desvio de GABA” (em inglês, “Shunt GABA”). Em insetos, o papel de GABA tem sido estudado em *Drosophila melanogaster* (Hosie *et al.*, 2004), mas pouco se sabe da participação de GABA nos hospedeiros invertebrados onde *T. cruzi* faz seu ciclo de vida. No SNC, os transportadores de GABA são membros de uma longa família de proteínas neurotransmissoras dependentes de Na^+ , localizadas em neurônios e células gliais (fig. 4). Em protozoários a presença e importância de GABA tem sido mostrada no organismo modelo *Dictyostelium discoideum*, no qual GABA induz a diferenciação terminal do ciclo de vida através de um receptor de GABA (Anjard e Loomis, 2006), e também em *Paramecium*, no qual foram encontradas moléculas relacionadas ao sistema de receptores GABA com função reguladora da motilidade (Ramoino *et al.*, 2006; Delmonte *et al.*, 2002).

2.1 HIPOTESE.

O fato de que os aminoácidos glutamato e GABA possuam papéis interdependentes em uma grande diversidade de organismos ao longo de toda a escala evolutiva nos levou a propor a seguinte hipótese:

Existe uma relação entre os metabolismos de glutamato e de GABA em *T. cruzi*, que pode ser evidenciada mediante uma análise bioquímica das atividades de transporte desses substratos.

2.2 OBJETIVOS.

Objetivo Geral:

- a) Estudar a importância de glutamato e GABA no metabolismo energético e seu provável papel em *Trypanosoma cruzi* mediante análise dos seus transportadores.

Objetivos específicos:

- a) Caracterizar o processo de transporte de glutamato em *Trypanosoma cruzi*
- b) Caracterizar o processo de transporte de GABA em *Trypanosoma cruzi*.

3 MATERIAS E MÉTODOS:

3.1 Reagentes.

Os metabólitos radiomarcados L-H³ - Glutamato, 44 Ci/mmol e L-H³ - GABA, 250 μ Ci foram obtidos de NEN Life Science Products (Boston, MA, USA). A sonda Rodamina 123 foi obtida da Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Todos os demais reagentes foram obtidos do Sigma (Saint Louis, MO, USA).

3.2 Parasitas.

Para os ensaios de transporte foram utilizados epimastigotas de *T. cruzi*, cepa CL clone 14, mantidos em fase exponencial por passagem em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) (Camargo, 1964). Tripomastigotas de cultivo celular foram obtidos segundo o protocolo descrito por Tonelli *et al*, 2004.

3.3 Ensaios de Transporte.

Os ensaios de transporte foram feitos como foi descrito por Silber *et al*, 2002. Brevemente, parasitas em fase exponencial foram lavados três vezes em PBS pH 7,2, ressuspensos a uma densidade final de 20×10^7 parasitas/ml e distribuídos em alíquotas de 100 μ l (20×10^6 parasitas/ml). O ensaio de transporte foi iniciado pela adição de 100 μ l de glutamato diluído ou GABA diluído em PBS pH 7,2 na presença de 0,1 μ Ci de L-H³-Glutamato (para o caso do transporte de glutamato) e 100 μ l de 0,1 μ Ci de L-H³-GABA (para o caso do transporte de GABA). Os tubos foram incubado por 1 min., e a reação detida pela adição de 800 μ l de glutamato 50mM e GABA em PBS (respectivamente) à frio, seguido de duas lavagens por centrifugação a 10.000 rpm x 2 min. e ressuspensão em PBS. Posteriormente, as amostras foram analisadas em um contador de cintilação.

3.4 Ensaios Bioquímicos:

Os ensaios de competição de aminoácidos foram realizados utilizando-se concentrações de 0,3mM de glutamato ou 0,4mM de GABA em PBS, traçados com 0,1 μ Ci do material radiativo correspondente, e 3mM e 4mM para aminoácidos competidores respectivamente. Esses ensaios seguem o mesmo procedimento para os ensaios de cinética de transporte.

Os ensaios feitos na presença de Na⁺ e K⁺ foram realizados seguindo os ensaios em PBS contendo somente os íons (145mM Na⁺ e 4,5mM de K⁺) e colina (139,7mM). O efeito do pH extracelular foi também avaliado usando PBS (pH 4,0, 0-8,0) à 28°C. Para avaliar o efeito do gradiente de prótons na membrana plasmática e a síntese de ATP, os ensaios de transporte foram feitos na presença de oligomicina (5mg/ml) e FCCP (0.5mM) respectivamente. A existência de um potencial de membrana dependente do gradiente de prótons foi avaliada pela incubação com rodamina 123. Os tratamentos com oligomicina ou uma mistura de rotenona e antimicina (200mM de rotenona e 0.5mM de antimicina) foram feitos pré incubando ou não as células durante 30 min. prévios às medições de transporte.

Para avaliar a dependência de íons no ensaio de transporte de GABA foram realizados ensaios com ionóforos de Na⁺ (monensina, 50 mM), K⁺ (valinomicina, 200mM) e da bomba Na⁺/K⁺ ATPase (ouabaina, 250mM); as mesmas concentrações de incubação dos ensaios de transporte de glutamato foram utilizadas para os ensaios de transporte de GABA.

Todos os ensaios foram feitos em triplicatas e as datas correspondem a 3 ensaios independentes. A viabilidade das células foi analisada pela mobilidade sob o microscópio de luz.

3.5 Incorporação de Glutamato a Proteínas.

A incorporação do transporte de glutamato a proteínas foi analisada mediante precipitação de ácido tricloroacético (TCA), como feito anteriormente (Silber *et al*, 2002). As células foram incubadas por 30 min. com 50µCi de 3mM Glutamato - L-H³ em PBS, lavadas duas vezes por centrifugação e ressuspensas em PBS. Depois do volume da amostra estar equilibrado a 500µl em PBS, as células foram tratadas com 1 vol. de 20% TCA, incubadas por 1 hora à temperatura ambiente e centrifugadas a 20000xg por 30 min.. A radioatividade incorporada a macromoléculas foi medida no pellet, este ressuspensionado em 0.1% SDS em Tris-HCl 0.015M, pH 7.4. A radioatividade no sobrenadante foi também medida e associada a metabólitos solúveis.

3.6 Análise de dados

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e são representativos de três experimentos independentes. A quantidade de radioatividade incorporada no ensaio de transporte por minuto (cpm_i) para cada ensaio experimental foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{cpm}_i = \text{cpm}_e - \text{cpm}_b$$

onde cpm_e é a média das amostras em triplicata depois de 30 segs. de incubação na presença de glutamato ou GABA radioativo, e cpm_b, e a média das cpms das amostras basais.

A incorporação de Glutamato ou GABA (G) foi calculada da seguinte forma:

$G_i = \text{cpm}_i (G) \cdot v \text{cpm}_{st}^{-1} t^{-1}$ onde, G_i é o glutamato ou GABA incorporado, (G) é a concentração nanomolar de glutamato ou GABA traçado radioativamente, v é o volume

de glutamato radioativo ($100\mu\text{l}$ nos ensaios), cpm_{st} é o total de cpms para o glutamato radiativo adicionado e t é o tempo de incubação medido em minutos.

As análises estatísticas, curvas de crescimento e regressão foram feitas com o programa estatístico OriginPro v7.5.

4 RESULTADOS

4.1 Transporte de glutamato em *T. cruzi*.

Para avaliar a incorporação de glutamato nas células, foi medida a incorporação desse aminoácido em função do tempo. Como esperado, obtiveram-se curvas de incorporação que ajustam a uma função exponencial. Mostrou-se também que a região inicial dessa curva pode ser considerada aproximadamente linear: os dados obtidos dentro dos primeiros 120 segundos ajustam a uma reta ($R^2=0,998$) (fig. 5), o que permitiu realizar dentro dessa janela de tempo as medições de V_0 .

Fig. 5. Incorporação de Glutamato em função do tempo. A incorporação foi aproximadamente linear até 120 segs (inserto).

Para calcular os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} foi analisada a velocidade inicial de incorporação de glutamato em função da concentração de substrato. Os dados obtidos foram ajustados a uma função hiperbólica de acordo com o modelo de Michaelis-Menten ($R^2= 0.989$, fig. 6). A partir desses dados, infere-se um sistema único de transporte com uma K_m de 0.30 mM e uma V_{max} de 98.34 pmoles min por 2×10^7

parasitas para formas epimastigotas, e 20 pmoles min por 2×10^7 parasitas para formas tripomastigotas.

Fig. 6. Medição da velocidade inicial de transporte de glutamato em função da concentração de glutamato. Os dados obtidos foram ajustados a uma função hiperbólica segundo o modelo de Michaelis–Menten. Os mesmos dados foram também representados mediante a transformação de Lineweaver – Burk (inserto).

O efeito do jejum sobre a $V_{\max}$ foi analisado pela incubação da parasitas em PBS a 28 °C, por diferentes tempos de até 3 horas, medindo a taxa do transporte de glutamato (fig. 7). Não foi detectado nenhum efeito significativo do jejum sobre o transporte.

Fig. 7. Efeito do jejum na incorporação de glutamato. Observa-se que a incorporação do glutamato não sofre variações com um tempo de jejum de até 3 horas.

Foi analisada a variação do transporte de glutamato com a temperatura. A incorporação de glutamato é praticamente indetectável entre 5 e 10 °C, e aumenta linearmente numa faixa de temperaturas de entre 15 a 40 °C, valor para o qual a atividade é máxima (fig. 8). Os valores na região linear da curva permitiram originar um gráfico de Arrhenius (fig. 8, inserto), a partir do qual foi possível calcular a energia de ativação do sistema, sendo esta de 52,38 kJ/mol.

Fig. 8. Variação da incorporação de glutamato em função da temperatura. No interior, observa-se a linearidade da temperatura de 15⁰C até 40⁰C obtendo-se a energia de ativação.

Para analisar a influencia do meio extracelular sobre o transporte de glutamato, diferentes tampões fosfato foram desenhados, nos quais o cátion Na⁺ pudesse ser substituído por K⁺ ou vice versa. Como controle foi utilizado um tampão no qual a força iônica foi ajustada com colina. Também o pH do PBS foi modificado, tendo sido levado a valores de 4.5 até 8. A atividade de transporte de glutamato foi medida nesses meios e em PBS (pH 7.4) como controle. O transporte de glutamato foi altamente sensível à concentração de H⁺ extracelular, mas não aos íons Na⁺ e K⁺ (figs. 9 e 10). Esses dados nos levaram a inferir que a força motriz do processo em análise poderia ser o gradiente de H⁺ através da membrana citoplásmica.

Com o propósito de analisar a possível fonte de energia que conduz o transporte de glutamato para o interior dos epimastigotas de *T. cruzi*, essa atividade foi medida na presença de uma mistura de inibidores da cadeia respiratória, rotenona e antimicina, e de um inibidor da ATPase F_1F_0 mitocondrial, oligomicina. A mistura de rotenona/antimicina, e oligomicina foram adicionadas ao começo do ensaio (0 min.) ou 30 minutos antes do começo do ensaio de transporte (fig. 11) para descartar um efeito direto dos inibidores sobre os transportadores (0 min) e confirmar que toda interferência observada com a atividade fosse devida a uma mudança (diminuição) dos níveis de ATP (pré-incubação de 30 min). Foi observado que o processo de transporte de glutamato é dependente de energia, já que diminui significativamente nessas condições experimentais. A partir da observação de que esse processo é sensível ao pH extracelular, foi levantada a hipótese de que a energia que conduz esse processo poderia ser derivada do gradiente de H^+ através da membrana citoplásmica. Para analisar essa possibilidade, as medições de transporte de glutamato foram feitas na presença de FCCP, um ionóforo de H^+ . Como pode ser observada, a atividade de transporte de glutamato diminuiu significativamente na presença de FCCP. Porém, a quebra do gradiente de H^+ na membrana interna da mitocôndria ativa a atividade $H^+/ATPase$ da ATPase F_1F_0 , no sentido do restabelecimento desse gradiente, o que reflete numa rápida diminuição da concentração de ATP na célula (Nicholls e Bud, 1998). Por tanto, nas condições deste experimento, poderiam estar se observando a somatória de dois fenômenos: a própria quebra do gradiente de H^+ , e a depleção de ATP pela ATPase F_1F_0 . Para poder discriminar esses efeitos, os ensaios com parasitas tratados com FCCP foram realizados na presença ou ausência de oligomicina. A diminuição do gradiente de H^+ da membrana plasmática foi observada pela diminuição da fluorescência em um microscópio de epifluorescência quando as parasitas foram incubadas com rodamina

123. Verificou-se ainda que nessas condições o transporte de glutamato fosse significativamente reduzido, demonstrando que esse processo é ativo (dependente de energia) e que a energia que o conduz é fornecida pelo gradiente de H^+ através da membrana plasmática.

Fig. 9. A dependência do pH na incorporação de glutamato no *T. cruzi*

Fig. 10. O efeito do cátion extracelular sobre a incorporação de glutamato.

Fig. 11. Efeito de inibidores da função mitocondrial sobre o transporte de glutamato em epimastigotas de *T. cruzi*.

Interessantemente, glutamato, aspartato e prolina, todos fonte de carbono e energia, são transportados na forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi* com uma atividade máxima em pH 5.0 (Silber *et al* 2006) - uma condição essencial para a diferenciação de epimastigotas a tripomastigotas (Contreras *et al*, 1985). O processo de transporte de glutamato foi significativamente inibido por aminoácidos neutros (alanina e metionina), básicos (glutamina e asparragina) e ácidos (aspartato), como também por intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (oxaloacetato e cetogluturato), quando ensaiados como competidores em concentrações dez vezes maiores a K_m do transporte (Tabela. 1).

Competidor	% Inibição $\pm$ SD
Glutamato	96.02 $\pm$ 2.26
Aspartato	98.24 $\pm$ 5.76
Glutamina	75.49 $\pm$ 3.27
Asparagina	74.15 $\pm$ 3.84
Alanina	96.98 $\pm$ 7,56
Arginina	18.38 $\pm$ 4.28
Lisina	29.03 $\pm$ 2.96
Metionina	51.99 $\pm$ 3.42
Prolina	30.77 $\pm$ 4.77
α -Cetogluturato	73.78 $\pm$ 5.43
Oxalacetato	77.90 $\pm$ 4.57

Tabela. 1. Porcentagem de inibição no transporte de glutamato por competição de aminoácidos.

Como mencionado anteriormente, GABA é um aminoácido cuja presença é conservada desde as bactérias até os mamíferos vertebrados, foi descoberto em plantas na metade do século 20 (Steward *et al.*, 1949), e apresenta semelhança estrutural com glutamato. Quando avaliado como competidor de glutamato, foi observado que o transporte de glutamato na presença de GABA não só que não diminui se não que aumenta significativamente a atividade com respeito ao controle, o que sugere a possibilidade de existir um receptor ou um transportador de GABA em *T. cruzi* (fig. 13). Não existem, até o presente momento, evidências bioquímicas da existência de um sistema de transporte GABA em tripanossomatídeos nem em outros protozoários.

Fig. 13. Incorporação de glutamato na presença de GABA como aminoácido competidor. Observa se um aumento na incorporação de glutamato em condições de transporte normal.

4.2 Transporte de GABA em *T. cruzi*.

Para determinar se existe uma atividade de transporte de GABA, foi avaliada a incorporação de GABA ao longo do tempo. As curvas obtidas ajustam a uma função exponencial, mostrando a existência de um sistema de transporte para este metabólito (fig. 14). A incorporação de GABA também mostrou ser linear por tempos de até 90 segundos, permitindo por tanto a medição de V_0 a utilizando tempos de incubação de até 30 segundos.

Para avaliar os parâmetros cinéticos do transporte de GABA, foi medida a V_0 em função da concentração de GABA. Os dados obtidos ajustaram a uma função hiperbólica de acordo com o modelo de Michaelis – Menten. Dos dados obtidos pode ser calculada uma $V_{\max}$ de 84.45 pmoles/min/ 20×10^6 células e uma K_m de 0.4 mM (fig. 15).

Fig. 14. Incorporação de GABA em função do tempo. A incorporação de 10mM de glutamato misturado com GABA- H^3 foi seguido no materiais e métodos. No interior do gráfico, observa-se a linearidade até 120 segs.

Fig. 15. Efeito da concentração de GABA em função da incorporação em *T. cruzi*.

O efeito do jejum sobre a $V_{\max}$ foi analisado mediante a incubação dos parasitas em PBS a 28°C, durante diferentes tempos até 3 horas, antes de medir o transporte de GABA. Nessas condições de ensaio, a $V_{\max}$ não variou significativamente durante um período de até 3 horas, similar ao observado no caso do transporte de glutamato (fig. 16).

Fig. 16. Efeito da privação de nutrientes em função do tempo. Observa-se que a incorporação do glutamato não sofre variações no tempo de até 3 horas.

A resposta do transporte de GABA à temperatura também foi analisada. Não foi observada uma atividade detectável para os ensaios feitos a temperaturas menores a 10°C, mas observou-se um aumento linear da atividade entre 15 a 40 °C. Nenhuma alteração na incorporação de GABA foi observada quando a temperatura aumentou à 45°C (fig. 17).

Para conhecer as influências das condições fisicoquímicas do meio extracelular no processo de transporte de GABA, novamente tampões fosfato foram utilizados, nos quais o cátion Na⁺ foi substituído por K⁺ ou vice versa. Também neste caso foi utilizado como controle um tampão no qual a força iônica foi ajustada com colina. Finalmente, também neste caso o pH do PBS foi modificado, tendo sido levado a valores de 4.5 até 8. A atividade de transporte de GABA foi medida nesses meios e em PBS (pH 7.4) como controle. O transporte de GABA foi sensível à concentração de H⁺ extracelular,

apresentando atividade máxima para valores entre 7.0-8.0. Em relação com a presença dos íons Na^+ e K^+ , interessantemente também foi observado um aumento da atividade em presença de K^+ (figs. 9 e 10).

Fig. 17. Variação da incorporação de GABA em função da temperatura. No interior, observa-se a linearidade da temperatura de 15⁰ C até 40⁰ C obtendo-se a energia de ativação.

Fig. 18. A dependência do pH na incorporação de GABA no *T. cruzi*.

Fig. 19. O efeito do cátion extracelular sobre a incorporação de GABA.

Com o propósito de confirmar a participação de H^+ como fonte de energia, o transporte de GABA foi analisado quanto sua atividade de transporte na presença de FCCP, da combinação de inibidores da cadeia respiratória rotenona e antimicina, e de um inibidor da ATPase F_1F_0 mitocondrial, oligomicina (fig. 20). Como feito no caso da análise do transporte de GABA, a mistura de rotenona/ antimicina, e a oligomicina foram adicionadas ao começo do ensaio (0 min.) ou 30 minutos antes do começo do ensaio de transporte, o que, novamente, permitiu diferenciar o efeito direto dos inibidores sobre o transporte (0 min.) do efeito da queda dos níveis de ATP (pré-incubação de 30 min.). Neste caso também, os ensaios com FCCP foram realizados na presença ou ausência de oligomicina. A diminuição do gradiente de H^+ da membrana plasmática foi observada pela diminuição da fluorescência em um microscópio de epifluorescência quando as parasitas foram incubadas com rodamina 123. Verificou-se ainda que, nessas condições, o transporte de GABA foi significativamente reduzido demonstrando que esse processo é ativo (dependente de energia) e que essa energia é fornecida pelo gradiente de H^+ através da membrana plasmática.

Fig. 20. Efeito de inibidores da função mitocondrial sobre o transporte de GABA em epimastigotas de *T. cruzi*.

5 DISCUSSÃO.

Em células neuronais os transportadores e receptores de aminoácidos são muito importantes na liberação e regulação da neurotransmissão sináptica (Seal e Edwards, 2006). Especificamente, transportadores de GABA e glutamato são cruciais na finalização da função sináptica dos neurotransmissores (Kanner, 2006); ambos usam a energia concentrada em gradientes eletroquímicos na membrana de neurônios e células gliais para permitir a liberação de GABA e glutamato na sinapse. Inspirando-nos nas características dos transportadores de glutamato e GABA do SNC, devido à não existência de outro modelo que apresente uma caracterização completa dos transportadores de glutamato e GABA, analisamos em *T. cruzi* como modelo da família dos tripanossomatídeos o processo de transporte de glutamato e GABA e sua fonte de energia. Encontrou-se em *T. cruzi* um sistema único de transporte, com uma K_m de 0,3 mM e uma V_{max} de 98,34 pmoles/min/20x10⁶ células e 20 pmoles/min/20x10⁶ para as formas tripomastigotas. A taxa de incorporação de glutamato não depende da privação de nutrientes por um período de até 3 horas, em contraste aos transportadores de alta e baixa afinidade da prolina (Silber *et al*, 2003), de alta afinidade da arginina (Pereira *et al*, 1999) e aspartato (Canepa *et al.*, 2005) em *T. cruzi*. Esse transporte mostrou ser dependente da temperatura, com uma linearidade entre 15 a 40°C. Quando o transporte foi analisado em função do pH, observou-se que apresentou uma atividade máxima em pH 5,0. Quando analisados outros íons (Na^+ e K^+ e colina) não houve influência significativa sobre a atividade. Isto sugere que o transporte de glutamato poderia ser dependente do gradiente de H^+ na membrana plasmática, como descrita por outros autores para outros transportadores de aminoácidos em *T. cruzi* (Silber *et al*, 2002; Canepa *et al*, 2004; 2005). A inibição do transporte sob condições que causam queda no

gradiente de H^+ na membrana plasmática, sem diminuir os níveis de ATP devido a inibição da F_1F_0 ATPase com oligomicina, fundamentam esta hipótese.

Em relação ao sistema nervoso, existe o consenso de que em meios de cultivos primários para astrócitos, a 25mM de glicose, a incorporação de glutamato é dependente da glicólise (Pellerin e Magistretti, 1994). Isto e outros dados indicam que a maioria da glicose no cérebro é metabolizada no astrócito via glicólise, e que o piruvato gerado é transferido do astrócito ao neurônio onde é oxidado. Além disso, glutamato poderia induzir a glicólise no astrócito (Dienel e Cruz, 2004), e poderia ser convertido a glutamina por uma glutamina sintetase específica de astrócitos (Norenberg e Martinez-Hernandez, 1977; Derouiche, 2004) ou oxidado a α -cetoglutarato por deaminação (Weestergard *et al.*, 1996), ou transaminação (McKenna *et al.*, 1996). O glutamato é oxidado nos astrócitos quando se apresenta em altas concentrações, e é principalmente convertido a glutamina quando presente em baixas concentrações (McKenna *et al.*, 1996). A glutamina pode ser transformada em GABA no astrócitos, para posteriormente ser transaminado e oxidado a succinato, e finalmente oxidado a CO_2 e H_2O ou sair do ciclo de Krebs via α -cetoglutarato para ser reconvertido a glutamato novamente, o qual pode eventualmente ser um precursor da glutamina sintase para formar glutamina. Este ciclo glutamato-glutamina, acontece no cérebro *in vivo* (Sibson *et al.*, 1998). É possível que *T. cruzi* possua um ciclo glutamato-glutamina em seu metabolismo intermediário? Os tripanossomas tem a habilidade de usar prolina (uma das principais fonte de glutamato) como fonte de energia e este mecanismo é dependente da disponibilidade das concentrações de glicose (Lamour *et al.*, 2005). A caracterização do transporte de glutamato poderia ajudar a entender as características bioquímicas do metabolismo interno dos tripanossomas em relação às vias e fontes de energia que os parasitas

utilizam em seu ciclo de vida, e as possibilidades de encontrar novas vias metabólicas e novas funções biológicas de glutamato e sua conversão a glutamina e GABA.

O processo de transporte de glutamato foi significativamente inibido por aminoácidos neutros (alanina e metionina), básicos (glutamina e asparagina) e ácidos (aspartato), e por intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (oxaloacetato e cetoglutarato) quando foram ensaiados com concentrações dez vezes maiores que a concentração utilizada para glutamato (0,3mM, a concentração do K_m). Isso indica que o transporte de glutamato poderia envolver um ou mais transportadores de baixa especificidade, ou talvez, poderia existir um mecanismo de transporte geral para aminoácidos estruturalmente relacionados, como por exemplo, glutamato, aspartato, asparagina e glutamina. Quando foi analisada a competição com o aminoácido GABA, o transporte de glutamato aumentou significativamente, o que sugere que GABA estimula o transporte de glutamato em *T. cruzi*, ou tal vez, GABA estaria regulando os níveis de incorporação de glutamato no ciclo de vida do parasita, possivelmente participando do controle do metabolismo energético, atuando como segundo mensageiro (ver revisão de Danbolt, 2001), ou regulando os níveis de expressão dos transportadores de glutamato, como foi já descrito para o transporte de GABA no modelo de neurônio (Bernstein e Quick, 1999). Se estas hipóteses forem confirmadas, os transportadores de GABA e glutamato poderiam estar funcionando como reguladores das concentrações extracelulares de GABA e glutamato (Bernstein e Quick, 1999), e os aminoácidos extracelulares (como o próprio GABA ou glutamato) poderiam regular a função destes transportadores (Quick, 2002) sendo peças chaves na dinâmica transportador-metabólito (Bernstein e Quick, 1999) no parasita. Seria interessante (e tentador) analisar se existe alguma associação metabólica que controle o processo de transporte de GABA e glutamato com seus metabólitos respectivos na parasita.

Interessantemente, ainda não está demonstrada a atividade enzimática da GAD e GABA-T para confirmar a participação da via metabólica de GABA no metabolismo energético do *T. cruzi*.

O transporte de GABA foi também analisado, verificou-se também um único sistema de transporte, com uma K_m de 0,4 mM e uma V_{max} de 84,45 pmoles/min x 20×10^6 células. O transporte igualmente mostrou ser dependente da temperatura, com uma linearidade entre 15-40°C. Quando analisada a variável pH, foi observado um pico máximo na faixa de pH entre 7,0- 8,0, provavelmente indicando que o transporte poderia ser eficiente nas formas amastigotas e tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*. Similarmente ao observado para glutamato, a privação de nutrientes não alterou o perfil do transporte de GABA por um período de 3 horas. A respeito da dependência dos íons, o transporte de GABA mostrou uma alta sensibilidade a K^+ , um resultado relevante devido ao fato que, no modelo de neurônio, o transporte de GABA está relacionado funcionalmente a canais de K^+ permitindo a excitabilidade e despolarização da sinapse (Gage, 1992). Recentemente, tem sido demonstrado que os transportadores de neurotransmissores podem ter uma função de canal (Vanderberg e Ryan, 2005). Carvelli *et al.*, 2004, usando o elegante modelo de *Caenorabhditis elegans* demonstrou que os transportadores de dopamina dependente de Na^+ e Cl^- têm atividade de canal e as consequências funcionais da ativação foram analisadas. Yernool *et al*, 2004, demonstrou a estrutura do transportador de glutamato e a relação transporte-canal. Além disso, em um protozoário relacionado filogeneticamente com *T. cruzi*, *Leishmania major* (Vieira *et al*, 1996), foi demonstrada bioquimicamente usando bloqueadores de transporte aniônico a participação de um canal ativado por aminoácidos no processo de osmorregulação.

Similarmente, ao observado no transporte de glutamato, a fonte de energia do transporte de GABA é o gradiente de H^+ na membrana plasmática. A inibição do transporte de GABA sob condições que induzem uma queda no gradiente de H^+ na membrana plasmática, sem diminuir os níveis de ATP devido a inibição da ATPase F_1F_0 com oligomicina, demonstra esse fato. As características principais dos transportadores de aminoácidos bioquimicamente caracterizados em *T. cruzi* estão resumidas na tabela 2.

Tabela 2.

Caracterização de transportadores de aminoácidos em epimastigotas de *T. cruzi*

Transportador	K _m ^a	V _{max} ^b	pH ótimo	Fonte de Energia	Referença
Glutamato	0.22	0.09	5	Gradiente de H ⁺	Silber <i>et al.</i> , 2006
Aspartato	0.032	0.0068	4	ND	Canepa <i>et al.</i> , 2005
Prolina A	0.31	0.012	4.5 - 5.0	Gradiente de H ⁺	Silber <i>et al.</i> , 2002
Prolina B	1.36	0.065	5 - 8.0	ATP	Silber <i>et al.</i> , 2002
Arginina de baixa Afinidade	0.35	0.195	4.5 - 5.5	Gradiente de H ⁺	Canepa <i>et al.</i> , 2004
Arginina de Alta Afinidade	0.0049	0.0352	5.5 - 8.5	ATP	Pereira <i>et al.</i> , 1999
GABA	0.45	0.08	6.5 - 8.5	ATP	Manuscrito em preparação

^a K_m, mM.

^b V_{max}, nmoles min⁻¹ por 2x10⁷ células.

Diferentes hipóteses têm sido propostas para explicar a progressão cardíaca e a fase crônica da doença Chagas (Factor e Wittner, 1985; Morris *et al.*, 1990; Bestetti e Rossi, 1997), e ainda não existe consenso definitivo sobre os mecanismos específicos que originam a patologia. Várias linhas de evidência mostram uma relação entre o sistema nervoso e a patologia da doença Chagas (para uma revisão ver Davila *et al.*, 2004). Na infecção crônica, o *T. cruzi* apresenta-se em um 72.7% dos casos em fluidos espinais do cérebro, e está bem documentada a ocorrência de manifestações clínicas de alterações neurológicas, tais como encefalites e meningites (Hoff *et al.*, 1985). Nesse

sentido, foi proposta uma nova hipótese neurogênica (Davila *et al*, 2004) que relaciona alterações no sistema nervoso simpático e parassimpático com outros sistemas neuro-hormonais que seriam afetados pelo *T. cruzi*. Se essa hipótese for confirmada, poderia ser proposto que os mecanismos de transporte de glutamato e GABA do *T. cruzi* perturbariam a função da sinapse neurocardíaca através do bloqueio, liberação ou outras interações com esses neurotransmissores da interação miocárdócito-neurônio.

A quimioterapia da doença Chagas é pouco efetiva, por tanto é interessante propor novas vias metabólicas para serem analisadas como alvos terapêuticos. Uma maior caracterização e compreensão das interações entre os mecanismos de transporte de glutamato e GABA em *T. cruzi*, a caracterização das suas vias metabólicas, a relação dos transportadores de glutamato e GABA com diferentes bloqueadores e inibidores do sistema nervoso central, poderiam ser prometedora no desenvolvimento de novas abordagens na quimioterapia da doença Chagas. Virtualmente todos os elementos do sistema de transporte e receptores de glutamato e GABA no sistema nervoso tem sido considerado como potenciais alvos terapêuticos para doenças psiquiátricas nas quais esses neurotransmissores participam (ver revisão de Foster e Kamp, 2006). Reguladores alostéricos de transportadores e receptores de GABA como benzodiazepinas são de uso clínico, e antagonistas de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (cetamine e memantine) tem utilidade terapêutica hoje (ver revisão de Foster e Kamp, 2006).

6 CONCLUSÕES.

No presente trabalho objetivou-se conhecer mais profundamente o metabolismo de aminoácidos, caracterizando dois sistemas de transporte para dois desses substratos (glutamato e GABA) que participam no ciclo de vida de *T. cruzi*. A partir dos dados obtidos pode-se concluir:

- I.** Formas epimastigotas de *T. cruzi* apresentam um mecanismo de transporte de glutamato. Sua fonte de energia é o gradiente de H^+ na membrana plasmática.
- II.** Formas epimastigotas de *T. cruzi* apresentam um mecanismo de transporte de GABA. Sua fonte de energia é o gradiente de H^+ na membrana plasmática.
- III.** GABA aumenta a incorporação de glutamato em formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Ainda não tem sido demonstrada a via GABA no ciclo de vida em *T. cruzi*, vias metabólicas que ainda não tem sido bem caracterizadas em modelos patógenos humanos. Aprofundar o conhecimento dos mecanismos bioquímicos e moleculares do transporte de glutamato e GABA poderia levar ao desenvolvimento de novas e mais eficazes terapias na doença Chagas. Por tanto, as vias metabólicas de glutamato e GABA, são excelentes alvos para o desenho de drogas.

7. REFERÊNCIAS.

- Anez, N., Carrasco, H., Parada, H., Crisante, G., Rojas, A., Fuenmayor, C., Gonzalez, N., Percoco, G., Borges, R., Guevara, P. and Ramirez JL. (1999). Myocardial parasites persistence in chronic chagasic patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60: 726-732.
- Andrade, ZA. (1999). Immunopathology of Chagas Disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94 (suppl. I): 71-80.
- Almeida de Faria, M., Freydmuller E., Colli, W. and Alves, MJ. (1999). *Trypanosoma cruzi*. Characterization of an intracellular epimastigote-like form. *Exp. Parasitol.*, 92: 263-274.
- Almeida, Gilmartin, BJ., McCann., SH., Norrish, A., Ivens, AC., Lawson, D., Levick, MP., Smith, DF., Dyll, SD., Vetrie, D., Freeman, FC., Coulson, TM., Sampaio, I., Schneider, H., and Blacwell, JM. (2004). Expression profiling of the *Leishmania* life cycle: cDNAs arrays identify developmentally regulated genes presents but not annotated in the genome. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 136(1): 87-100.
- Anjard, C. and Loomis, W. (2006). GABA induces terminal differentiation of *Dictyostelium* through a GABA_B receptor. *Development*. 2006, 133(11):2253-61.
- Atwood, JA., Weatherly, DB., Minning, TA., Bundy, B., Cavola, C., Opperdooes, FR., Orlando, R. and Tarleton, RL. (2005). The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Sciences*, 309: 473-476.
- Auerswald, L., Schneider, P. and Gade, G. (1998). Utilisation of substrates during tethered flight with and without lift generation in the African fruit beetle *Pachnoda sinuata* (Cetoniinae). *J. Exp. Biol.*, 20: 2332-2342.
- Bakker, BM., Walsh, MC., ter Kuile, BH., Mensonides, FI., Michels, PA., Opperdooes, FR. and Westerhoff., HV. (1999). Contribution of glucose transport to the control of the

glycolytic flux in *Trypanosoma brucei*. Proc. Natl. Aca. Sci. USA, 96(18): 10098-10103.

Barrett, FM. (1974). Changes in the concentration of free amino acids in the haemolymph on the *Rhodnius prolixus* during the fifth instar. Com. Biochem. Physiol., B48: 241-250.

Barrett, MP., Tetaud, E., Seyfang, A., Bringaud, F. and Baltz, T. (1998). *Trypanosome* glucose transporters. Mol. Biochem. Parasitol., 91(1): 195-205.

Bergles, DE, Roberts, JD, Somogy, P. and Jahr, CE. (2000). Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. Nature, 405: 187-191.

Bernstein, EM. and Quick, M. (1999). Regulation of gamma-aminobutyric acid (GABA) transporters by extracellular GABA. J. Biol. Chem., 274: 889-895.

Bestetti, RB. and Rossi, MA. (1997). A rationale approach for mortality risk stratification in Chagas' heart disease. Int. J. Cardiol., 58: 199-209.

Bouvier, LA., Silber, AM., Galvão Lopes, C, Canepa, GE., Miranda, MR., Tonelli, RR., Colli, W., Alves, MJ. and Pereira, CA. (2004). Post genomic analysis of permeases from the amino acid/auxin family in protozoan parasites. Biochem. Biophys. Res. Commun., 321(3): 547-556.

Bouché, N. and fromm, H. (2004). GABA in plants: just a metabolite?. Trends Plant. Sci., 9: 110-115.

Brener, Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. Annu. Rev. Microbiol., 27: 347-382.

Caldas, RA., Araújo, E., Felix, CR. and Roitman, I. (1980). Incorporation of ammonium in amino acids by *Trypanosoma cruzi*. J. Parasitol., 66(2): 213-216.

Brener, Z., Andrade, Z., Barral-Neto, M. (2000). *Trypanosoma cruzi* e Doença Chagas, 2 edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 431 pp.

- Camargo, EP. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I origin of metacyclics trypanosomes in liquid media. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 12:93-100.
- Cancado, JR. In Clínica e Terapêutica da Doença Chagas; Pinto Diaz, JC; Coura, JR: Editora Fiocruz: Rio de Janeiro, Brasil, 1997, pp: 323-351.
- Canepa, GE., Silber, AM., Bouvier, LA. And Pereira, CA. (2004). Biochemical characterization of a low-affinity arginine permease from the parasite *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol. Lett., 236: 79-84.
- Canepa, GE., Bouvier, LA., Arias, U., Miranda, MR., Colli, W., Alves, MJ. and Pereira, CA. (2005). Aspartate transport and metabolism in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol Lett., 247: 65-71.
- Carvelli, L., McDonald, PW., Blakely, RD. And DeFelice, LJ. (2004). Dopamine transporters depolarize neurons by a channel mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 101: 16046-16051.
- Cazzulo, JJ., Cazzulo Franke MC. and Franke de Cazzulo, BM. (1989). On the regulatory properties of the pyruvate kinase from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. FEMS Microbiol. Lett., 50(3): 259-263.
- Cazzulo, JJ. (1992). Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. FASEB J., 6(13): 3153-3161.
- Cazzulo, JJ. (1994). Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. J. Bioenergetic. Biomembr., 26(2): 157-165.
- Cazzulo, JJ., de Cazzulo, BM., Higa, AI. And Segura, EL. (1979). NAD-linked glutamate dehydrogenase in *Trypanosoma cruzi*. Comp. Biochem. Physiol., B 64: 129-131.
- Collingridge, GL. and Lester, RAJ. (1989). Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. Pharmacol. Rev., 40: 143-210.

Contreras, VT. Salles, JM., Thomas, N., Morel, C., Goldenberg, S. (1985). *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. Mol. Biochem. Parasitol., 16: 315-327.

Croft, SC., Urbina, JA. and Brun, R. In trypanosomiasis and leishmaniasis; Hide, G. Mottram, JC; Coombs, GH; Holmes, PH., eds.: CAB International: London 1997; pp. 245-257.

Danbolt, NC. (2001). The glutamate uptake. Prog. in Neurobiol, 65: 1-105.

Davila, DF, Donis, JH., Torres, A. and Ferrer, JA. (2005). A modified and unifying neurogenic hypothesis can explain the natural history of Chronic Chagas' Heart Disease. Int. J. Cardiol., 103(2): 227-229.

Delmonte, UM. Et al. (2002). Detection of molecules related to the GABAergic system in a single-cell eukaryote *Paramecium primaurelia*. Neurosci Lett. 2002, 23; 329(1):658.

Derouiche, A. (2004). The perisynaptic astrocyte process as a glial compartment-immunolabelling for glutamine synthetase and other glials markers. In: Hertz, L. (Ed.), Non-neuronal cells of the nervous system, Function and Dysfunction, vol. 1, Elsevier, Amsterdam, pp: 147-163.

Dienel, GA. and Cruz, NF. (2004). Nutrition during brain activation: does cell-to-cell lactate shuttling contribute significantly to sweet and sour food for thought?. Neurochem. Int., 45: 321-351.

Docampo, R. Chem-Biol.Interactions, 1990, 73, 1.

Docampo, R. Moreno, SNJ. Federation Proc., 1986, 45, 2471.

Duschak, VG. and Cazzulo, JJ. (1994). Subcellular localization of glutamate dehydrogenase and alanine aminotransferase in apimastigote of *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol. Lett., 67: 131-135.

- Evans, DA. And Brown, RC. (1972). The utilization of glucose and proline by culture forms of *Trypanosoma brucei*. J. Protozool., 19: 686-90.
- Foster, AC. and Kamp, JA. (2006). Glutamate-and-GABA based CNS therapeutics. Curr. Opinion Pharmacol., 6: 7-17.
- Factor, SM., Cho, S. and Wittner, M. (1985). Abnormalities of the coronary micro-circulation in the acute murine Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., 34: 246-253.
- Fonnum, F. (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. J. Neurochem., 42: 1-11.
- Ford, WC. And Bowman, IB. (1973). Metabolism of proline by the culture midgut form of *Trypanosoma rhodesiense*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 67(2): 257.
- Frasc, AC. (2000). Functional diversity in the trans-sialidase and mucine families in *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Today 16(7): 282-286.
- Fumarola, C., Zerbini, A. and Guidotti, GG. (2001). Glutamine deprivation-mediated cell shrinkage induces ligand-independent CD95 receptor signaling and apoptosis. Cell Death Differ., 8: 104-1013.
- Frydman, B., de los Santos, C, Cannata, JJ. and cazzulo, JJ. (1990). Carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of 1-13C glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi*. Evidence of the presence of two alanine pools and two CO₂ fixations reactions. Eur. J. Biochem., 192(2): 363-368.
- Gage, PW. (1992). Activation and modulation of K⁺ neuronal channels by GABA. Trends neurosci., 15: 46-51.
- Goldberg, SS., Silva Pereira, AA., Chiari, E., Mares-Guia, M. and Gazzinelli, GJ. (1976). 23, 179.

- Guizouarn, H., Motais, R., García-Romeu, F. and Borgese, F. (2000). Cell volume regulation: the role of taurine loss in maintaining membrane potential and cell pH. *J. Physiol.*, 253:147-154.
- Hampton, JR. (1970). Lysine uptake in cultured *Trypanosoma cruzi*: interactions of competitive inhibitors. *J. Protozool.*, 17(4): 597-600.
- Hampton, JR. (1970). Arginine transport in the culture form of *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.*, 18(4): 701-703.
- Harington, JS. (1956). *Nature* 178, 268.
- Harington, JS. (1961). *Parasitology* 51, 309.
- Headley, PM. and Grillier, S. (1990). Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidences for a physiological function. *Trends Pharmacol. Sci.*, 11: 205-211.
- Higuchi, ML., Brito, T., Reis, M., Belloti, G., Pereira-Barretto, AM., and Pileggi, F. (1993). Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammation in human chronic chagasic myocarditis. Light microscopy and imunohistochemical findings. *Cardiovas. Pathol.*, 2: 101-106.
- Higuhi, ML., Reis, M., Aiello, VD., Benvenuti, LA., Gutierrez, PS., Bellotti, G. and Pileggi, F. (1997). Human chronic chagasic myocarditis is *Trypanosoma cruzi* antigen and CD8⁺ T cell dependent. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 56: 485-489.
- Higuchi, ML. (1999). Human chagasic cardiopathy: participation of parasite antigens, subsets lymphocytes, cytokines and microvascular abnormalities. *Mem. Inst. Oswaldo cruz* 94 (suppl. I), 263-267.
- Hoff, R., Todd, CW., Maguire, JH., Piesman, J., Mott, KE., Motta, EE., Sleight, A., Sherlock, IA. and Weller, TH. (1985). Serologic surveillance of Chagas' Disease. *An. Soc. Bel. Med. Trop.*, 65: 187-196.

- Hosie, AM., Aronstein, K., Sattelle, DB., Ffrench-Constant, RH. (1997). Molecular biology of the insects neuronal GABA receptors. *Trends Neurosci.*, 20: 578-583.
- Hosli, E. and Hosli, L. (1993). Receptors for neurotransmitters on astrocytes in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, 40: 477-506.
- Jonez, EM., Colley, DG., Tostes, S., Lopez, ER., Venecak-Jones, C. and Mc Curley, TL. (1993). Amplification of *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48: 348- 357.
- Kornau, HC. (2006). GABA(B) receptors and synaptic modulation. *Cell Tissue Res.* Nov;326 (2): 517-33.
- Krassner, SM. And Flory, B. (1972). Proline metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Protozool.*, 19: 682-685.
- Juan, SM., Segura, EL., Cazzulo, JJ. (1978). Purification and some properties of the NADP-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Biochem.*, 9: 395-400.
- Kanner, BI. (2006). Structure and Function of Sodium-coupled GABA and Glutamate Transporters. *J Membr Biol.* 2006 Sep; 213(2):89-100.
- Lamour, N., Riviere, L., Coustou, V., Coombs, GH., Barrett, M. and Bringaud, F. (2005). Proline metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei* is down regulated in the presence of glucose. *J. Biol. Chem.*, 280: 11902-11910.
- Law, SS. and Mukkada, AJ. (1979). Transport of L-proline and its regulation in *Leishmania major* promastigotes. *J. Protozool.*, 26(2): 295-301.
- L'Hostis, C., Geindre, M. and Deshusses, J. (1993). Active transport of L-proline in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochemical J.*, 291 (Pt 1):297-301.

Mancilla, R., Naquira, C., Lanas, C. (1967). Protein biosynthesis in trypanosomatidae II. The metabolic fate of DL- Leucine-1-C14 in *Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasitol., 21: 154-159.

Montemartini, M., Santome, JA., Cazullo, JJ. and Nowicki, C. (1993). Purification and partial structural and kinetic characterization of tyrosine aminotransferase from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Biochem., J., 292(Pt3), 901-906.

Bua, J., Bontempi, E., Zelada, C., Ruiz, AM., Santome, JA., Cazzulo, JJ., and Nowicki, C.(1995). A recombinant tyrosine aminotransferase from *Trypanosoma cruzi* has both tyrosine aminotransferase and alanine aminotransferase activities. FEMS Microbiol. Lett., 133(1-2): 17-20.

Moriyama, Y., Hayashi, M., Yamada, H., Yatsushiro, S., Ishio, S. and Yamamoto, A. (2000). Synaptic-like microvesicles, synaptic vesicle counterparts in endocrine cells, are involved in a novel regulatory mechanism for the synthesis and secretion of hormones. J. Exp. Med., 203: 117-125.

Morris, SA., Tanowitz, HB., Wittner, M. and Biliezikian, JP. (1990). Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas's Disease. Circulation, 82: 1900-1909.

Nicholls, DG. And Bud, SL. (1998). Mitochondria and neuronal glutamate excitatory. Biochim. Biophys. Acta, 1366: 97-112.

Noremborg, MD. and Martinez-Hernandez, A. (1977). Fine structural localization of glutamine sintetase in astrocytes of rat brain. Brain Res., 161: 303-310.

Obungu, VH., Kiaira, JK., Njogu, RM., Olembo, NK. (1999). Catabolism of proline by procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei*. Biochim. Biophys. Acta, 123: 97-112.

Oppendoes, F. and Borst, P. (1977). Localization of nine glycolytic enzymes in a microbodie-like organelle in *Trypanosoma brucei*: glycosome. FEBS Lett., 76(1): 21-8.

- Ottersen, OP. And Storm-Mathisen, J. (1984). Neurons containing or accumulating transmitter's amino acids. In: Bjorlund, A., Hokfelt, T., Kuhar, MJ. (editors), Handbook of chemically neuroanatomy. In: classically transmitters and transmitter's receptors in the CNS, Vol 3, part II, Elsevier, Amsterdam, pp: 141-246.
- Patrick, ML and Bradley, TJ. (2000). The physiology of salinity tolerance in larvae of the two species the *Culex* mosquitoes: the role of compatible solutes. J. Exp. Biol., 203: 821-830.
- Pellerin, L. and Magistretti, PJ. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 10625-10629.
- Pereira, CA., Alonso, GD., Paveto, MC., Flawia, MM., Torres, HN. (1999). L-arginine uptake and L-phosphoarginine synthesis in *Trypanosoma cruzi*. J. Eukaryot. Microbiol., 46: 566-570.
- Pereira, CA., Alonso, GD., Paveto, MC., Iribarren, A, Cabanas, ML., Torres, HN., Flawia, MM.(2000). *Trypanosoma cruzi* arginine kinase characterization and cloning. A novel energetic pathway in protozoan parasites. J. Biol. Chem., 275: 1495-1501.
- Pereira, CA., Alonso, GD., Ivaldi, S., Silber, AM., Alves, MJ., Bouvier, LA., Flawia, MM., and Torres, HN. (2002). Arginine metabolism in *Trypanosoma cruzi* is coupled to parasite stage and replication. FEBS Lett., 526: 111-114.
- Pereira, CA., Alonso, GD., Ivaldi, S., Silber, AM., Alves, MJ., Torres, HN., and Flawia, MM. (2003). Arginine kinase overexpression improves *Trypanosoma cruzi* survival capability. FEBS Lett, 554: 201-205.
- Quick, M. (2002). Substrates regulate *gamma*-aminobutyric acid transporters in a syntaxin 1A dependent manner. Proc. Natl. Aca. Sci. USA 99: 5686-5691.

Ramoino, P. et al. (2006). Endocytosis of GABA_B receptors modulates membrane excitability in the single-celled organism *Paramecium*. J Cell Sci. 2006, 15; 119(Pt 10):2056-64.

Rassi, A., Luquetti, AO., Ornelas, JF., Ervilha, JF., Rassi, GG., Rassi Junior, A., Azeredo, BV. and Dias, JC. (2003). Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 36, 719.

Rodriguez Coura, J. and de Castro, SL. (2002). A critical review on Chagas' Disease Chemotherapy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97(1): 3-24.

Schousboe, A. and Waagepetersen, HS. (2007). GABA: homeostatic and pharmacological aspects. Prog. Brain Res., 160: 9-19.

Seal, RP. And Edwards, RH. (2006). Functional implications of neurotransmitter co-release: glutamate and GABA share the load. Curr Opin Pharmacol., 6(1):1149.

Sibson, NR., Dhankhar, A., Mason, GF., Rothman, DL., Behar, KL. and Shulman, RG. (1998). Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65: 316-321.

Silber, AM., Tonelli, RR., Martinelli, M., Colli, W. and Alves, MJ. (2002). Active transport of L-Proline in *Trypanosoma cruzi*. J. Eukaryot. Microbiol., 49: 441-446.

Silber, AM, Galvez Rojas, RL., Arias, U., Colli, W. and Manso Alves, MJ.(2006). Biochemical characterization of the glutamate transport in *Trypanosoma cruzi*. Int., J. Parasitol., Feb; 36(2):157-63

Silber, AM., Colli, W., Ulrich, H., Alves, MJ. And Pereira, CA. (2005). Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*. Possible therapeutic targets against Chagas disease. Curr. Drugs Targets Infect. Disord., 5: 53-64.

Soares, MJ. and de Souza, W. (1988). Cytoplasmic organelles of trypanosomatids: a cytochemical and stereological study. J. Submicrosc. Cytol. Pathol., 20(2): 349-61

- Sosa-Stani, S, Segura, EL., Ruiz, AM., Velasquez, E., Porcel, BM. and Yampotis, C. (1998). Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 59(4): 526-529.
- Steward, GR. *Et al.* (1949). *Gamma*-aminobutyric acid. A constituent of the potato tuber. *Science*, 110: 439-440.
- Stoppani, AOM. *Medicina*, 1990, 59 (supl.II), 147.
- Sylvester, D. and Krassner, SM. (1976). Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp. Biochem. Physiol.*, B 55: 443-447.
- Taylor, M. and Gutteridge, WE. (1986). The regulation of phosphofructokinase in *Trypanosoma cruzi* epimastigote. *FEBS Lett.*, 201(2): 262-266.
- Teixeira, SM., Nascimento, JR. and Sturm, NR. (2006). Evolution and Pathology in Chagas' Disease- a Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101(5): 463-491,
- Temperton, NJ., Wilkinson, SR., Meyer, DJ. and Kelly, JM. (1998). Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violets and benznidazole.. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 96(1-2): 167-176.
- Ter Kuile, BH. And Opperdoes, FR. (1992). Comparative physiology of two protozoan parasites, *Leishmania donovani* and *Trypanosoma brucei*, grown in chemostats. *J. Bacteriol.*, 174: 2929-2934.
- Tetaud, E., Barrett, MP., Bringaud, F and Baltz, T. (1997). Kinetoplastid glucose transporters. *Biochem. J.*, 317 (Pt 2):353-9.
- Tobe, SS. (1978). Changes in free amino acids and peptides in the haemolymph of *Glossina austeni* during the reproductive cycle. *Experientia*, 34: 1462-1463.

Tonelli, RR., Silber, AM., Almeida de Faria, M., Hirata, IY., Colli, W. and Alves, MJ. (2004). L-Proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell. Microbiol.*, 6: 733-741.

Tyler, KM. And Engman, DM. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int. J. Parasitol.*, 31: 472-481.

Urbina, JA. and Crespo, A. (1984). Regulatory of energy metabolism in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes. I Hexokinase and Phosphofructuokinase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 11: 225-239.

Urbina, JA. and Docampo, R. (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.*, 19(11):495-501.

Vanderberg, RJ., Ju, P., Aubrey, KR., Ryan, RM., And Mitrovic, AD. (2004). Allosteric modulation of neurotransmitter transporters at excitatory synapses. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 23: 1-11.

Vanderberg, RJ. And Ryan, RM. (2005). How and why are channels in transporters?. *Science*, 17: 1-2.

Van der Heyden, N. and Docampo, R. (2002). Proton and sodium pumps regulate the plasma membrane potential of different stages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 120(1): 127-139.

Vernadakis, A. (1996). Glia-neuron a intercommunications and synaptic plasticity. *Prog. Neurobiol.*, 49: 185-214.

Vieira, LL., Lafuente, E., Gamarro, F., Cabantchik. IZ. (1996). An amino acid channel activated by hipotonically induced swelling of *Leishmania major* promastigotes. *Biochem. J.*, 319: 691-697.

- Viotti, R., Vigliano, C., Armenti, H. and Segura, E. (1994). Treatment of Chronic Chagas' Disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am. Heart J.*, 127 (1): 151-162.
- Weestergard, N., Drejer, J., Schousboe, A., and Sonnewald, A. (1996). Evaluation of the importance of transamination versus deamination in astrocytic metabolism of C¹³-glutamate. *Glia* 17: 160-168.
- Wigglesworth, VB. (1972). The principles of the insects' physiology. 5 th edn., London, Chapman and Hall.
- Yancey, PH., Clark, ME, Hand, SC., Bowlus, RD. And Somer, GN. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 217: 1214-1222.
- Yernool, D., Boudker, O., Jin, Y. and Gouax, E. (2004). Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature*, 431: 811-818.
- Yoshida, N and Camargo, E. (1978). Urotelism and ammonotelism in trypanosomatids. *J. Bacteriol.*, 136(3): 1184-1186
- Zelada, C., Montemartini, M., Cazullo, JJ. and Nowicki, C. (1996). Purification and partial structural and kinetic characterization of an alanine aminotransferase from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 79(2): 225-228.
- Zeledon, R. (1960). 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.*, 46: 541-551.

Anexo II. Resumos enviados a congressos.

Resumo

Galvez RL, Frossard M, Motta MC and Silber AM (2005). The Trypanosomatid *Crithidia deanei* is unable to uptake D-glucose but it actively takes up L-Proline. XXI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, and, XXXII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease, pág. 100, November 7-9, Caxambu, MG, Brasil.

Covarrubias C., Galvez RL., Silber AM. and Yoshida N. (2006). Differential use of glucose and amino acids by metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* strains CL and G as source of energy for the host cell invasion. XXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, and, XXXIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease, pág. 46, November 6-8, Caxambu, MG, Brasil.

Silva Paes L., Galvez RL. and Silber AM. (2006). Cloning and characterization of gene coding the proline oxidase of *Trypanosoma cruzi*. XXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, and, XXXIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease, pág. 76, November 6-8, Caxambu, MG, Brasil.

Galvez RL., Daliry A., Silva Paes L., Ramires MI., Floeter Winter L. and Silber AM. (2006). The glutamate uptake in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. XXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, and, XXXIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease, pág. 117, November 6-8, Caxambu, MG, Brasil.