Flávia Silva Damasceno

Papel da glutamina na biologia do *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*.

Tese 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 Doutor em Ciências.

São Paulo
2017

Flávia Silva Damasceno

Papel da glutamina na biologia do *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*.

Tese 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 Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Ariel Mariano Silber

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Damasceno, Flávia Silva
Papel da glutamina na biologia do Trypanosoma cruzi e Trypanosoma brucei. / Flávia Silva Damasceno; orientador Ariel Mariano Silber. -- São Paulo, 2017.
166 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Trypanosoma cruzi. 2. Trypanosoma brucei. 3. Glutamina. 4. Doença de Chagas. . 5. Poliglutamilação. I. Silber, Ariel Mariano , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Flávia Silva Damasceno

Titulo da Tese: Papel da glutamina na biologia do *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*.

Orientador: Prof. Dr. Ariel Mariano Silber

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

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 **96** nas fls. **09** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Ariel Mariano Silber,** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Rol da glutamina sintetase na biologia do Trypanosoma cruzi , e perspectivas como um possível alvo terapêutico*" do qual participam o(s) aluno(s) **Flávia Silva Damasceno,** 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 **29.10.2013, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 30 de outubro de 2013.

P/ Dunes

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

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.071/2015.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 096/2013/CEUA, informo que o título do Projeto foi alterado para *"Papel da glutamina e glutamina sintetase na biologia da Trypanosoma cruzi"* sem modificações de seu conteúdo.

São Paulo, 27 de agosto de 2015.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador da Comissão de
Ética no Uso de Animais - ICB/USP

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.128.2017

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **096/2013/CEUA**, aprovado em 29/10/2013, e por solicitação do Prof. Dr. ***Ariel Mariano Silber***, do departamento de Parasitologia, informo que o título do projeto da aluna ***Flávia Silva Damasceno*** foi alterado para "***Papel da glutamina na biologia do Trypanosoma cruzi e Trypanosoma brucei***" por incluir estudos sobre a função biológica da glutamina no Trypanosoma brucei, gerando dados relevantes que foram incluídos na tese da aluna.

São Paulo, 01 de agosto de 2017.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP

Aos meus Pais, pelo apoio, amor
e compreensão incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ariel Mariano Silber, por ter me concedido essa grande oportunidade, por nos ensinar a fazer Ciência com responsabilidade, por fazer do seu laboratório um espaço de convivência agradável e cheio de oportunidades. Agradeço também pelo apoio, confiança, paciência, amizade e orientação durante todos esses anos. Muito obrigada!

À Ma. Elizabeth Pral, por toda ajuda, amizade e apoio durante todo esse tempo, mesmo quando já não estava mais no laboratório. Foi um enorme prazer trabalhar com você, exemplo de profissionalismo e zelo com a coisa pública. É gratificante poder contar com a amizade de pessoas como você!

À Dra. María Julia Barisón, me faltam palavras para agradecer todo o seu apoio, ajuda nos experimentos e nas discussões dos resultados. Além de ser essa Amiga maravilhosa para todos os momentos, minha irmã argentina. Este trabalho não seria o mesmo sem a sua contribuição.

À Dra. Ludmila Nakamura Rapado, muito obrigada pelo seu apoio, ajuda e contribuição valorosa nas discussões dos resultados. Obrigada também por me ouvir e aconselhar em momentos difíceis, pela sua amizade que com certeza levaremos para a vida inteira.

Ao Me. Marcell Crispim, pela amizade e apoio em todos esses anos de convivência no laboratório, superamos momentos difíceis e também celebramos momentos felizes. A sua contribuição também foi de grande importância para que eu chegasse até aqui. Muito obrigada por tudo!

Ao Rodolpho Ornitz, por toda a sua contribuição para este trabalho, pela amizade e por me fazer sentir mais próxima de casa quando falamos da nossa querida cidade.

Ao Me. Alexandre Moura, técnico do laboratório, por todo o apoio e colaboração com o grupo, por sempre estar disposto a ajudar na resolução dos problemas e também pela ajuda nesse trabalho. Muito obrigada!

Á todos os Amigos(as) do laboratório: Raíssa Melo, Dra. Letícia Marchese, Dra. Carolina Manchola, Leydi Gutierrez, Dra. Carla Cisti Ávila, Dr. Agustín Hernandez, Mayke Alencar, Richard Girard e a Dra. Sandra Carla Rocha por fazerem do laboratório um ambiente descontraído, aconchegante e produtivo. Muito obrigada pelo apoio e amizade durante todo esse tempo, sem o apoio de vocês teria sido mais difícil chegar até aqui.

Aos colegas que passaram pelo laboratório durante esse tempo: Dra. Lisvane Paes, Dr. Brian Mantilla, Dra. Flávia Zimbres, Dr. Gustavo Baptista, Ma. Inga Eva S. Langue, Me. Jean Douglas, Me. Higo F. S. Souza e Ma. Rosana B. D. Araujo, muito obrigada pelo apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Michael Duszenko, da Universidade de Tübingen, Alemanha, por ter me recebido em seu laboratório por um período de um ano. Por todo o aprendizado e experiência adquiridos nesse período. *Vielen Dank*!

À Profa. Dra. Katherine Figarella e ao seu esposo Prof. Dr. Nestor Uzcátegui, venezuelanos que conheci em Tübingen, Alemanha, por todo o apoio, ajuda e discussão dos resultados relacionados ao *T. brucei*. A ajuda de vocês foi fundamental para o desenvolvimento do trabalho. *Gracias* também pelos momentos agradáveis que compartilhamos juntamente com a sua filha Sara!

À Dra. Thaísa L. Sandri, o seu esposo Eduardo e os seus filhos: Victor e Lorenzo, meu refúgio brasileiro na Alemanha, muito obrigada pelo apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Mauro Javier Cortez e seu gupo pela colaboração com o nosso grupo e também pelas valorosas discussões de resultados nos seminários conjuntos.

Aos técnicos do departamento de Parasitologia (ICB-USP), em especial Márcio, Manoel, Carminha, Jenicer, Érica e Lourdes, por sempre estarem dispostos a ajudar.

Às secretárias do Departamento de Parasitologia: Sílvia Camargo, Dalva Molnar e Sabrina Morais, por todo suporte administrativo, por sempre estarem dispostas a ajudar.

À minha família: meus pais Flamarion e Maria Nasaré; meus irmãos(ãs) Gilberto, Gilmar, Gilson, Gilsa, Gildo, Gildete e Jacó; meus sobrinhos(as) Mariane, Mateus, Gisely, Cecília, Natália, Isabele, Lavínia Maria, Giovanna e Venâncio, e também minhas cunhadas e cunhado, muito obrigada pelo apoio, compreensão e incentivo em todos os momentos.

À todos(as) amigos e familiares que mesmo à distância sempre me apoiaram e torceram por mim, sempre me enviando energias positivas e mensagens de incentivo.

À minha amiga Valnia, por ter feito a ponte entre mim e o laboratório do Prof. Dr. Ariel. Muito obrigada!

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo valoroso suporte financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro concedido pela FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP), número do processo: 2013/09851-3. Além do mais o laboratório é membro do Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças infecciosas (INBEQMeDI) auxiliado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Na vida, não existe nada a temer, mas a compreender.
Marie Curie

RESUMO

Damasceno, FS. Papel da glutamina na biologia do *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*. [Tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Trypanosoma cruzi e *Trypanosoma brucei* são os agentes etiológicos da doença de Chagas e da doença do sono, respectivamente. A doença de Chagas acomete pessoas, principalmente da América Latina, sendo conhecida também como tripanossomíase americana. A doença do sono, também conhecida como tripanossomíase africana, acomete pessoas de diferentes regiões da África subsaariana. Ambos agentes etiológicos são tripanossomatídeos e apresentam um ciclo de vida que alterna entre os hospedeiros mamíferos e os hospedeiros invertebrados. *T. cruzi* e *T. brucei* apresentam um metabolismo baseado no consumo de aminoácidos e/ou glicose, dependendo da disponibilidade de nutrientes no ambiente. Os aminoácidos são metabólitos relevantes para vários processos biológicos necessários para manunteção e viabilidade dos parasitas. Neste trabalho foi demonstrada a importância da glutamina (Gln) em diferentes aspectos da biologia do *T. cruzi* e a relevância da Gln e da enzima glutamina sintetase (GS) para formas sanguícolas de *T. brucei*. A Gln é transportada pelo *T. cruzi* e pelo *T. brucei* a partir do meio extracelular. Em *T. cruzi* foi demonstrado que esse transporte é realizado por um único sistema, saturável, específico, dependente de ATP e do gradiente de H^+ da menbrana citoplasmática do parasita. O transporte é regulado ao longo do ciclo de vida do parasita, sendo complementado pela atividade da enzima GS no suprimento da quantidade de Gln requerida pelo parasita. Também foi demonstrado que a Gln é importante para a replicação das formas amastigotas e epimastigotas, além de promover o processo de metaciclogênese. Tratamento com análogos estruturais da Gln dimuiu a atividade da enzima glucosamina: frutose-6-fosfato aminotransferase (GF6PA), diminuindo também a proliferação do estágio epimastigota e a diferenciação para tripomastigota metacíclico. Além do mais células infectadas e tratadas com os análogos apresentaram redução do número de tripomastigotas que eclodiram das células, demonstrando que a Gln também é importante para os estágios intracelulares. Em formas sanguícolas de *T. brucei*, a enzima GS é ativa, mas é incapaz de suprir por si só a demanda de Gln do parasita, fazendo com que seja completamente dependente do transporte a partir do meio externo mesmo quando a biossíntese *de novo* acontece. A Gln é importante para a proliferação das formas sanguícolas e correta progressão do ciclo celular. Em meio sem Gln os parasitas são incapazes de manter a proliferação normalmente, sendo que este processo é dependente da concentração de Gln no meio externo. Também foi demonstrado que a Gln participa de um processo de modificação pós-traducional da tubulina, a glutamilação. Conclui-se portanto que a Gln é um aminoácido fundamental para sobrevivência do *T. cruzi* e do *T. brucei*.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. *Trypanosoma brucei*. Glutamina. Doença de Chagas. Aminoácidos. Poliglutamilação.

ABSTRACT

Damasceno, FS. Role of glutamine in the biology of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei.* [Ph. D. Thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Trypanosoma cruzi and *Trypanosoma brucei* are the etiologic agent of Chagas' disease and sleeping sicknes, respectively. Chagas' disease affects people mostly in Latin America and is known as American Trypanosomiasis. Sleeping sickness, known as African Trypanosomiasis, affects people and animals in sub-Saharan Africa countries. Both parasites are trypanosomatids that have a complex life cycle, which alternates among a mammalian hosts and insect vectors. *T. cruzi* and *T.* bruce*i* are able to use carbohydrates and amino acids as energy sources, depending on the availability of nutrients in the different environments that parasites face during their life cycle. The amino acids are relevant to many biological processes that are important to viability and maintenance in trypanosomatids. In this work we demonstrate that glutamine (Gln) is an important metabolite that participates in many biological processes in *T. cruzi*, as wel as the relevance of the enzyme glutamine synthetase and Gln in bloodstream forms of *T. brucei*. *T. cruzi* and *T. brucei* are able to uptake Gln from the extracellular medium. *T. cruzi* incorporates Gln through a single and saturable transport system. Gln uptake system is dependent on ATP intracellular levels and H^+ gradient at the cytoplasmic membrane level, being a highly specific system. Gln uptake is developmentally regulated and is a complement of the Gln biosynthesis to supply the parasite Gln requirements. Also we showed that Gln is important for the replicative stages amastigote and epimastigote, and promotes the metacyclogenesis differentiation process. The treatment of the parasites with Gln analogs inhibiting the the glucosamine fructose-6-phosfate impaired the epimastigote replication and the differentiation from epimastigote to trypomastigote metacyclic. Moreover, analogs treatment in the infected cells decreased the number of trypomastigotes released from the cells, suggesting that Gln is important for the intracellular development of *T. cruzi*. This work also demonstrates that the enzyme glutamine synthetase is active in bloodstream forms of *T. brucei*, but its activity is not enough to fulfill the Gln requirements of the parasite. *T. brucei* bloodstream forms are strictly dependent on Gln uptake from the extracelular medium even when its *de novo* biosynthesis is operating. The proper proliferation rate and correct cell cycle progression are dependent on Gln concentration in the medium. Moreover we showed here that Gln participates in a relevant post-translational modification of tubulin in bloodstream forms: ist glutamylation. This post-translational modification is important for the microtubules dynamics and cytokinesis process. We conclude that Gln is a fundamental amino acid for the survival and maintenance of *T. cruzi* and *T. brucei*.

Keywords: *Trypanosma cruzi*. *Trypanosoma brucei*. Glutamine. Chagas disease. Amino acids. Poliglutamylation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica da doença de Chagas no mundo 29

Figura 2 - Distribuição geográfica de casos de tripanossomíase africana reportados entre 2010-2014 32

Figura 3 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* 36

Figura 4 - Ciclo de vida do *Trypanosoma brucei* 38

Figura 5 - Representação da reação catalizada pela enzima glutamina sintetase 44

Figura 6 - Transporte de Gln pelo *T. cruzi* a partir do meio externo em função do tempo 72

Figura 7 - Transporte de glutamina em função da concentração do substrato 73

Figura 8 - Transporte de Gln em função da temperatura 74

Figura 9 - Efeito do pH externo no transporte de Gln 75

Figura 10 - Avaliação da interferência de Na^+ e K^+ no transporte de Gln 76

Figura 11 - Avaliação da dependência do transporte de Gln em relação aos níveis intracelulares de ATP 77

Figura 12 - Avaliação do transporte de Gln em função do gradiente de H^+ da membrana citoplasmática 78

Figura 13 - Efeito do estresse nutricional no transporte de Gln 79

Figura 14 - Transporte de Gln na presença de análogos estruturais ou aminoácidos como possíveis competidores 81

Figura 15 - Comparação do transporte de Gln em parasitas na fase exponencial e fase estacionária 82

Figura 16 - Transporte de Gln nos diferentes estágios do *T. Cruzi* 83

Figura 17 - Viabilidade de formas epimastigotas cultivadas na presença de Glu ou Gln 85

Figura 18 - Nível de ATP intracelular em parasitas cultivados na presença de diferentes metabólitos 86

Figura 19 - Efeito da Gln na diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos 87

Figura 20 - Infectividade das formas tripomastigotas metacíclicos diferenciados em meio TAU3AAG, TAUGln ou TAUGlu 88

Figura 21 - Eclosão das formas tripomastigotas 89

Figura 22 - Infectividade de formas tripomastigotas após estresse em PBS e recuperação na presença de Gln ou Glu 90

Figura 23 - Eclosão das formas tripomastigotas de células CHO-K_1 91

Figura 24 - Estrutura dos análogos estruturais de Gln 92

Figura 25 - Efeito dos análogos de Gln na atividade da enzima *Tc*GS 93

Figura 26 - Efeito dos análogos de Gln na atividade da enzima *Tc*GF6PA 94

Figura 27 - Avaliação do efeito dos análogos de Gln na proliferação de formas epimastigotas 96

Figura 28 - Análise da viabilidade e morte celular em formas epimastigotas de *T. cruzi* na presença dos análogos 99

Figura 29 - Recuperação dos parasitas em LIT após incubação em PBS, Glu, Gln ou LIT e tratados com os análogos de Gln 102

Figura 30 - Efeito dos análogos de Gln na metaciclogênese 104

Figura 31 - Toxicidade dos análogos de Gln em células CHO-K_1 104

Figura 32 - Efeito do análogo DPA no ciclo intracelular do *T. cruzi* 105

Figura 33 - Efeito do análogo avicin no ciclo intracelular do *T. cruzi* 106

Figura 34 - Efeito do análogo AZA no ciclo intracelular do *T. cruzi* 107

Figura 35 - Transporte de Gln em formas sanguícolas de *T. brucei* 110

Figura 36 – Atividade da enzima *Tb*GS em extrato de formas sanguícolas de *T. brucei* 111

Figura 37 - Clonagem da sequência correspondente a enzima *Tb*GS em vetor induzível para iRNA 112

Figura 38 - Confirmação do *knockdown* da enzima *Tb*GS 113

Figura 39 - Curva de proliferação de formas sanguícolas SMB 114

Figura 40 - Análise do ciclo celular em formas sanguícolas SMB cultivadas por 72 h 115

Figura 41 - Análise da degradação de DNA 116

Figura 42 - Efeito da diminuição gradual da concentração de Gln na proliferação dos parasitas 117

Figura 43 - Efeito da diminuição gradual da concentração de Gln no ciclo celular 119

Figura 44 - Sobreposição dos histogramas correspondentes a cada dia de análise do ciclo celular 120

Figura 45 - Análise de ciclo celular, degradação de DNA e necrose 122

Figura 46 - Recuperação dos parasitas em diferentes concentrações de Gln 123

Figura 47 - Análise do ciclo celular, degradação de DNA e necrose em parasitas recuperados por 24 e 48 h em diferentes concentrações de Gln 125

Figura 48 - Análise do ciclo celular em parasitas tratados com hidroxiurea..... 127

Figura 49 - Proliferação dos parasitas após o tratamento com hidroxiurea 128

Figura 50 - Análise do número de parasitas poliplóides, degradação de DNA e necrose após tratamento com hidroxiurea..... 129

Figura 51 - Análise da glutamilação de tubulina..... 131

Figura 52 - Comparação relativa entre os transportes de Gln, Pro e Glc, atividade da GS e concentração intracelular de Pro nos diferentes estágios do *T. cruzi* 138

Figura 53 - Reações metabólicas que utilizariam Gln como substrato 142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo do efeito dos análogos de Gln nos diferentes estágios do *T. cruzi* 108
Tabela 2 - Resumo dos sistemas de transporte de aminoácidos já descritos em *T. cruzi*..... 134

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACV	Acivicin
ADP	Adenosina difosfato
Ala	Alanina
Anx	Anexina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
ATP	Adenosina trifosfato
AZA	Azaserina
BSA	Albumina Sérica Bovina
CHO-K_1	*Chinese Hamster Ovary cell line*
CPS	Carbomoil fosfato sintase
CTP	Citidina trifosfato
Cys	Cisteína
DO	Densidade ótica
DPA	Ácido 2,4-Diamino-Pentanedioco
DTU	*Discrete Typing Unit*
EDTA	Ácido erilenodiaminotetracético
FAZ	*Flagellum attachment zone*
FCCP	Carbonil cianida p-trifluorometoxifenilhidrazona
SFB	Soro Fetal Bovino
GDH	Glutamato desidrogenase
GF6PA	Glucosamina: frutose-6-fosfato aminotransferase
Glc	Glicose
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
GMP	Guanosina monofosfato
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GS	Glutamina sintetase
HAT	Tripanossomíase Humana Africana
His	Histidina

HU	Hidroxiurea
Ile	Isoleucina
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LB	*Lysogeny broth*
LDH	Lactato desidrogenase
Leu	Leucina
LIT	*Liver Infusion Tryptose*
Lys	Lisina
Met	Metionina
MS	Metionina sulfoximine
MTT	4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazólio
NAD^+	Nicotinamida adenine dinucleotídeo, forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenine dinucleotídeo, forma reduzida
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
NH_3	Amônia
NH_4^+	Íon amônio
OMS	Organização Mundial de Saúde
P5C	delta-1pirrolina-5-carboxilato
P5CDH	delta-1pirrolina-5-carboxilato desidrogenase
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pH	Pontencial hidrogeniônico
Phe	Fenilalanina
PI	Iodeto de propídio
Pro	Prolina
qRT-PCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
SDS	dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
SMB	Single Marker Bloodstream Form
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TAU	*Triatomine Artificial Urine*
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	Tetra Metil Etileno Diamina

Tet	Tetraciclina
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
TTLL	Tubulina Tirosina Ligase-like
Tyr	Tirosina
U	Unidades
UTP	Uridina trifosfato
V_0	Velocidade inicial
Vmax	Velocidade máxima
VSG	Variante surface glicoproteína
XMP	Xantosina-5’-monofosfato
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO 28

1.1 Tripanossomíases 29

1.1.1 Aspectos gerais da doença de Chagas 29

1.1.2 Aspectos gerais da tripanossomíase africana 31

1.2 Parasitas 34

1.2.1Trypanosoma cruzi 34

1.2.1.1 Amastigota 34

1.2.1.2 Tripomastigota 35

1.2.1.3 Epimastigota intracelular 35

1.2.1.4 Epimastigota 35

1.2.1.5 Tripomastigota metacíclico 35

1.2.2 Trypanosoma brucei 37

1.3 Papel dos aminoácidos em *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* 38

1.3.1 Trypanosoma cruzi 38

1.3.2 Trypanosoma brucei 41

1.4 Glutamina e glutamina sintetase 42

1.5 Objetivo geral 46

1.5.1 Objetivos Específicos 46

CAPÍTULO 2: MATERIAL E MÉTODOS 47

2.1 Microrganismos utilizados, condições de cultivo e meios de obtenção dos diferentes estágios 48

2.1.1 Bactérias 48

2.1.1.1 Escherichia coli XL1Blue 48

2.1.2 Parasitas 48

2.1.2.1 Trypanosoma cruzi 48

2.1.2.1.1 Epimastigotas 48

2.1.2.1.2 Tripomastigotas metacíclicos 48

2.1.2.1.3 Tripomastigotas 49

2.1.2.1.4 Amastigotas e epimastigotas intracelulares 49

2.1.2.2 Trypanosoma brucei 49

2.1.2.2.1 *Trypanosoma brucei brucei* lister 427 50

2.2 Caracterização do transporte de L-Glutamina em *Trypanosoma cruzi* 50

2.2.1 Ensaio de transporte 50

2.2.1.2 Transporte em formas epimastigotas 51

2.2.1.3 Dependência do transporte em relação ao tempo, V_{max} e K_m 51

2.2.1.4 Dependência do transporte com a temperatura 52

2.2.1.5 Dependência do transporte com o pH 52

2.2.1.6 Dependência do transporte com íons externos 52

2.2.1.7 Dependência de energia 52

2.2.1.8 Transporte de Gln na presença de outros aminoácidos e análogos de Gln como competidores 53

2.2.1.9 Exponencial e estacionária 53

2.2.1.10 Estresse nutricional 53

2.2.1.11 Transporte em formas tripomastigotas metacíclicas 53

2.2.1.12 Transporte de Gln em estágios do T. cruzi presentes no hospedeiro mamífero 54

2.3 Avaliação da importância da Glutamina para o *T. cruzi* 54

2.3.1 Viabilidade de formas epimastigotas 54

2.3.2 Avaliação dos níveis de ATP intracelular 54

2.3.3 Participação da Gln no ciclo intracelular 55

2.3.3.1 Participação da Gln na infectividade de formas tripomastigotas 55

2.3.3.2 Fixação e marcação das células CHO-K_1 55

2.3.3.3 Participação da Gln na eclosão de formas tripomastigotas 55

2.3.4 Importância da Gln na metaciclogênese 56

2.3.4.1 Diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos 56

2.3.4.2 Infectividade das formas tripomastigotas diferenciadas em meio TAUGln 56

2.3.4.3 Eclosão de formas tripomastigotas 57

2.4 Avaliação do efeito de análogos de Gln 57

2.4.1 Epimastigotas 57

2.4.1.1 Curvas de proliferação 57

2.4.1.2 Viabilidade dos parasitas tratados com os análogos de Gln 57

2.4.1.3 Análise da morte celular 58

2.4.1.4 Recuperação dos parasitas em LIT 58

2.4.2 Efeito dos análogos na metaciclogênese 58

2.4.3 Efeito dos análogos no ciclo intracelular 59

2.4.3.1 Toxicidade em células CHO-K_1 59

2.4.3.2 Tratamento das células CHO-K_1 infectadas 59

2.4.4 Medições de atividade das enzimas glutamina sintetase (GS) e da enzima glucosamina: frutose-6-fosfato aminotransferase (GF6PA) 59

2.4.4.1. Atividade da enzima GS na presença dos análogos 59

2.4.4.2 Atividade da enzima GF6PA em extrato de T. cruzi na presença dos análogos 60

2.5 *Trypanosoma brucei* 61

2.5.1 Manipulação do DNA 61

2.5.1.1 Extração de DNA genômico de T. brucei 61

2.5.1.2 Desenho dos iniciadores específicos para TbGS 61

2.5.1.3 Amplificação de DNA por PCR 61

2.5.1.4 Eletroforese em gel de agarose 62

2.5.1.5 Clonagem da sequência de interesse no vetor p2T7-177 62

2.5.1.6 Transformação de bactérias competentes 62

2.5.1.7 Linearização do vetor 63

2.5.2 Manipulação dos parasitas 63

2.5.2.1 Transfecção dos parasitas 63

2.5.2.2 Reação em cadeia de polimerase em tempo real (qRT-PCR) para validação do silenciamento do gene correspondene a TbGS 64

2.5.2.3 Medições da atividade da enzima TbGS 64

2.5.3 Análise do fenótipo dos parasitas transfectados 64

2.5.3.1 Curva de proliferação 64

2.5.3.2 Análise da progressão do ciclo celular e da degradação do DNA 65

2.5.3.3 Análise de necrose 65

2.5.3.4 Depleção da Gln no soro fetal bovino (SFB) 65

2.5.3.5 Efeito da diminuição gradual da concentração de Gln, no meio de cultivo, para a sobrevivência dos parasitas 66

2.5.3.6 Recuperção dos parasitas em diferentes concentrações de Gln 66

2.5.3.7 Sincronização do ciclo celular nas células SMB 66

2.5.3.8 Análise por Western blott 67

2.5.3.9 Microscópia de fluorescência 68

2.5.4 Análises estatísticas 69

CAPÍTULO 3: RESULTADOS 70

3.1 *Trypanosoma* cruzi 71

3.1.1 Caracterização do transporte de Glutamina 71

3.1.1.1 Cinética 71

3.1.1.2 Termodinâmica do transporte de Gln 73

3.1.1.3 Caracterização do mecanismo envolvido no trasporte de Gln 74

3.1.1.4 Especificidade do transportador 80

3.1.1.5 Transporte de Gln em parasitas na fase exponencial e estacionária 82

3.1.1.6 Avaliação do transporte de Gln ao longo do ciclo de vida do T. cruzi 83

3.1.2 Participação da Gln em processos biológicos relevantes para o T. cruzi 84

3.1.3 Efeito de análogos estruturais da Gln na biologia do T. cruzi 92

3.1.3.1 Avaliação do efeito dos análogos de Gln nos estágios encontrados no inseto vetor 95

3.1.3.2 Avaliação do efeito dos análogos de Gln nos estágios encontrados no hospedeiro mamífero 104

3.2 ***Trypanosoma brucei*** 109

3.2.1 Tranporte de Gln em formas sanguícolas de T. brucei 109

3.2.2 Atividade da enzima TbGS em extrato de formas sanguícolas 110

3.2.3 Amplificação da sequência da enzima TbGS e clonagem no vetor de indução 111

3.2.4 Transfecção dos parasitas com a construção p2T7TbGS 112

3.2.5 Análise do fenótipo dos parasitas transfectados 113

3.2.6 Sincronização do ciclo celular 126

3.2.7 Análise da glutamilação de tubulina 130

CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO 132

4.1 ***Trypanosoma cruzi*** 133

4.1.1 Transporte de Gln e metabolismo de aminoácidos em T. cruzi 133

4.1.2 Enzimas que participam do metabolismo de Gln em T. cruzi 141

4.1.3 Morte celular em tripanossomatídeos 144

4.2 ***Trypanosoma brucei*** 147

4.2.1 A Gln e ciclo celular em T. brucei 147

4.2.2 Modificações pós-traducionais em T. brucei 149

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES 152

REFERÊNCIAS 155

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1 Tripanossomíases

1.1.1 Aspectos gerais da doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta doença foi descoberta há mais de um século pelo médico brasileiro Carlos Chagas (Chagas, 1909), que descreveu não só o parasita mas também o inseto vetor e os hospedeiros mamíferos. A doença de Chagas acomete pessoas pincipalmente na América Latina (Figura 1), estima-se que 8 milhões de pessoas estão infectadas em todo mundo, e que ocorram 10 mil novos casos a cada ano, sendo que aproximadamente 25 milhões de pessoas vivem em áreas de risco da infecção. As áreas de risco estão localizadas principalmete em 21 países da América Latina compreendendo países do México até a Argentina. Estudos recentes apontam para a edemicidade da doença de Chagas também no sul dos Estados Unidos. É considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma doença negligenciada (WHO, 2017). Inicialmente a doença de Chagas acometia a populção somente da América Latina, mas devido a migrações das pessoas da área rural para as cidades e também das áreas endêmicas para outros países em diferentes continentes, a doença de Chagas atualmente é um problema mundial. Há relatos de casos em países não endêmicos como Canadá, Austrália, Japão, França, Itália, Suécia, Suíça, Inglaterra e Espanha, sendo que na Espanha se concentra o maior número de imigrantes infectados, que são majoritariamente oriundos do Equador, Argentina, Bolívia e Peru (Gascon, Bern et al., 2010) revisado por (Rassi, Rassi et al., 2012) e por (Perez-Molina,Molina, 2017).

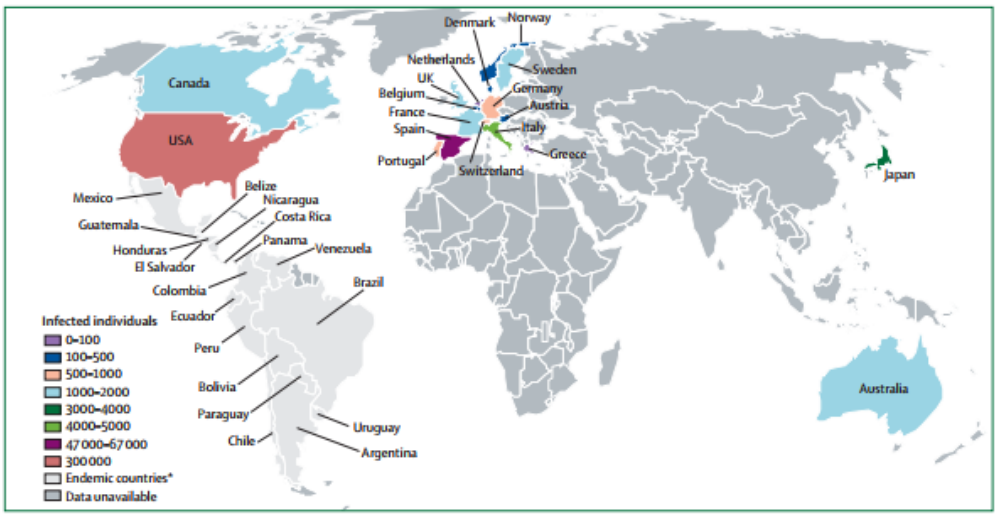

Figura 1 - Distribuição geográfica da doença de Chagas no mundo. Fonte: (Rassi,Marin-Neto, 2010).

A doença de Chagas é uma zoonose que tem como reservatório natural uma ampla variedade de mamíferos no continente americano. O *T. cruzi* é transmitido por várias espécies de três gêneros de insetos triatomíneos hematófagos: *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*. Na Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguai, Uruguai e Peru o vetor mais encontrado é o *Triatoma infestans*, já na Colômbia, Venezuela e América Central é o *Rohodnius prolixus*, sendo o *T. dimidiata* encontrado no Equador e também na América Central, o *R. pallescens* é principalmente encontrado no Panamá. Nos Estados Unidos os dois principais vetores são *T. sanguisuga* e *T. gerstaecken* (Silber, Colli et al., 2005; Kribs-Zaleta, 2010; Rassi, Rassi et al., 2012; Coura, 2013; PAHO, 2017; Perez-Molina,Molina, 2017).

Além da transmissão vetorial, principal forma de transmissão nas áreas endêmicas, a doença de Chagas também pode ser transmitida por outras vias, como a via oral, de forma congênita da mãe infectada para filho, por transplantes de orgãos, transfusão sanguínea e por acidentes em laboratórios. A transmissão congênita se estima que é responsável por 4,7% dos casos, sendo que este número pode ser maior em áreas endêmicas. Já a transmissão por transfusão sanguínea e transplante de orgãos representam de 10-25% dos casos. A transmissão por via oral ocorre em áreas endêmicas, por ingestão de alimentos contaminados com o parasita e causa surtos de infecção aguda. A transmissão por acidentes em laboratórios que trabalham com o parasita ocorrem mais raramente (Bern, Verastegui et al., 2009; Rassi,Marin-Neto, 2010; Perez-Molina,Molina, 2017).

A doença de Chagas pode ser dividida em uma fase aguda e uma fase crônica. Ambas as fases da doença são tipicamente assintomáticas. A fase aguda ocorre logo após a infecção, podendo durar de 4 a 8 semanas. Essa fase é caracterizada pela alta parasitemia e uma baixa taxa de anticorpos, quando há sintomas são inespecíficos como febre, inflamação e edema no local da picada do inseto vetor (chamado de sinal de Romaña) (Docampo, 2001; Silber, Colli et al., 2005; Rassi, Rassi et al., 2012). Nos últimos anos tem sido observado um aumento de casos resultantes da transmissão oral da doença de Chagas, em que o parasita é ingerido juntamente com algum alimento, geralmente suco de frutas, causando uma infecção aguda severa com alta mortalidade, e manifestações clínicas mais intensas do que as causadas pela transmissão vetorial. As manifestações clínicas da fase aguda causada pela infeção oral podem ser: febre prolongada, miocardite aguda e em alguns casos meningoencefalites. A mortalidade nesses casos pode chegar a 33% dos pacientes, (revisado por (Yoshida, Tyler et al., 2011; Filigheddu, Gorgolas et al., 2017)). A fase aguda, quando não leva a óbito, evolui para a fase crônica, que é caracterizada por uma parasitemia geralmente indetectável pelos métodos convencionais e altas taxas de anticorpos específicos, tem início de 2 a 3 meses

depois da infecção. Cerca de 60% a 70% dos pacientes apresentam a forma assintomática ou indeterminada da doença, que é caracterizada pela ausência de sinais e sintomas. Entre 30% a 40% dos pacientes chagásicos crônicos podem evoluir para alguma das formas sintomáticas da doença, e desenvolver problemas cardíacos e/ou digestivos, como cardiomiopatia e megacolon, megaesôfago ou ambos, o que ocorre normalmente entre 10 e 30 anos após a infecção aguda (Rassi, Rassi et al., 2012; Perez-Molina,Molina, 2017).

O tratamento da doença de Chagas disponível atualmente é insatisfatório e é baseado em apenas duas drogas que começaram a ser usadas há aproximadamente 50 anos: o Nifurtimox e o Benzonidazol. Ambas as drogas são as únicas ferramentas disponíveis para o tratamento. As duas drogas apresentam sérios efeitos colaterais e já há relato de surgimento de cepas resistentes (revisado por (Urbina, 2010). Se o tratamento dos pacientes ocorrer na fase aguda, as duas drogas são efetivas para diminuir ou eliminar o parasita na maioria dos casos, evitando a soroconversão dos pacientes. Já na fase crônica, quando a maior parte dos pacientes é diagnosticada, o tratamento nem sempre é eficaz, sendo indispensável o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Boscardin, Torrecilhas et al., 2010; Paes, Mantilla et al., 2011; Perez-Molina,Molina, 2017). Há uma grande discussão na comunidade científica quanto ao tratamento na fase crônica da doença de Chagas, muitos pesquisadores defendem que os pacientes devem ser tratados antes do início do aparecimento dos sinais e sintomas, pois este tratamento pode prevenir ou atrasar o aparecimento dos sintomas (Paes, Mantilla et al., 2011; Chatelain, 2017; PAHO, 2017; Rassi, Marin et al., 2017). A eficácia do tratamento depende de vários fatores, tais como idade e estado imunológico do paciente, cepa do parasita, tempo de infecção dentre outros (Silber, Colli et al., 2005; PAHO, 2017). A busca por novos fármacos enfrenta vários obstáculos, tais como a falta de investimentos em pesquisa e desenvolvimento de novas estratégias de combate a doença de Chagas.

1.1.2 Aspectos gerais da tripanossomíase africana

A tripanossomíase humana africana (HAT do inglês: *Human Afrincan Trypanosomiasis*), também conhecida como doença do sono, é causada pelo protozóario flagelado *Trypanosoma brucei*. Assim como a doença de Chagas também é considerada, pela OMS, como uma doença negligenciada.

A doença do sono acomete a população de regiões mais pobres, de aproximadamente 36 países na África subsaariana (Figura 2). Dados da OMS reportam que aproximadamente 20.000 pessoas estão infectadas e que mais de 65 milhões vivem em áreas de risco de infecção. O número de novos casos reportados a cada ano tem apresentado uma redução significativa, devido a eforços conjuntos da OMS e organizações não governamentais para o controle da doença. Em 2009 foram reportados 10.000 casos, já em 2015 esse número foi reduzido para 2.804 casos. Espera-se que a doença do sono seja eliminada como um problema de saúde pública até 2020 (Buscher, Cecchi et al., 2017; WHO, 2017).

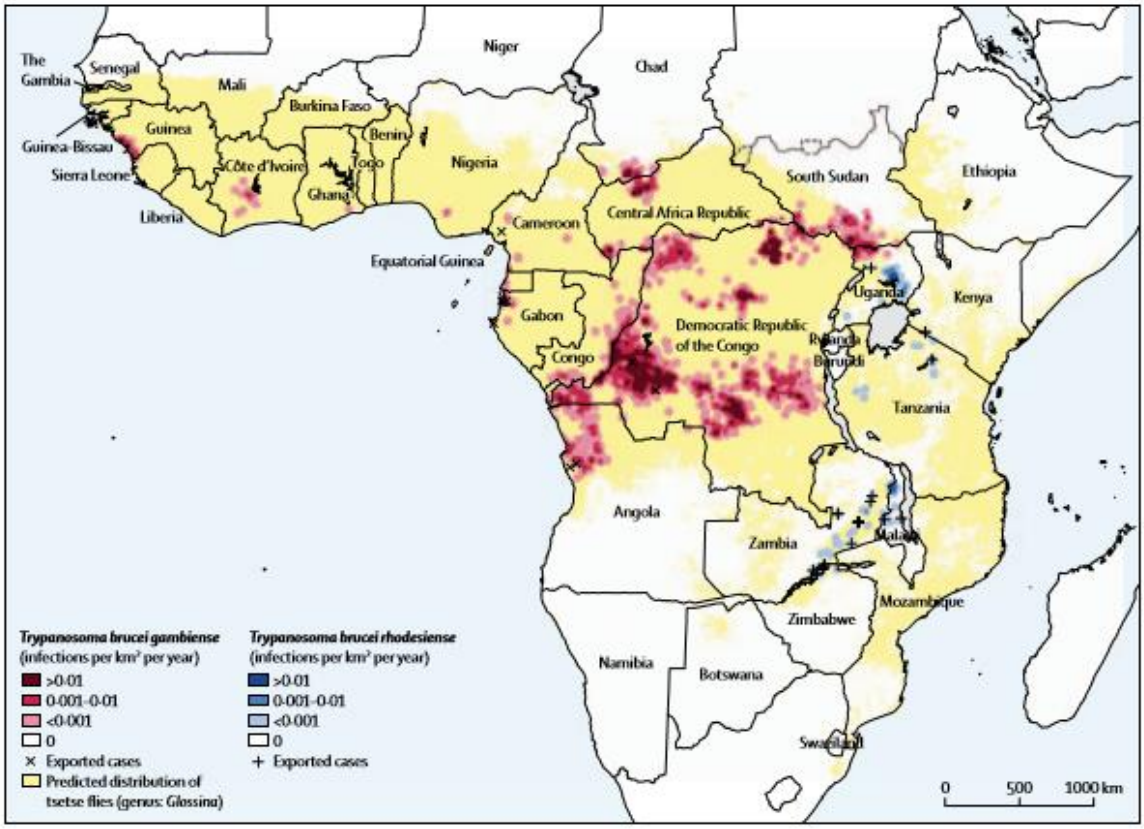

Figura 2 - Distribuição geográfica de casos de tripanossomíase africana reportados entre 2010-2014. Fonte: (Buscher, Cecchi et al., 2017).

A doença do sono é transmitida pelas moscas *tsetse* (*Glossina* sp.) que adquiriram o parasita de pessoas ou animais infectados pelo *T. brucei*. Duas sub-espécies do *T. brucei* acomentem as pessoas em diferentes regiões da África. O *T. b. gambiense* é encontrado em 24 países do centro e oeste africano, é responsável por 97% dos casos reportados, e *T. b. rhodisiense* que acomete pessoas de 13 países do leste e sul da África, sendo responsável por aproxidamente 3% dos casos reportados a cada ano. Apenas Uganda apresenta as duas formas

da doença, mas em diferentes regiões do país. Outra sub-espécie, o *T. b. brucei*, causa a tripanossomíase africana em animais, incluindo o rebanho bovino, nos quais a doença é chamada Nagana. A nagana é um obstáculo para o desenvolvimento econômico nas áreas rurais afetadas (WHO, 2017). Além da transmissão vetorial, a mais importante do ponto visto epidemiológico, a doença do sono também pode ser transmitida congenitamente, da mãe infectada para o filho, visto que o *T. brucei* pode atravessar a barreira placentária e infectar o feto. Também pode ser transmitida por acidentes em laborários que trabalham com o parasita e também por contato sexual (Buscher, Cecchi et al., 2017).

As manifestaçõs clínicas da doença do sono se apresentam em dois estágios: no primeiro estágio, o parasita se multiplica no tecido subcutâneo, adiposo, sangue ou sistema linfático, causando dores de cabeça, febre e dores nas articulações (Buscher, Cecchi et al., 2017; Tanowitz, Scherer et al., 2017). No segundo estágio o parasita atravessa a barreira hematoencefálica e infecta o sistema nervoso central, causando mudanças de comportamento, confusão e distúrbios sensoriais, além da pertubação do ciclo do sono, sintoma este que dá nome a doença (Buguet, Bourdon et al., 2001; Njamnshi, Seke Etet et al., 2012). O *T. b. gambiense*, causa a infecção crônica, na qual a pessoa infectada pode ficar meses ou anos sem apresentar sinais e sintomas da doença. Os sintomas aparecem em um estado avançado da doença, quando o sistema nervoso já está afetado. Enquanto que o *T. b. rhodisiense* é responsável pela infecção aguda. Na fase aguda os primeiros sinais e sintomas podem aparecer poucas semanas após a infecção. A doença se desenvolve rapidamente atingindo o sistema nervoso central (Buguet, Bourdon et al., 2001; Buscher, Cecchi et al., 2017).

Há cinco drogas disponíveis para o tratamento da doença do sono. A escolha depende do estágio da doença e do agente causador. Drogas utilizadas no primeiro estágio não são efetivas no segundo estágio, visto que no segundo estágio, a droga necessita atravessar a barreira hematoencefálica. No primeiro estágio é usada a pentamidina para tratar infecções pelo *T. b. gambiense* e a suramina para tratar as pessoas acometidas pelo *T. b. rhodisiense*. No segundo estágio, os fármacos disponíveis para o tratamento são o melarsoprol, que pode ser usado para o tratamento de infecções por ambos os parasitas. No entanto, essa droga causa efeitos colaterais gravíssimos podendo causar a morte do paciente em até 10% dos casos. Uma alternativa ao melarsoprol, para tratar infecções causadas pelo *T. b. gambiense* é utilizar uma combinação de eflornitina e nifurtimox (Buscher, Cecchi et al., 2017).

1.2 Parasitas

O *T. cruzi* e o *T. brucei* pertencem ao reino protista, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma* (Adl, Simpson et al., 2012).

1.2.1 T. cruzi

Dentro da espécie *T. cruzi* ocorreram várias recombinações genéticas que dificultam as subdivisões filogenéticas, além do mais algumas linhagens podem apresentar um genoma híbrido. Desta forma as diferentes linhagens sub-específicas do *T. cruzi* são atualmente classificadas pela maior similaridade genética em seis *discrete typing units* (DTUs). As DTUs foram denominadas TcI a TcVI, o que permite um melhor entendimento e uma melhor comunicação dentro da comunidade científica (Zingales, Miles et al., 2012). De forma geral, os isolados, cepas e clones dentro de cada DTU compartilham algumas características biológicas como tropismo, presença em determinadas regiões geográficas, virulência e preferência pelo hospedeiro mamífero.

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo, visto que pode alternar entre dois hospedeiros completamente diferentes: hospedeiros vertabrados e invertebrados. Além do mais apresenta vários estágios durante o seu ciclo de vida com características morfológicas e bioquímicas diferentes. Nos hospedeiros mamíferos, dentre os quais o homem está incluído, são descritos três estágios principais com base em critérios morfológicos como a forma fusiforme, a posição do cinetoplasto (estrutura contendo o DNA da única mitocôndria presente no parasita) relativo ao núcleo e a região onde emerge o flagelo (Silber, Colli et al., 2005). Os estágios encontrados no hospedeiro mamífero são:

1.2.1.1 Amastigota

Estágio intracelular replicativo, caracterizado pela forma arrendondada, mede de 2-6 µm de diâmetro, apresenta um incipiente flagelo e são encontradas no citoplasma da célula do hospedeiro vertebrado.

1.2.1.2 Tripomastigota

É um estágio infectivo, não replicativo, encontrado na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero, mede aproximadamente 18 µm de comprimento, incluindo o extremo livre do flagelo de aproximadamente 6 µm, e 2-3 µm de largura.

1.2.1.3 Epimastigota intracelular

É um estágio transiente entre o amastigota e o tripomastigota, encontrado no citoplasma da célula do hospedeiro mamífero, também com capacidade replicativa, mede aproximadamente 5,4 µm e apresenta um pequeno flagelo. O epimastigota intracelular compartilha várias características morfológicas e bioquímicas com o epimastigota encontrado no inseto vetor (Almeida-de-Faria, Freymuller et al., 1999).

No hospedeiro invertebrado, os insetos hematófagos da família Reduvidae, encontram-se principalmente dois estágios do *T. cruzi*:

1.2.1.4 Epimastigota

Estágio replicativo, flagelado, mede aproximadamente 20-40 µm de comprimento e 2-5 µm de largura, e está presente no intestino médio do hospedeiro invertebrado.

1.2.1.5 Tripomastigota metacíclico

Estágio não replicativo, infectivo, resultante da diferenciação de formas epimastigotas, presente na porção final do intestino do inseto vetor. Mede aproximadamente 18 µm, incluindo o flagelo. Este estágio é excretado juntamente com as fezes do inseto vetor, causando a infecção no hospedeiro mamífero.

Didaticamente, pode-se assumir que o ciclo de vida do parasita (Figura 3), tem início quando formas tripomastigotas, presentes na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero, são ingeridas pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo. No intestino do inseto, essas formas se diferenciam em epimastigotas, e na porção terminal do intestino, essas formas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos. Quando o inseto pica o hospedeiro vertebrado e

inicia um novo repasto sanguíneo, concomitantemente elimina as formas tripomastigotas metacíclicos junto das fezes e urina. Uma vez em contato com o hospedeiro mamífero, os tripomastigotas metacíclicos são internalizados através de pequenas lesões na pele, causadas pelo próprio hospedeiro. Os tripomastigotas para sobreviverem e estabelecerem a infecção precisam obrigatoriamente invadir as células do hospedeiro mamífero. Dentro das células, os parasitas diferenciam para formas amastigotas. Após aproximadamente 96 h os amastigotas começam a se diferenciar para tripomastigotas, passando transientemente pelo estágio epimastigota intracelular. Uma vez novamente diferenciado para tripomastigotas, esses parasitas são liberados na corrente sanguínea pela ruptura da célula, e podem invadir novas células no mesmo hospedeiro mamífero ou serem ingeridos pelo vetor durante o seu respasto sanguíneo, continuando assim o seu ciclo de vida (De Souza, 2002; Silber, Colli et al., 2005; Paes, Mantilla et al., 2011; Rassi, Rassi et al., 2012; Bern, 2015; Perez-Molina,Molina, 2017).

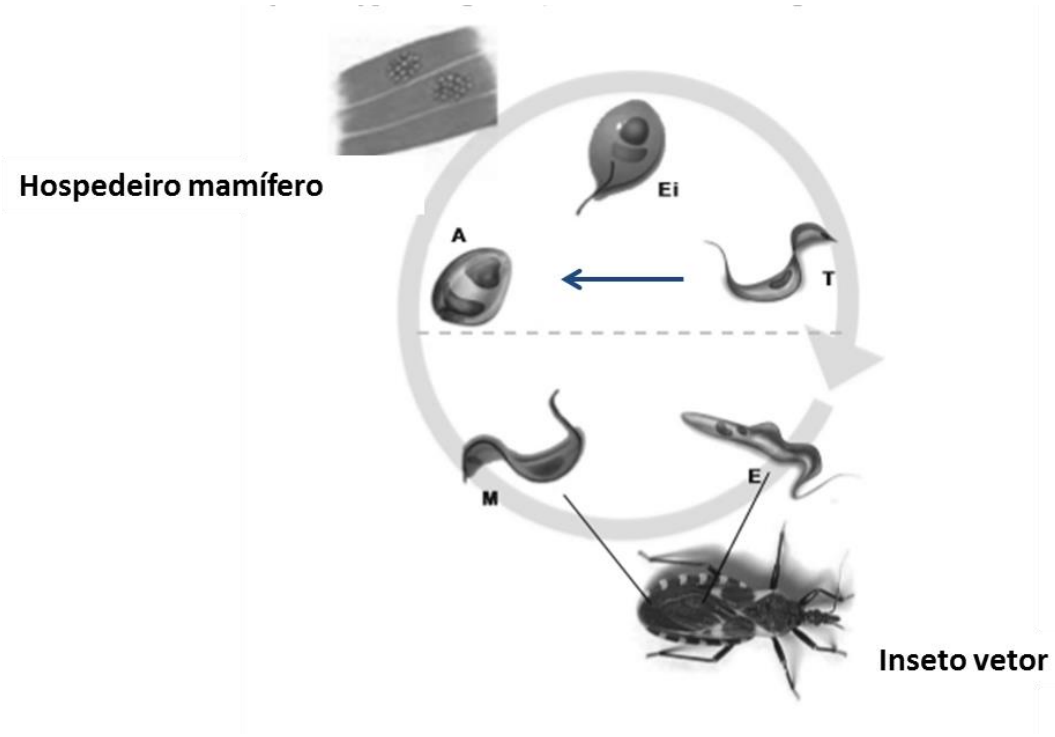

Figura 3 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. O ciclo de vida do parasita alterna entre um hospedeiro mamífero e um inseto vetor. Formas encontradas no hospedeiro mamífero: **A**- amastigota, **EI**- epimastigota intracelular, **T**- tripomastigota. Fomas encontradas no inseto vetor: **E**- epimastigota e **M**- tripomastigota metacíclico. Adaptado de (Paes, Mantilla et al., 2011).

1.2.2 T. brucei

A espécie *T. brucei* inclui três subespécies: o *T. brucei brucei* que acomete animais domésticos e selvagens, o *T. brucei rhodesiense* e *T. brucei gambiense* que afetam os seres humanos.

O ciclo de vida deste parasita alterna também entre dois hospedeiros: um hospedeiro mamífero e um inseto vetor, hospedeiro intermediário, que transmite a infecção para um novo hospedeiro mamífero. O *T. brucei* é um parasita extracelular em ambos os hospedeiros. A infecção começa quando formas metacíclicas, presente nas glândulas salivares da mosca, são injetadas no hospedeiro mamífero durante a picada do inseto. Uma vez na corrente sanguínea se diferenciam para as formas tripomastigotas sanguícolas longas (*long slender*), que são formas replicativas, e se desseminam pela corrente sanguínea e sistema linfático podendo se infiltrar em tecidos e orgãos, chegando a atingir o sistema nervoso central. Alguns tripanossomas sanguícolas se diferenciam para uma forma curta, não replicativa (*short stumpy*). Ambas as formas são ingeridas pela mosca *tsetse* juntamente com o sangue durante o repasto sanguíneo do inseto. Porém no intestino da mosca, só as formas *stumpy* sobreviverão e se deferenciarão para as formas procíclicas (replicativas), seguida da diferenciação para formas epimastigotas (também replicativas), que colonizam as glândulas salivares. Nesse local, após multiplicação, os parasitas se diferenciarão novamente para tripomastigotas metacíclicos, que serão transmitidos para um novo hospedeiro mamífero em um novo repasto sanguíneo, continuando assim o ciclo de vida (Bringaud, Riviere et al., 2006; Duszenko, Ginger et al., 2011; Mogk, Bosselmann et al., 2017).

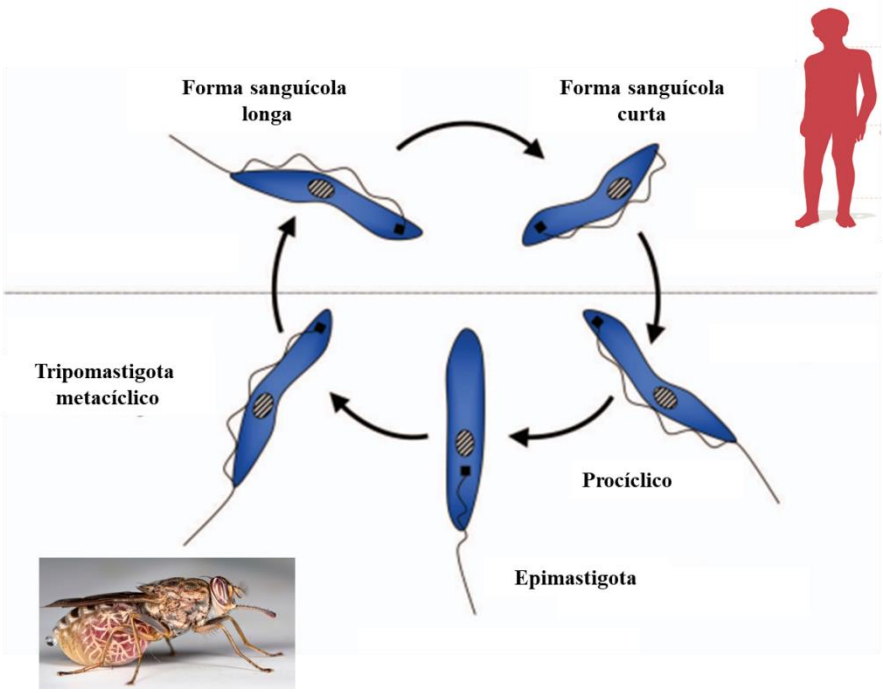

Figura 4 - Ciclo de vida do *Trypanosoma brucei*. O ciclo de vida do parasita alterna entre um hospedeiro mamífero e um inseto vetor. Formas encontradas no hospedeiro mamífero: formas sanguícolas longas e curtas. Fomas encontradas no inseto vetor: tripomastigota procíclico; epimastigota e tripomastigota metacíclico. Adaptado de (Duszenko, Ginger et al., 2011).

1.3 Papel dos aminoácidos em *T.cruzi* e *T. brucei*

1.3.1 T. cruzi

O *T. cruzi*, durante o ciclo de vida adapta o seu metabolismo de acordo com a disponibilidade de nutrientes nos diferentes ambientes pelos quais transita. Os diferentes estágios transitam em ambientes ricos em Glicose (Glc), como a corrente sanguínea do hospedeiro mamífero, e ambientes apenas com a disponibilidade de aminoácidos como fonte de energia e carbono, como a porção terminal do trato digestivo do inseto vetor (Silber, Colli et al., 2005). Estudos *in vitro* mostratam que as formas epimastigotas preferencialmente catabolizam glicose durante a fase exponencial de crescimento, e quando exposta a estresse nutricional ocorre uma mudança para o metabolismo baseado no consumo de aminoácidos, com produção de amônia (Cazzulo, 1994; Barison, Rapado et al., 2017). De fato, no intestino do inseto vetor o parasita enfrenta mudanças como a escassez progressiva de nutrientes a

medida que estes são retirados pelas células epiteliais. Como resultato da sua adaptação a esta variável, os parasitas entrariam em fase estacionária de cresciemento. Foi mostrado que nessa fase, os parasitas apresentam uma mudança no perfil metabólico quando comparado com a fase exponencial, mudanças estas relacionadas ao seu metabolismo energético (aminoácidos, carboidratos e intermediários do ciclo de Krebs) assim como em relação ao balanço redox (Cazzulo, 1994; Tetaud, Bringaud et al., 1994; Barison, Rapado et al., 2017).

Além da participação como fonte de energia e carbono, os aminoácidos estão envolvidos em processos biológicos importantes para todos os estágios do ciclo de vida do parasita. Já foi descrita a participação do glutamato (Glu), Prolina (Pro) e aspartato (Asp) na metaciclogênese, ou seja, na diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos (Contreras, Salles et al., 1985; Homsy, Granger et al., 1989). Como também já foi descrito que a adição dos aminoácidos leucina (Leu) e isoleucina (Ile) no meio de diferencição *in vitro*, inibem a metaciclogênese promovida pela Pro. Estes aminoácidos são descritos como inibidores do catabolismo da Pro (Homsy, Granger et al., 1989). A Pro também está envolvida no processo de diferenciação das formas epimastigotas intracelulares para tripomastigotas. Além do mais foi demonstrado que no ciclo intracelular ocorre uma mudança de metabolismo, de um metabolismo baseado no consumo de Glc em formas tripomastigotas para um metabolismo baseado no consumo de Pro em formas amastigotas (Tonelli, Silber et al., 2004; Silber, Tonelli et al., 2009). Também já foi mostrado que a Pro é importante para a proliferação dos parasitas como também tem uma participação relevante na resistência ao estresse oxidativo e nutricional (Magdaleno, Ahn et al., 2009; Paes, Suarez Mantilla et al., 2013; Saye, Miranda et al., 2014). Recentemente foi descrita a participação da Pro e do seu intermediário metabólico pirrolina-5-carboxilato (P5C), como substratos mitocondriais e também a sua participação na invasão celular pelo parasita e o efeito de proteção do mesmo quando exposto a estresse oxidativo (Paes, Suarez Mantilla et al., 2013; Mantilla, Paes et al., 2015). Pro, glicina (Gly), alanina (Ala) e Glu são descritos como importantes nos processos de osmorregulação e controle do volume celular (Rohloff, Rodrigues et al., 2003; Rohloff, Montalvetti et al., 2004).

Outro caso de interesse é o do metabolismo de arginina (Arg) que participa da administração dos recursos energéticos do parasita. A enzima arginina quinase cataliza a reação reversível de transfosforilação entre ATP e Arg, rendendo ADP e fosfoarginina. Isso permite a reciclagem do nucleotídeo sem perder a união de alta energia, de forma análoga ao que acontece com a fosforilação de creatina pela creatina quinase em mamíferos (Pereira, Alonso et al., 2000; Pereira, Alonso et al., 2002). A superexpresão da enzima arginina quinase

em *T. cruzi* aumenta a resistência dos parasitas a condições de estresse nutricional e pH, além de aumentar a proliferação em relação ao controle, o que sugere que a arginina quinase é importante para a adaptação do parasita a mudanças no ambiente (Pereira, Alonso et al., 2003).

Um aspecto importante da função dos aminoácidos em *T. cruzi* é a sua função como fontes oxidáveis para a produção de energia. Tem sido demonstrado que Pro, Glu e Asp são utilizados pelo *T. cruzi* como fonte energética e de obtenção de outros metabólitos (Sylvester,Krassner, 1976). Leu, Ile, glutamina (Gln) e asparagina (Asn) tem participação no metabolismo energético e acredita-se que esses aminoácidos podem ser convertidos a Asp ou Glu e incorporados ao Ciclo de Krebs, após deaminação na mitocôndria. O Glu também pode ser convertido a α-cetoglutarato pela ação da enzima glutamato desidrogenase (Zelada, Montemartini et al., 1996).

A participação da histidina (His) na bioenergética e na recuperação de formas epimastigotas após longos períodos de estresse nutricional foi descrita recentemente (Barison, Damasceno et al., 2016). Neste mesmo trabalho também foi demonstrado que a His é oxidada completamente com produção de CO_2, aumentando o potencial de membrana mitocondrial, estimulando o consumo de O_2, sustentando a produção de ATP. Em síntese, nota-se a grande importância dos múltiplos papéis dos aminoácidos e consequentemente de seus reguladores em vários processos biológicos importantes para todos os estágios do *T. cruzi*, tais como proliferação, diferenciação, infectividade e resistência a diferentes tipos de estresse.

Para que os aminoácidos sejam metabolizados pelos parasitas, os mesmos devem ser obtidos por meio da biossíntese a partir de precursores metabólicos ou obtidos pelo transporte a partir do meio extracelular (Silber, Colli et al., 2005). A incorporação de vários aminoácidos pelo *T. cruzi* tem sido descrita na literatura. O transporte de Pro apresenta dois sistemas de incorporação: o sistema A, de alta afinidade é dependente do gradiente de prótons, e o sistema B de baixa afinidade, é dependente de ATP (Silber, Tonelli et al., 2002). O transporte de Glu também já foi descrito e foi demonstrado que o mesmo é dependente do pH extracelular, sendo observada uma maior incorporação do aminoácido em pH 5,0 (Silber, Rojas et al., 2006). Leu, Ile e valina (Val) são transportados por um único sistema que é capaz de reconhecer os três aminoácidos ramificados, sendo energizado pelo gradiente de H^+ (Manchola, Rapado et al., 2016). O transporte de His também já foi caracterizado demonstrando que o parasita é capaz de internalizar esse aminoácido por um transportador específico, sendo um transporte ativo dependente dos níveis de ATP do parasita (Barison, Damasceno et al., 2016). Já a Arg pode ser transportada por dois sistemas, sendo um de alta

afinidade (Pereira, Alonso et al., 1999) e outro de baixa afinidade (Canepa, Silber et al., 2004). Lys também pode ser incorporada pelo *T. cruzi* a partir do meio extracelular (Pereira, Alonso et al., 1999), enquanto que o transporte de Asp é dependente de H^+ (Canepa, Bouvier et al., 2005).

1.3.2 T. brucei

A participação dos aminoácidos no metabolismo energético de *T. brucei* tem sido descrita para as formas procíclicas, presentes no hospedeiro invertebrado, mas não participam do metabolismo energético nas formas sanguícolas, visto que o ciclo de Krebs não é funcional nestas formas (Bienen, Hammadi et al., 1981). Formas sanguícolas dependem da glicólise para produção de ATP, que é essencial para manutenção da sua viabilidade e proliferação (Ryley, 1962; Hannaert,Michels, 1994; Michels,Hannaert, 1994; Mazet, Morand et al., 2013). Formas procíclicas de *T. brucei* utilizam tanto Glc quanto aminoácidos como fonte de energia, aminoácidos como treonina (Thr), Glu e Pro são utilizados pelo parasita, que excreta Ala, succinato e piruvato como produtos resultantes do seu metabolismo (Cross, Klein et al., 1975; Lamour, Riviere et al., 2005; Bringaud, Barrett et al., 2012).

Uma análise do genoma de *T. brucei* mostrou que o parasita é provavelmente auxotrófico para os aminoácidos tirosina (Tyr), Gly, triptofano (Trp), fenilalanina (Phe), lisina (Lys), Arg, His, Leu, Val e Ile. A análise também mostrou que há diferenças em vias metabólicas importantes em comparação com as vias presentes em humanos, por exemplo, o parasita tem possibilidade de converter Asp em metionina (Met) ou Thr, diminuindo a dependência desses metabólitos no meio externo. Chama atenção também que aparentemente o parasita não apresenta as vias de conversão de Asn para Asp; Phe para Tyr e como também de serina (Ser) para Gly (Chaudhary,Roos, 2005).

O transporte de Arg e Lys já foi caracterizado em *T. brucei*. Esses transportadores são específicos, de alta afinidade, funcionais tanto em formas procíclicas quanto em formas sanguícolas (Mathieu, Macedo et al., 2017). O transporte de Pro em formas prociclicas de *T. brucei* também já foi caracterizado: é um único sistema de transporte ativo, dependente de ATP e pode ser inibido principalmente por Ala (51%) e cisteína (Cys) (35%), (L'Hostis, Geindre et al., 1993). O transporte de Met em *T. b. brucei* e *T. b. rhodesiense* foi caracterizado e foi demonstrado que a incorporação da Met em proteínas é maior em *T. b. brucei* do que em *T. b. rhodesiense* (Goldberg, Rattendi et al., 2000).

Recentemente foi demonstrado que o metabolismo de Pro é essencial para a sobrevivência das formas procíclicas no hospedeiro invertebrado. Parasitas *knockdown* para enzima pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (P5CDH), segunda enzima da via de degradação da Pro, não foram capazes de colonizar o intestino do inseto vetor (Bringaud, Barrett et al., 2012; Mantilla, Marchese et al., 2017), demonstrando assim a importância desse aminoácido para as formas procíclicas.

De forma geral, nota-se que os aminoácidos tem uma relevante importância também para o *T. brucei*, principalmente para os estágios presentes no hospedeiro invertebrado.

1.4 Glutamina e glutamina sintetase

A L-glutamina é a isoforma funcional do aminoácido Gln que é metabolizado por muitos organismos. Trabalhos distintos propõem que, em praticamente todos os seres vivos, a Gln participa no controle da utilização de nitrogênio dentro das células, sendo essa sua principal função em *Saccharomyces cerevisae* (Soberon,Gonzalez, 1987) e em integrantes do filo Cyanobacteria (Ames,Breaker, 2011). Em *Escherichia coli* a enzima glutamina sintetase (GS) é considerada a responsável pelo equilíbrio entre Gln e α-cetoglutarato na célula (Hart, Madar et al., 2011). Em células proliferativas, como células tumorais, Glc e Gln são as duas fontes primárias de carbono para produção de ATP e biossíntese. Gln também serve como um doador essencial de nitrogênio para a síntese de nucleotídeos, alguns outros aminoácidos e nicotinamida, além de participar também da síntese de proteínas. O destino metabólico da Gln pode ser dividido em reações que usam o γ-nitrogênio (síntese de nucleotídeos e hexosaminas) e a reações que usam α-nitrogênio ou o esqueleto de carbono (reações que usam o Glu resultante da primeira reação que utilizou Gln como substrato, e não a própria Gln) (DeBerardinis,Cheng, 2010). Gln é o aminoácido livre mais abundante no plasma e no músculo esquelético, com uma concentração extracelular de Gln de aproximadamente 0,7 mM (enquanto que a de Glu é aproximadamente 20 µM). No entanto dentro da célula a concentração de Glu é maior do que a concentração de Gln, sendo reportado entre 2 e 20 mM, devido a ação da enzima glutaminase que converte Gln a Glu logo que entra na célula. Em alguns tecidos como o fígado e o músculo esquelético, Glu e NH_4^+ são utilizados para a síntese de Gln pela ação da enzima GS, que atua na detoxificação da amônia (Newsholme, Lima et al., 2003; Xi, Jiang et al., 2011). No cérebro, a enzima GS está envolvida com a regulação da quantidade de Glu, visto que, quando o mesmo está em excesso é prejudicial para a função cerebral. De fato a GS é fundamental para a rápida retirada de Glu dos espaços

intersinápticos nas sinapses glutamatérgicas mediante a sua conversão para Gln, o que permite a re-sensibilização da sinapse depois de cada estímulo (Suarez, Bodega et al., 2002; Mates, Segura et al., 2009). Em células tumorais, a Gln é o substrato mitocondrial primário e é necessário para a manutenção do potencial de membrana e consequentemente da integridade mitocondrial (Mates, Segura et al., 2009; Szeliga,Obara-Michlewska, 2009; DeBerardinis,Cheng, 2010; Wise,Thompson, 2010). A expressão do gene de GS em *Escherichia coli* é altamente regulada pela necessidade de nitrogênio. A Gln ainda pode ser utilizada como base para síntese de moléculas ricas em nitrogênio, tais como nucleotídeos e aminoácidos, essenciais para a manutenção celular (Goodsell, 2002). A Gln também participa da via de hexosaminas pela ação da enzima glucosamina: frutose-6-fosfato aminotransferase (GF6PA) que é resposável pela transferência do grupo amida da Gln para a frutose-6-fosfato formando glucosamina-6-fostato que é precursor de reações de glicosilação como *N-linked* e *O-linked* (DeBerardinis,Cheng, 2010). Gln também é importante para *Toxoplasma gondii*, parasita intracelular obrigatório, participando da replicação, viabilidade e manutenção da infecção em células dendríticas (Lee, Evans et al., 2014), como também é catabolizada de forma canônica pelo ciclo de Krebs em *Plasmodium falciparum*, tanto no estágio sexual como no asexual (MacRae, Dixon et al., 2013).

Em *T. cruzi* e *T. brucei*, durante a degradação de aminoácidos ocorre um acúmulo de NH_4^+ na célula, como sub-produto da sua deaminação (Cross, Klein et al., 1975; Cazzulo, 1994). Uma via clássica para processar o excesso de NH_4^+ produzido metabolicamente é a sua detoxificação através do ciclo da ureia. Porém, foi demonstrado que o ciclo da ureia não é operativo em *T. cruzi* (Yoshida,Camargo, 1978) e não há predições de sequências codificantes para enzimas deste ciclo em *T. brucei*. Foi observado que o excesso de NH_4^+ pode ser excretado para o meio extracelular ou o NH_4^+ também pode ser transferido ao α-cetoglutarato formando Glu mediante a ação das enzimas glutamato desidrogenases citoplásmicas e mitocondriais (Caldas, Araujo et al., 1980; Duschak,Cazzulo, 1991). A reciclagem do α-cetoglutarato acontece por transaminação, processo no qual o Glu funciona como doador do grupo $–NH_2$ a piruvato, formando alanina, um dos principais subprodutos do metabolismo de aminoácidos de *T. cruzi* e *T. brucei* (Cross, Klein et al., 1975; Cazzulo, 1994).

As formas sanguícolas de *T. brucei* e as formas tripomastigotas sanguícolas de *T. cruzi* utilizam preferencialmente a Glc, que é abundante nos fluídos de seus hospedeiros vertebrados (Besteiro, Barrett et al., 2005; Silber, Tonelli et al., 2009). Já as formas amastigotas de *T. cruzi*, estágio replicativo, encontradas no citoplasma das células do hospedeiro mamífero, ambiente pobre em Glc, usam a Pro e talvez outros aminoácidos, como

fonte de carbono e energia. As formas amastigotas apresentam uma maior quantidade de Pro intracelular quando comparadas com as formas tripomastigotas (Tonelli, Silber et al., 2004; Magdaleno, Ahn et al., 2009). Aminoácidos como Thr, Gln, Glu e Pro são utilizados pelo *T. brucei*, que excreta Ala, succinato e piruvato como produtos do metabolismo (Cross, Klein et al., 1975; Mantilla, Marchese et al., 2017).

Considerando que a configuração do metabolismo de *T. cruzi* e *T. brucei* leva à produção de NH_4^+, que em grandes quantidades é tóxico para a célula, e que os mecanismos de detoxificação conhecidos são limitados, pois exigem o consumo de metabólitos reduzidos como piruvato e α-cetoglutarato, fica evidente a necessidade do parasita utilizar vias alternativas e/ou complementares para a detoxificação, reciclagem ou redistribuição da amônia. Uma das vias alternativas para detoxificação de NH_4^+, que tem sido explorada em nosso laboratório é a amidação de Glu para produzir Gln, reação irreversível catalizada pela enzima *Tc*GS (Figura 5) que utiliza Glu, NH_4^+ e ATP como substratos.

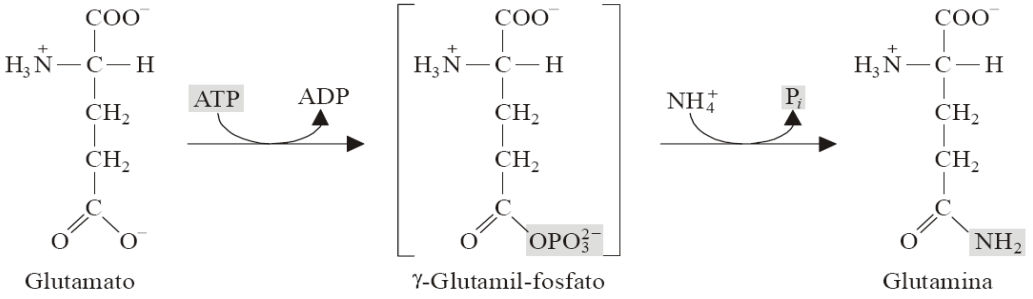

Figura 5 - Representação da reação catalizada pela enzima glutamina sintetase. A reação ocorre com fosforilação do Glu pelo ATP formando o intermediário γ-Glutamil-fosfato, que reage com NH_4^+ formando fosfato inorgânico (Pi) e Gln.

Dados ainda não publicados demonstram que em *T. cruzi* a enzima GS é ativa e sintetiza Gln a partir de Glu, ATP e NH_4^+, sendo mais expressa no estágio amastigota, que é intracelular. Também foi demonstrado que o tratamento de células CHO-K_1, infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi*, com o inibidor da enzima GS, metionina sulfoximine (MS), inibiu a evasão dos parasitas do vacúolo parasitóforo e diminuiu a eclosão das formas tripomastigotas, de forma dose-dependente (EC_{50}= 20,02 ± 0,91 µM), quando comparado com o controle. Além do mais a inibição da GS com a MS em formas epimastigotas, estágio

encontrado no inseto vetor, faz com que os parasitas sejam mais sensíveis à presença de amônia extracelular. Isto revela que a enzima GS participa da detoxificação de amônia nestes parasitas (Crispim et al*).

Outro fato interessante referente ao metabolismo de Gln e Glu, tanto em *T. cruzi* como em *T. brucei*, é que não há predição de sequências putativas referentes à enzimas envolvidas na conversão direta de Gln para Glu, ou seja, para a enzima glutaminase. No entanto, há predição para que a reciclagem de Glu ocorra mediante todas as reações que utilizam Gln como substrato, fazendo deste metabólito um doador do grupo $-NH_2$ para outras vias importantes para sobrevivência dos parasitas. Dentre essas vias, já foi demonstrada a participação da Gln na síntese de pirimidinas em *T. cruzi* (Nara, Hashimoto et al., 2012).

Em *T. brucei* foi sugerido que a inibição da enzima citidina trifosfato sintetase (CTP sintetase), que cataliza a formação de CTP a partir de UTP, ATP e Gln, pode ser um importante alvo terapêutico (Tamborini, Pinto et al., 2012; Oliveira de Souza, Dawson et al., 2017). Também já foi descrito que a proliferação de formas sanguícolas de *T. brucei* é inibida de forma dose-dependente quando tratadas com um inibidor da enzima GMP sintase (Li, Leija et al., 2015), enzima esta que também utiliza Gln como um dos seus substratos e tem Glu como um dos seus produtos.

Todos estes dados demonstram que a Gln tem um papel relevante para vários tipos celulares e que a enzima GS tem um papel fundamental na detoxificação de amônia em vários organismos, incluindo o *T. cruzi*. Estas informações levam a hipótese de que a enzima GS pode apresentar um papel relevante na detoxificação de amônia também em *T. brucei*, e que a Gln pode ter uma participação fundamental em processos biológicos importantes para manuntençao e viabilidade do *T. cruzi* e do *T. brucei*, levando-nos a propor os seguintes objetivos:

---

* Crispim, M.; Damasceno, F.S.; Hernández, A.; Barisón, M.J.; Sauter, I.P.; Pavani, R.S.; Moura, A.S.; Pral, E.M.F.; Cortez, M.; Elias, M.C.; Silber, A.M.; The glutamine synthetase of *Trypanosoma cruzi* is requerid for its resistance to ammonium accumulation and evasion of the parasitophorous vacuole during host-cell infection. Submitted

1.5 Objetivo geral

Avaliar a importância da L-glutamina na biologia do *T. cruzi*, ao longo do ciclo de vida do parasita, como também em formas sanguícolas de *T. brucei*.

1.5.1 Objetivos Específicos

1- Caracterizar bioquimicamente o transporte de Gln em *T. cruzi*.

2- Pesquisar o papel funcional da Gln em diferentes aspectos da biologia do parasita, tais como: proliferação, diferenciação, infectividade e resistência a diferentes tipos de estresse.

3- Verificar o efeito de análogos estruturais da Gln, nos diferentes estágios do *T. cruzi*.

4- Avaliar por meio de RNA de interferência o papel funcional da *Tb*GS e da Gln em formas sanguícolas de *T. brucei*.

CAPÍTULO 2: MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos utilizados, condições de cultivo e meios de obtenção dos diferentes estágios

2.1.1 Bactérias

2.1.1.1 Escherichia coli XL1Blue

Foram cultivadas em meio LB (Luria-Bertani) suplementado com o antibiótico correspondente.

2.1.2 Parasitas

2.1.2.1 Trypanosoma cruzi

Cepa CL, clone 14 (Brener,Chiari, 1965).

2.1.2.1.1 Epimastigotas

As formas epimastigotas foram mantidas em crescimento exponencial em meio LIT (*liver infusion tryptose*), suplementado com 10% de SFB e 0,2% de glicose (Camargo, 1964) a 28 ºC.

2.1.2.1.2 Tripomastigotas metacíclicos

As formas tripomastigotas metacíclicas foram obtidas por meio de diferenciação de formas epimastigotas em meio defenido. Para isso as formas epimastigotas foram sincronizadas para fase exponencial de crescimento, por meio de uma passagem de 24 h. Os parasitas foram contados (confirmando a fase exponencial) e distribuídos em garrafas (5×10^6 parasitas mL^{-1}) em meio LIT. Os parasitas foram incubados por 4 dias para atingirem a fase estacionária de crescimento. Após 4 dias, os parasitas foram contados (confirmando a fase estacionária) lavadas por centrifugação (5 min, 1600 x *g*) com PBS (137 mM NaCl; 2,6824 mM KCl; 8 mM Na_2HPO_4; 1,4696 mM KH_2PO_4) e transferidos para meio TAU (*Triatomine Artificial urine*) 190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, 8 mM tampão fosfato de K, pH 6,0 (Contreras, Salles et al., 1985). Os parasitas (5×10^7 mL^{-1}) foram mantidos em meio TAU por 2 h a 28 °C. Após esse tempo os parasitas foram centrifugados e

ressuspendidos no meio padrão de diferenciação, TAU3AAG (TAU suplementado com 10 mM de Glc, 2 mM de Asp, 50 mM de Glu e 10 mM de Pro). No sexto dia de incubação (pico máximo de diferenciação) o sobrenadante das garrafas foi transferido para tubos de 50 mL, lavados duas vezes com PBS e uma vez com PBS-2% glicose. O *pellet* foi ressuspendido em 1 mL de PBS-2% de Glc. Os parasitas foram purificados em coluna com resina DEAE celulose, equilibrada com tampão fosfato salino modificado (PBSG: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM NaH_2PO_4, 4% Glc, pH 8,0) (Teixeira,Yoshida, 1986). Os parasitas purificados foram contados em câmara de Neubauer e foi avaliado o grau de pureza (95% de metacíclicos foi considerado aceitável). Os parasitas foram utilizados em ensaios posteriores.

2.1.2.1.3 Tripomastigotas

Formas tripomastigotas foram obtidas por meio de infecção de células da linhagem CHO-K_1 (*Chinese Hamester Ovary*) cultivadas a 37 °C conforme descrito em (Tonelli, Silber et al., 2004). As células previamente cultivadas em garrafas de 75 cm^3 foram infectadas com formas tripomastigotas, por 12 h. Após esse período de incubação as células foram lavadas duas vezes com PBS para remover os parasitas que ainda estavam no sobrenadante. Durante as primeiras 24 h da infecção as células foram mantidas em meio RPMI-1640, 10% de SFB, a 37 °C, 5% CO_2, sob atmosfera úmida. Após esse período, o meio de cultivo com 10% de SFB foi substituído por meio com 2% de SFB, e as culuras foram transferidas da temperatura 37 °C para 33 °C. A partir do 4° dia pós-infecção, os parasitas que estavam no sobrenadante foram coletados. O sobrenadante foi transferido para tubos falcon (50 mL) e centrifugado (2 min, 115 x *g*, 4 °C) para separação de células CHO-K_1 presentes no sobrenadante. Após essa centrifugação o sobrenadante foi transferido para outro tubo falcon e novamente centrifugado (10 min, 2900 x *g*, 4 °C). Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e os parasitas foram ressuspendidos em meio RPMI e utilizados em experimentos posteriores.

2.1.2.1.4 Amastigotas e epimastigotas intracelulares

As formas intracelulares foram obtidas por meio de infecção em células CHO-K_1, conforme descrito anteriormente. Após 48 h de infecção, quando são encontradas as formas amastigotas e após 80 h quando majoritariamente são encontradas as formas epimastigotas intracelulares, as células foram lisadas para obtenção das formas intracelulares, como descrito a seguir: o sobrenadante das garrafas foi removido e as células foram lavadas duas vezes com

PBS. Após a lavagem das células, foi adicionados 2,5 mL de PBS 0,05% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e as garrafas foram homegeneizadas para que ocorresse a lise das células e a liberação dos parasitas no sobrenadante. A liberação dos parasitas foi monitorada por observação ao microscópio e após a visualização dos parasitas, a ação do SDS foi interrompida pela adição de 3 mL de PBS 10% SFB. A solução de *debris* celulares e parasitas foi transferida para um tubo falcon, foi adicionado mais 5 mL de PBS 10% SFB, homogeneizada e centrifugada (10 min, 115 x *g*, 4 °C) para remoção dos *debris* celulares. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado novamente (2900 x *g*, 10 min, 4 °C). Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e os parasitas foram ressuspendidos em PBS 10% SFB, contados em câmara de Neubauer, avaliado o grau de pureza e utilizados em ensaios posteriores.

2.1.2.2 Trypanosoma brucei

2.1.2.2.1 *Trypanosoma brucei brucei* lister 427.

Formas sanguícolas (*Single Marker Bloodstream* form, SMB), que expressam a polimerase T7 e o repressor Tet, foram mantidas com passagens suscessivas em meio de cultura HMI-9 suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) a 37 °C, em atmosfera úmida, na presença de 5% de CO_2.

2.2 Caracterização do transporte de L-Glutamina em *Trypanosoma cruzi*

2.2.1 Ensaio de transporte

A caracterização do transporte de Gln foi feita em formas epimastigotas de *T. cruzi*, conforme descrito em (Silber, Tonelli et al., 2002). A incorporação do aminoácido também foi avaliada nos demais estágios do ciclo de vida do parasita: amastigota, epimastigota intracelular, tripomastigotas oriundos de infecção em células de mamífero e tripomastigota metacíclico.

2.2.1.2 Transporte em formas epimastigotas

Formas epimastigotas foram cultivadas em meio LIT, 28 °C. O cultivo foi iniciado com a densidade celular de 1 x 10^7 mL^{-1} e os parasitas foram cultivados por 48 h para atingirem a fase exponencial de crescimento (4 a 6 x 10^7 mL^{-1}). As células foram lavadas duas vezes em PBS (1 600 x *g*, 5 min, 4 °C) e ressuspendidos no mesmo tampão a uma densidade final de 2 x 10^8 células/mL. A suspensão de parasitas foi distribuída em alíquotas de 100 µL (2 x 10^7 células). O transporte foi iniciado pela adição de 100 µL de Gln em PBS, concentração final 3 mM, na presença de 1,6 µCi de L-[3,4-^{3}H(N)]-Glutamina (Perkin-Elmer, Boston, MA, EUA). A menos que seja especificado, a incorparação da Gln foi medida a 28 °C, por um minuto, na presença de 3 mM de Gln radioativamente marcada. A interrupção do transporte foi feita pela adição de 800 µL de Gln não marcada, em PBS (50 mM) e os tubos foram colocados em gelo imediatamente após a adição da solução de Gln. Para cada condição foi analisado o tempo zero de incorporação, pela adição simultânea da solução de Gln marcada e da Gln não marcada radioativamente. Após a incorporação de Gln, nos diferentes tempos, os parasitas foram lavados duas vezes por centrifugação (10 000 x *g*, 2 min, 4 °C) ressuspendidos em 100 µL de PBS e transferidos para tubos com 1 mL de líquido de cintilação (*optiphase hisafe III*, Perkin-Elmer). A quantidade de Gln incorporada foi avaliada pela detecção de cpms (cintilações por minuto) pela leitura das amostras no detector de cintilação *Perkin Elmer Tri-carb 2910 TR*. As cpms foram transformadas em concentração de Gln incorporada, utilizando-se a seguinte fórmula: $Gln_i = cpm_i\ [Gln]\ \upsilon\ cpm_{st}^{-1}$

Onde:

Gln_i = Gln incorporada; **cpm_i** = quantidade de cpm incorporada pelo parasita (tempo 1 min – tempo 0); **[Gln]** = concentração (nM) de Gln radioativamente marcada; **υ** = volume da solução de Gln radioativamente marcada adicionada em cada reação (100 µL em todos os casos), **cpm_{st}** = máximo de cpms no volume de Gln marcada adicionado em cada reação.

2.2.1.3 Dependência do transporte em relação ao tempo, V_{max} e K_m

A incorporação de Gln em relação ao tempo foi medida utilizando a mesma concentração do substrato (3 mM) e diferentes períodos de incubação dos parasitas (0 a 3 h), e foi calculado em que tempo inicial o transporte é linear. Também foi avaliado o transporte de Gln em relação à concentração do substrato, para isso a incorporação do aminoácido foi medida em função da concentração externa de Gln. Os dados obtidos foram utilizados para

ajuste da função hiperbólica derivada do modelo cinético de Michaelis-Menten, sendo determinados os valores de V_{max} e K_m.

2.2.1.4 Dependência do transporte com a temperatura

A influência da temperatura no transporte de Gln foi avaliada pela realização do transporte com os parasitas incubados em diferentes temperaturas (10; 15; 20; 28; 33; 37; 40 e 45 °C). Os parasitas foram mantidos a 28 °C (temperatura do cultivo) até o momento da realização do transporte. O transporte foi feito como descrito anteriormente.

2.2.1.5 Dependência do transporte com o pH

Para avaliar se o transporte de Gln depende do pH do meio externo, o ensaio de transporte foi realizado em tampões com diferentes pH. Tampão citrato 0,1 M (pH 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5) e tampão PBS (pH 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5). Os parasitas foram lavados em PBS (pH 7,2) e ressuspendidos no tampão com o pH específico antes do ensaio transporte. A Gln radioativamente marcada (3 mM) também foi preparada no tampão com o pH correspondente.

2.2.1.6 Dependência do transporte com íons externos

Para avaliar se o transporte de Gln em *T. cruzi* depende de íons no meio externo foi feito o ensaio de transporte na presença de Na^+ ou K^+. Para isso o transporte foi feito com os parasitas incubados em tampão PBS contendo apenas Na^+ ou K^+ (149,5 mM). Como controle foi utilizado o tampão PBS e tampão colina (139,7 mM). A solução de Gln marcada (3 mM) também foi preparada no tampão específico.

2.2.1.7 Dependência de energia

Para avaliar a dependência do transporte de Gln pelo gradiente de prótons foi utilizado o ionóforo FCCP (carbonil cianida p-trifluorometoxifenilhidrazona) na concentração de 5 µM em PBS, na presença ou ausência de oligomicina (5 µg/ml). Os parasitas foram ressuspendidos na solução específica e utilizados imediatamente para o transporte. A influência dos níveis de ATP intracelular no transporte, foi avaliada pela incubação dos parasitas em PBS na presença de oligomicia A (5 µg/mL) e o transporte foi realizado no

tempo zero de incubação, 30 e 60 min. Para avaliar se o ATP sintetizado pela via glicolítica seria capaz de reestabelecer os níveis de transporte, os parasitas foram incubados na presença de oligomicina A (5 µg/mL) e glicose (3 mM) por 60 min.

2.2.1.8 Transporte de Gln na presença de aminoácidos e análogos de Gln como competidores

A especificidade do transportador de Gln foi avaliada utilizando Gln radioativamente marcada (como descrito anteriormente) na concentração correspondente a K_m do transportador, previamente estabelecido (1,2 mM), na presença de outros aminoácidos (Glu, Asp, Asn, Ala, Arg e His) e também na presença de análogos estruturais de Glu e Gln: Acivicin (ACV), Azaserine (AZA), Ácido 2,4-Diamino-Pentanedioco (DPA) e MS na concentração correspondente a 10x K_m (12 mM). Como controle positivo de inibição foi utilizado Gln na concentração correspondente a 10x K_m.

2.2.1.9 Exponencial e estacionária

Para avaliar mudanças no perfil do transportador em parasitas em fase exponencional e estacionária de proliferação, formas epimastigotas em fase exponencial (4 a 6 x 10^7 mL^{-1}) foram utilizadas para o transporte e,do mesmo cultivo, foram diluídos em meio LIT para 5 x 10^6 mL^{-1}. Após 4 dias de incubação, quando estavam em fase estacionária (8 a 10 x 10^7 mL^{-1}), os parasitas foram utilizados para o transporte.

2.2.1.10 Estresse nutricional

Para avaliar se o estresse nutricional influencia no transporte de Gln, parasitas em fase exponencial de proliferação foram lavados duas vezes em PBS e incubados por 3 h em PBS, a 28 °C. Após o período de incubação os parastitas foram utilizados para o transporte. Como controle foi utilizado parasitas mantidos em LIT.

2.2.1.11 Transporte em formas tripomastigotas metacíclicas

Formas tipomastigotas metacíclicas, obtidas como descrito anteriormente (seção 2.1.2.1.2), foram utilizadas para o transporte de Gln. Os parasitas foram incubados na

presença da Gln marcada radioativamente. O transporte foi realizado conforme descrito para formas epimastigotas.

2.2.1.12 Transporte de Gln em estágios do T. cruzi presentes no hospedeiro mamífero

O transporte de Gln também foi avaliado em formas do parasita presentes no hospedeiro mamífero. Amastigotas, epimastigotas intracelulares e tripomastigotas oriundos de infecções em células CHO-K_1, obtidas conforme descrito anteriormente, foram incubadas na presença de Gln radioativamente marcada por 1 e 5 min. O transporte foi realizado conforme descrito para formas epimastigotas.

2.3 Avaliação da importância da Glutamina para o *T. cruzi*

2.3.1 Viabilidade de formas epimastigotas

Parasitas em fase exponencial de crescimento foram lavados duas vezes com PBS (10 min, 1100 x *g*, 4 °C). Os parasitas, 3 x 10^7 células mL^{-1}, foram ressuspendidos em PBS suplementado com 10 mM de Gln, Glu, Pro ou apenas PBS (controle). Após 24 e 48 h a viabilidade celular dos parasitas foi avaliada utilizando-se o método de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tretazolio bromida) (Mosmann, 1983). Os parasitas foram lavados uma vez com PBS, o *pellet* foi ressuspendido em 300 µl de PBS e distribuídos em triplicata em placa de 96 poços. Foi adicionado 20 µl de MTT (5 mg/mL) e a placa foi incubada a 28 °C, protegida da luz, por 4 horas. Após esse período a reação foi interrompida com a adição de 100 µl de SDS 10%. A viabilidade das células foi observada mediante o aparecimento da cor azul de *formazan* homogêneo "*thiazolidin*". As placas foram lidas em espectofotômetro de placa utilizando-se λ 595 nm e como referência λ 690 nm.

2.3.2 Avaliação dos níveis de ATP intracelular

Para avaliar os níveis de ATP intracelular, em formas epimastigotas de *T. cruzi*, foi utilizado o kit bioluminescente para células somáticas, Sigma-Aldrich (Sigma-Alderich, Saint Louis, MO, USA). Parasitas em fase exponencial de crescimento foram lavados duas vezes em PBS e incubados por 16 h em PBS. Após esse período foi adicionado 5 mM de Gln, Glu, ou Pro, PBS foi usado como controle. Após a incubação por um período de 24 h, nos

diferentes metabólitos, 1 x 10^7 parasitas foram lavados em PBS (10,000 x *g*, 2 min, 4 °C) e ressuspendidos em 200 µL de tampão de lise + 200 µL de PBS. O lisado foi destribuído em triplicata em placa de 96 poços (50 µL por poço) e adicionado a enzima luciferase. A concentração de ATP foi determinada utilizando-se a curva padrão das diferentes concentrações de ATP. A luminescência foi obtida pela reação entre a luciferase e o ATP que foi liberado após a lise celular, sendo determinada pela utilização do luminômetro *Spectramax i3, Molecular Devices*, utilizando-se um λ 570 nm (Martins, Covarrubias et al., 2009). A normalização foi feita com a quantificação das proteínas totais do lisado, ulitlizando-se o método de Bradford (Bradford, 1976).

2.3.3 Participação da Gln no ciclo intracelular

2.3.3.1 Participação da Gln na infectividade de formas tripomastigotas

As formas tripomastigotas obtidas de sobrenadantes dos cultivos em garrafas foram contadas e incubadas (2,5 x 10^6 parasitas) em PBS por 4 h. Após esse período foi adicionado Glu ou Gln (3 mM). Parasitas também foram incubados em RPMI ou PBS como controles. Após o período de incubação na presença dos aminoácidos, os parasitas foram utilizados para infectar as células CHO-K_1, plaqueadas previamente. Os parasitas ficaram em contato com as células por 3 h. Após esse período as células foram lavadas com PBS e os parasitas que ainda esstavam no sobrenadante foram removidos. Foi adicionado RPMI 10% SFB, e a placa incubada a 37 ºC. As células foram fixadas 24 h após a infecção e marcadas com *Hoechst*.

2.3.3.2 Fixação e marcação das células CHO-K_1

Após 24 h da infecção, o sobrenadante foi removido e a placa foi lavada uma vez com PBS. Foi adicionado 100 µl de paraformaldeido 4% e incubado por 5 mim. O paraformaldeido foi removido e os poços foram lavados uma vez com PBS. Foi adicionado 100 µl de *hoechst* (diluição 1:2000) e incubado por 1 min. A solução de *hoechst* foi removida e os poços foram lavados uma vez com PBS. As céluas foram fotografadas utilizando-se o microscópio de fluorescencia Evos®*fl*, e foram contadas 400 células aleatoriamente.

2.3.3.3 Participação da Gln na eclosão de formas tripomastigotas

As formas tripomastigotas obtidas de sobrenadantes de cultivos foram incubadas na presença de Gln, Glu, ou PBS (controle negativo) e utilzadas para infectar células CHO-K_1, conforme descrito na seção 2.3.3.1. Após a remoção dos parasitas que ainda estavam no sobrenadante, as células foram mantidas em meio RPMI, a 37 °C, por 24 h. Em seguida o meio 10% foi substituído por meio RPMI 2% SFB e a temperatura foi mudada para 33 °C. Entre os dias 4 e 6 pós-infecção, os parasitas que estavam no sobrenadante foram contados em câmara de Neubauer.

2.3.4 Importância da Gln na metaciclogênese

2.3.4.1 Diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos

Formas epimastigotas foram sincronizadas para fase exponencial de crescimento, por meio de um repique de 24 h. Os parasitas foram contados (confirmando a fase exponencial) e distribuídos em garrafas (5 x 10^6 parasitas mL^{-1}) em meio LIT. Os parasitas foram incubados por 4 dias para atingirem a fase extacionária de crescimento. Após 4 dias, os parasitas foram contados (confirmando a fase estacionária) lavadas por centrifugação com PBS (5 min, 1600 x *g*, 4 °C) e transferidos para meio TAU foram mantidos em meio TAU por 2 h a 28 °C. Após esse tempo os parasitas foram centrifugados e ressuspendidos TAUGln (TAU suplementado com 10 mM de Gln) ou TAUGlu (TAU suplementado com 10 mM de Glu). O meio padrão de diferenciação, TAU3AAG, foi utilizado como controle. A porcentagem de diferenciação foi monitorada a cada dia por contagem dos parasitas em câmara de Neubauer. No sexto dia de diferenciação os parasitas foram purificados em coluna de DEAE-celulose e utilizados para infectar células CHO-K_1.

2.3.4.2 Infectividade das formas tripomastigotas diferenciadas em meio TAUGln

Os parasitas purificados de cada condição foram contados em câmera de Neubauer e avaliado o grau de pureza (95% de metacíclicos foi considerado aceitável). Após a contagem foi avaliada a capacidade de invasão celular dos parasitas: células CHO-K_1, previamente plaqueadas, foram infectadas com 2,5 x 10^6 metacíclicos por poço, conforme descrito anteriormente. Após 24 h da infecção, as células foram marcadas com Hoechst e foi avaliada

a quantidade de células infectadas, com parasitas oriundos das diferentes condições de diferenciação.

2.3.4.3 Eclosão de formas tripomastigotas

Tripomastigotas metacíclicos diferenciados em meio TAU 3AAG, TAU Gln ou TAU Glu e purificados conforme descrito anteriormente, foram utilizados para infectar células CHO-K_1. A infecção foi feita conforme descrito na seção 2.3.3.1 e a eclosão de formas tripomastigotas foi avaliada a partir do 6º dia pós-infecção até o 15° dia. Os parasitas foram contados em câmara de Neubauer.

2.4 Avaliação do efeito de análogos de Gln

2.4.1 Epimastigotas

2.4.1.1 Curvas de proliferação

Para avaliar o efeito de análogos de Gln e Glu em formas epimastigotas, paraistas em fase de crescimento exponencial (4 a 6 x 10^7 células mL^{-1}) foram utilizados. As células (2,5 x 10^6 células mL^{-1}) foram tratadas com diferentes concentrações dos análogos, como controle negativo parasitas foram cultivados sem tratamento e como controle positivo os parasitas foram tratados com rotenona (60 µM) e antimicina (0,5 µM). Os parasitas, tratados e controle, foram cultivados em placas de 96 poços, a 28 °C. A proliferação celular foi estimada por leitura da absorbância da densidade ótica (DO) em 620 nm durante 8 dias. A absorbância foi transformada em valores de densidade celular (células/ml) usando uma equação de regressão linear que foi obtida previamente sob as mesmas condições. A concentração do composto que inibiu 50% da proliferação dos parasitas (IC_{50}) foi determinada na fase exponencial de crescimento (5° dia) mediante ajuste dos dados na curva dose-resposta com a equação clássica sigmóide (Magdaleno, Ahn et al., 2009).

2.4.1.2 Viabilidade dos parasitas tratados com os análogos de Gln

A viabilidade dos parasitas tratados com os diferentes análogos, foi avaliada após 48 h de tratamento. Formas epimastigotas de *T. cruzi* em fase de crescimento exponencial (5 a 6

x 10^7) foram lavadas duas vezes em PBS e ressuspendidas em PBS suplementado com Gln, Glu e concentração dos análogos correspondente ao IC_{50}, parasitas incubados em PBS ou LIT foram utilizados como controle. Após 48 h de incubação os parasitas foram distribuídos em placas de 96 poços, na concentração final de 1 x 10^6 parasitas, e foi adicionado rezasurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido, AlamarBlue®) 0,125 µg/mL e incubado por 2 h a 28 ºC. A viabilidade celular foi avaliada pela redução da resazurina a resorufina que é fluorescente. A intensidade fluorescência foi obtida nos comprimentos de onda 530 nm de excitação e 590 nm de emissão (Anoopkumar-Dukie, Carey et al., 2005).

2.4.1.3 Análise de parâmetros relacionados a morte celular

Os parasitas, tratados com os diferentes análogos, foram incubados em PBS por 48 h. Após esse período de incubação, os parasitas foram lavados uma vez em tampão anexina (HEPES 10 mM; Nacl 140 mM; $CaCl_2$ 5 mM, pH 7.4)**,** ressusspendidas em 50 µL do mesmo tampão e foi adicionado iodeto de propídio (concentração final 1 µg/ µL) e anexina (1 µM) conforme indicações do fabricante, e incubados em gelo por 15 min. Após o período de incubação foi adicionado 450 µL do tampão anexina e as células foram analisadas por citometria de fluxo (FACScalibur).

2.4.1.4 Recuperação dos parasitas em LIT

Para avaliar se os parasitas, cultivados em PBS e tratados com os diferentes análogos por 48 h, seriam capazes de recuperar o perfil normal de proliferação, os mesmos foram transferidos para o meio LIT (2,5 x 10^6 mL^{-1}). Os parasitas foram cultivados em placa de 96 poços, a 28 °C, conforme descrito anteriormente. No quinto dia de cultivo (fase exponencial de crescimento) foi analisada novamente a morte celular, conforme descrito anteriormente, e a proliferação.

2.4.2 Efeito dos análogos na metaciclogênese

Também foi avaliado o efeito dos análagos de Gln e Glu na diferenciação das formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos. A diferenciação foi feita como descrito anteriormente, na presença dos análogos. Os parasitas foram contados por 10 dias em câmara de Neubauer e foi avaliada a porcentagem de diferenciação em cada condição de cultivo.

2.4.3 Efeito dos análogos no ciclo intracelular

2.4.3.1 Toxicidade em células CHO-K_1

A toxicidade dos análogos em células de mamíferos foi avaliada incubando células CHO-K_1 (5 x 10^5 células por poço) em placas de 24 poços em meio RPMI suplementado com SFB (10%) na presença de diferentes concentrações dos análogos ou não (controle). As placas foram mantidas em estufa a 37 ºC, 5% de CO_2, sob atmosfera úmida. A viabilidade celular foi avaliada 48 h após o início do tratamento utilizando-se o método de MTT (Mosmann, 1983). As células foram lavadas duas vezes com PBS e adicionou-se 200 µL de PBS e mais 50 µL de MTT (5 mg/mL) e foram incubadas a 37 °C por 3 h. A reação foi interrompida pela adição de 200 µL de SDS 10%. As placas foram lidas em espectofotômetro de placa utilizando-se λ 595 nm e como referência λ 690 nm.

2.4.3.2 Tratamento das células CHO-K_1 infectadas

Após a análise da toxicidade dos análogos em células CHO-K_1, concentrações consideradas não tóxicas para as células foram utilizadas para avaliar o efeito dos mesmos no ciclo intracelular do parasita. Células CHO-K_1 (5 x 10^4 por poço) foram mantidas em placas de 24 poços em meio RPMI 10% SFB a 37 °C, e infectadas com formas tripomastigotas, conforme descrito anteriormente. Após a invasão dos parasitas, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos análogos. Do 4° ao 6° dia pós-infecção, os tripomastigotas que estavam no sobrenadante foram contados em câmara de Neubauer.

2.4.4 Medições de atividade das enzimas glutamina sintetase (GS) e da enzima glucosamina: frutose-6-fosfato aminotransferase (GF6PA).

2.4.4.1. Atividade da enzima GS na presença dos análogos

A atividade enzimática da enzima *Tc*GS foi avaliada em extratos dos parasitas em fase exponencial de cresciemento, cultivados em meio LIT, utilizando o sistema clássico de acoplamento com as enzimas piruvato quinase e lactato desidrogenase:

$$\text{L-Glutamato} + \text{ATP} + NH_4^+ \xrightarrow{GS} \text{L-Gln} + \text{ADP} + \text{Pi}$$

$$\text{ADP} + \text{fosfoenolpiruvato} \xrightarrow{PK} \text{ATP} + \text{Piruvato}$$

$$\text{Piruvato} + \beta\text{-NADH} \xrightarrow{LDH} \text{L-lactato} + \beta\text{-NAD}$$

A atividade no extrato foi medida na presença de 100 µM dos análogos, adicionados no momento da reação ou previamente incubados por 30 min. A mesma foi monitorada por espectrofotometria a 340 nm observando-se a oxidação do NADH (substrato da enzima LDH). A absorbância foi convertida à concentração de NAD formado na reação. A reação enzimática foi medida, conforme previamente padronizada por (Crispim et al.[*]), na presença dos seguintes reagentes (34,1 mM tampão imidazol; 1 mM L-Glu; 1 mM ATP; 1 mM NH_4Cl; 18,9 mM KCl; 1 mM $MgCl_2$; 0,25 mM NADH; 1,1 mM fosfoenolpirurato; 1 U PK/LDH) e foi utilizado 50 µg do extrato para cada medição.

2.4.4.2 Atividade da enzima GF6PA em extrato de T. cruzi na presença dos análogos

A atividade da GF6PA foi medida, em uma reação com dois passos, baseado na capacidade da enzima produzir L-Glu utilizando L-Gln como um dos substratos:

$$(1)\ \text{L-Gln} + \text{D-frutose-6-fosfato} \xrightarrow{GF6PA} \text{L-Glu} + \text{D-glucosamina6-fosfato}$$

$$(2)\ \text{L-Glu} + H_2O + NAD^+ \xrightarrow{GDH} \text{Alfa-cetoglutarato} + NH_3 + \text{NADH}$$

A reação foi feita na presença de tampão Tris HCl 50 mM; Gln 1 mM; Frutose-6-fosfato 1,5 mM; EDTA 1 mM e extrato de formas epimastigotas de *T. cruzi* 50 µg, na presença ou não de 100 µM dos análogos de Gln. A reação ocorreu por 5 min e foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (TCA) (1/1). Como controles foi feita a reação sem a adição da Frutose-6-fosfato, um dos substratos da reação, ou na ausência do extrato do parasita. O produto da reação foi utilizado para medir a atividade da enzima glutamato desidrogenase (GDH) comercial (Sigma-Aldrich) que pode ser monitorada pela redução de NAD^+ e consequentemente o aumento da absorbância a 340 nm. A aborbância foi

[*] Crispim, M.; Damasceno, F.S.; Hernández, A.; Barisón, M.J.; Sauter, I.P.; Pavani, R.S.; Moura, A.S.; Pral, E.M.F.; Cortez, M.; Elias, M.C.; Silber, A.M.; The glutamine synthetase of *Trypanosoma cruzi* is requerid for its resistance to ammonium accumulation and evasion of the parasitophorous vacuole during host-cell infection. Submitted.

convertida à concentração de NADH formado na reação. A reação foi feita na presença do tampão Tris HCl 50 mM; NAD^+ 7 µM; o Glu formado na reação anterior e a enzima GDH por 5 min. A atividade da enzima GDH é diretamente proporcional ao Glu formado na reação anterior. Como controle também foi medida a atividade da GDH na presença de concentrações conhecidas de Glu e na presença dos análogos.

2.5 *Trypanosoma brucei*

2.5.1 Manipulação do DNA

2.5.1.1 Extração de DNA genômico de T. brucei

Formas sanguícolas de *T. brucei* foram utilizadas para a obtenção do DNA genômico. Aproximadamente 5 x 10^6 células foram centrifugadas e lavadas com PBS (6 000 x *g*, 5 min, 4 °C) e ressuspendidas em tampão de lise (Tris-HCl 0,2 M; EDTA 0,01 M; SDS 0,5% v/v, pH 8) e foi adicionado 50 µg/mL de proteinase K e incubados por 5 min a temperatura ambiente. Após o período de incubação, o DNA foi extraído por tratamento com fenol/clorofórmio. A fase aquosa foi recuperada por centrifugação (6000 x *g*, 5 min). A preciptação do DNA foi feita pela adição de dois volumes de isopropanol gelado e centrifugação (10000 x *g*; 15 min). O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado três vezes por centrifugação (6000 x *g*; 5 min) com etanol 70%. Após secar a temperatura ambiente, o DNA foi ressuspendido em 150 µl de H_2Od e a concentração foi determinada usando o equipamento *NanoDrop* (Spectrophotometer ND-1000).

2.5.1.2 Desenho dos iniciadores específicos para TbGS

O desenho dos iniciadores foi feito com base na sequência anotada no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) >gi|72392163:1317986-1319251 *Trypanosoma brucei brucei* cepa 927/4. Os oligonucleotídeos (*Fw* AAGGATCCATGTTGTCGGGCATTACC; *Rv* GGCTCGAGCTACACCTTAGAAGTACT) foram sintetizados com sítios de clivagem para as endonucleases de restrição BamHI e XhoI. Os iniciadores amplificam uma sequência de 1266 pares de base, correspondente a enzima glutamina sintetase.

2.5.1.3 Amplificação de DNA por PCR

A reação de PCR foi feita utilizando 100 ng do DNA genômico como molde, 0,2 pmol/mL de oligonuceotídeos, 0,2 mM de dNTPs, 2 mM $MgCl_2$ e 2,5 U da enzima Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA®). A condição de amplificação utililizada foi 35 ciclos de amplificação, com desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, e desnaturação antes de ciclo a 95 °C por 1 min, seguida por anelamente dos oligos ao DNA molde a 58 °C por 1:30 min e extensão da cadeia nucleotídica a 72 °C por 3 min. A extensão final adicional foi feita 72 °C por 10 min. Para PCR de colônias, as células da placa foram coletadas utilizando palito de madeira estéril e ressuspendidas em 25 µl de água estéril. As amostras foram lisadas por incubação a 100 °C, por 10 min e foi utilizado 2 µl do lisado, como molde, para cada reação de PCR.

2.5.1.4 Eletroforese em gel de agarose

A amplificação da sequência de interesse foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TAE 1x (0,04 M Tris, 1 mM EDTA, pH 8 ajustado com ácido acético) e brometo de etídio na concentração final de 0,3 µg/mL. Ao fragmento de DNA amplificado foi adicionado tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xileno cianol e 20% de glicerol). O padrão de peso molecular utilizado foi 1 kb DNA Ladder (Thermo®). A corrida foi conduzida a 100 mA e o gel foi visualizado no transluminador sob fonte de luz UV e fotografados em sistema *ImageQuant*® 300 (GE Healthcare®, Pitsburg, PA, EUA).

2.5.1.5 Clonagem da sequência de interesse no vetor p2T7-177

O produto da amplificação por PCR foi purificado a partir do gel de agarose utilizando o kit comercial GeneJET (Thermo®) conforme instruções do fabricante e quantificado conforme descrito anteriormente. O produto foi ligado em 50 ng do vetor p2T7 (razão molar de inserto:vetor 4/1), utilizando 1 U da enzima T4 DNA ligase (Promega®, Madison, WI, EUA) e tampão ligase (1x). A reação foi incubada por 16 h a 4 °C. A constução foi confirmada pelo tratamento com enzimas de restrição e análise dos fragmentos em gel de agarose, além do mais a sequência clonada foi analisada por sequenciamento, após PCR utilizando iniciadores específicos.

2.5.1.6 Transformação de bactérias competentes

As bactérias competentes (*Escherichia coli* XL1Blue) foram incubas com o produto da ligação por 30 min. Após o período de incubação as células foram submetidas ao choque térmico (42 °C, 2 min) e imediatamente colocadas no gelo por 10 min. As células foram recuperadas em meio LB por 1 h sob agitação (200 rpm) a 37 °C, e transferidas para placas de LB sólido na presença de ampicilina e tetraciclina, antibióticos de seleção do plamídeo e da bactéria, respectivamente. As colônias que cresceram na placa foram isoladas e utilizadas para confirmação da construção por meio de PCR de colônias.

2.5.1.7 Linearização do vetor

Após a confirmação da construção p2T7*Tb*GS, o vetor foi linearizado utilizando a enzima de restrição Not I (Thermo®) conforme indicações do fabricante. A linearização do vetor foi confirmada por eletroforese em gel de agarose e foi utilizado 10 µg do DNA plasmidial para transfecção dos parasitas.

2.5.2 Manipulação dos parasitas

2.5.2.1 Transfecção dos parasitas

Formas sanguícolas de *T. brucei brucei* (SMB) em fase exponencial de crescimento (1-1.5 x 10^6 mL^{-1}) foram utilizadas para transfecção. Os parasitas foram lavados por centrifugação (1000 x *g*, 10 min, TA) em tampão *cytomix* (0,76 g/L EGTA; 8,88 g,L KCl; 19,20 mg/L $CaCl_2$ x 2 H_2O; 1,01 g/L Mg $CaCl_2$ x 6 H_2O; 5 g/L Glc; BSA; 100 mg/L; 5,96 g/L HEPES; 100 mL/L K_2HPO_4/ KH_2PO_4 (100mM, pH 7,6); 100 mL/L Hipoxantina (1,36 g em 100 mL, 4% NaOH) pH 7,6 ajustado com KOH). Após serem lavados os parasitas (2,5 x 10^7) foram ressuspendidos em tampão *cytomix* e transferidos para cubetas de eletroporação (2 mm) e foi adicionado 10 µg do vetor p2T7*Tb*GS linearizado (volume final na cubeta: 450 µL). A eletroporação foi feita com um pulso (1,400 V, 25 µF e ∞Ω 0,3 ms) utilizando o equipamento *GenePulser Xcell* (*BioRad Systems®, USA*). Após a eletroporação os parasitas foram transferidos para uma garrafa (75 cm^3) com 36 mL de meio HMI-9 previamente aquecido a 37 °C. A cultura foi incubada por 6 h, a 37 °C, 5% CO_2 sob atmosfera úmida, após esse período de incubação, foram adicionados os antibióticos geneticina (G418) 2 µg/mL e

fleomicina (2,5 µg/mL) e a cultura foi transferida para placa de 24 poços (1 mL/poço). Após 5 dias de incubação (37 °C, 5% CO_2 sob atmosfera úmida) foi observado ao microscópio a presença de clones positivos. Os parasitas foram mantidos sob pressão seletiva dos antibióticos fleomicina e G418 e utlizados para experimentos posteriores.

2.5.2.2 Reação em cadeia de polimerase em tempo real (qRT-PCR) para validação do silenciamento do gene correspondene a TbGS

Após a seleção dos parasitas, formas sanguícolas cultivadas em meio HMI-9 (concentração inicial de 1 x 10^4 mL^{-1}) foram tratadas com tetraciclina (2 µg/mL) para indução da diminuição da expressão da enzima GS. Após 48 h de indução, o RNA foi extraído utilizando-se o kit *RNeasy* (Qiagen) e o cDNA foi sintetizado utilizando o kit *RevertAid H minus* (Thermo scientific) seguindo as instruções do fabricante. O cDNA foi utilizado para a realização da qRT-PCR usando iniciadores específicos para *Tb*GS (*Fw*: CATTCCCCGTGCTTCCTCTT; *Rv*: GTTCGCCGGTCGGTAAAAAG) para analisar os níveis de transcritos para a enzima glutamina sintetase. Como controles foram utilizados parasitas não transfectados com a construção p2T7*Tb*GS e parasitas SMBT7*Tb*GS sem indução.

2.5.2.3 Medições da atividade da enzima TbGS

A atividade enzimática da enzima GS foi avaliada em extratos dos parasitas, cultivados em meio HMI-9, induzidos ou não. A atividade foi medida utilizando-se o sistema clássico de acoplamento com as enzimas piruvato quinase e lactato desidrogenase, conforme descrito na seção 2.4.4.1.

2.5.3 Análise do fenótipo dos parasitas transfectados

2.5.3.1 Curva de proliferação

Os parasitas foram cultivados em meio HMI-9, com a concentração padrão de Gln no meio (584 µg/mL) ou na presença de uma concentração reduzida de Gln (5 µg/mL) induzido ou não pela adição de tetraciclina no meio (2 µg/mL). Os parasitas foram contados em câmara de Neubauer a cada 24 h, por 72 h.

2.5.3.2 Análise da progressão do ciclo celular e da degradação do DNA

As células SMB, foram cultivados nas diferentes condições, induzidos ou não (SMB +Gln; SMB –Gln; SMBT7GS +Gln-Tet; SMBT7GS +Gln+Tet; SMBT7GS –Gln-Tet; SMBT7GS –Gln+Tet) por diferentes tempos de incubação. Os parasitas foram utilizados para análise da progressão do ciclo celular e da degradação do DNA. As células, (1 x 10^6 parasitas), foram lavados uma vez com PBS e ressuspendidos em 100 µL de tampão de lise (tampão fosfato Na_2HPO_4 7,7 mM; KH_2PO_4 2,3 mM; pH 7,4) e digitonina (concentração final 64 µM). Os parasitas foram incubados em gelo por 30 min, após a incubação foi adicionado 100 µL da solução de iodeto de propídio (20 µg/mL). As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (*CitoFLEX, Beckman Coulter*).

2.5.3.3 Análise de necrose

Os parasitas foram lavados uma vez em tampão anexina**,** ressusspendidos em 50 µL do mesmo tampão e foi adicionado iodeto de propídio (concentração final 1 µg/ µL) e incubados em gelo por 15 min. Após o período de incubação foi adicionado 450 µL do tampão anexina e as células foram analisadas por citometria de fluxo (*CitoFLEX, Beckman Coulter*). Como controle positivo de necrose os parasitas foram tratados com digitonina.

2.5.3.4 Depleção da Gln no soro fetal bovino (SFB)

Para depletar a concentração de Gln, presente no SFB, o mesmo foi tratado com a enzima glutaminase (Sigma-Alderich) seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, o pH do SFB foi ajustado para 4,5 (visto que esse é o pH ótimo para a atividade da enzima) e adicionado a glutaminase (1 U). O SFB foi incubado a 37 °C por 10 min, após esse tempo o pH foi novamente ajustado para 7. Após o tratamento com glutaminase o SFB foi adicionado no meio de cultivo HMI-9 sem Gln. A depleção da Gln no soro foi confirmada por cromatografia líquida (equipamento *LC 3000 Eppendorf-Biotronik*).

2.5.3.5 Efeito da diminuição gradual da concentração de Gln, no meio de cultivo, para a sobrevivência dos parasitas

Para avaliar a importância da Gln para a sobrevivência dos parasitas, as células SMB (concentração inicial: 1 x 10^5 mL^{-1}), foram cultivadas em meio HMI-9 com passagens diárias e diminuição da concentração de Gln, de forma gradual, a cada dia (50; 5 e 0,5 µg/mL). Após o cultivo dos parasitas em meio contendo 0,5 µg/mL (terceiro dia), novamente foi adicionada Gln no meio de cultivo (584 µg/mL, concentração padrão do meio) para avaliar a recuperação dos parasitas. A cada 24 h os parasitas foram contados na câmara de Neubauer, diluídos novamente para 1 x 10^5 mL^{-1} e também foi analisado o ciclo celular.

2.5.3.6 Recuperção dos parasitas em diferentes concentrações de Gln

Também foi avaliado se a recuperação dos parasitas dependia da concentração de Gln no meio de cultivo. Para isso os parasitas foram cultivados em meio sem Gln por 24 h (concentração inicial 1 x 10^5 mL^{-1}) e depois foram transferidos para meio com diferentes concentrações de Gln 584 µg/mL (concentração padrão do meio) 50 µg/mL; 5 µg/mL; 0,5 µg/mL e glutamato 75 µg/mL (concentração padrão do meio) por 24 e 48 h. Em cada tempo de incubação os parasitas foram contados em câmara de Neubauer, diluídos novamente para 1 x 10^5 mL^{-1} e analisados por citometria de fluxo para determinação da porcentagem das células nas diferentes fases do ciclo celular e também a integridade da membrana.

2.5.3.7 Sincronização do ciclo celular nas células SMB

Para entender melhor o papel da Gln, no ciclo celular dos paraistas, os mesmos foram tratados com hidroxiurea (20 µg/mL) (Forsythe, McCulloch et al., 2009) por 2 h, a 37 °C, para sincronizar o ciclo celular. Após a incubação, a sincronização foi confirmada por citometria de fluxo e o tratamento foi removido por centrifugação e lavagem duas vezes em meio HMI-9. Os parasitas (1 x 10^5 mL^{-1}) foram transferidos para meio HMI-9, com ou sem Gln. Após 48 h de cultivo em meio sem Gln, a cultura foi dividida em duas partes: uma parte continuou sendo cultivada em meio sem Gln e a outra parte foi transferida para meio com Gln (584 µg/mL). A cultura foi mantida por 5 dias e a cada dia foi analisado o número de parasitas, o ciclo celular e a integridade da membrana, conforme descrito anteriormente, além do mais os parasitas foram diluídos novamente para 1 x 10^5 mL^{-1}.

2.5.3.8 Análise por Western blotting

Para avaliar a participação da Gln na glutamilação de tubulina, em formas sanguícolas de *T. brucei*, os parasitas foram cultivados nas diferentes condições (meio HMI-9 com a concentração completa de Gln, meio sem Gln e parasitas recuperados por 48 h em meio com Gln). Os parasitas (1 x 10^7) foram ressuspendidos em tampão de lise (tampão fosfato + inibidores de proteases) e lisados por ciclos de congelamento e descongelamento (5 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37 °C). Após a lise das amostras foi adicionada a solução de amostra (Tris/HCl 62,5 mM pH 6,8; SDS 2,3%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,01%; 20 mM de mercaptoetanol) relação 4:1. E as amostras foram fervidas a 100 °C, por 5 min. As proteínas foram separadas em gel SDS-PAGE 10%. Utilizando-se para a fase de separação (375 mM de tampão Tris/HCl, pH 8,8; 0,1% de SDS v/v; 10% de solução acrilamida/bisacrilamida; água destilada qsp 10 mL; 5 µL de Tetra Metil Etileno Diamina (TEMED) e 0,05% de persulfato de amônio (APS) v/v. Após a polimerização, foi adicionado o gel de empilhameto (125 mM de tampão Tris/HCl, pH 6,8; 0,1% SDS v/v; 5% de solução acrilamida/bisacrilamida; água destilada qsp 5 mL, 5 µL de TEMED e 0,05% de APS (v/v). A eletroforese foi realizada com tampão de corrida (25 mM de Tris vase, 192 mM de glicina, 0,1% de SDS p/v) aplicando uma voltagem de 200 V, por 45 min. Após a separação, as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose e a membrana foi bloqueada com leite desnatado 10%, por 12 h a 4 °C. Após o bloqueio a membrana foi lavada três vezes com PBS Tween20 0,1%, 10 min, sob agitação. Seguida da incubação com o anticorpo primário GT335 (AdipoGen® produzido em camudongo) diluído em PBS tween 0,05%, BSA 1% (diluição 1:5000) por 1 h a temperatura ambiente. Após a incubação a membrana foi lavada por três vezes com PBS Tween20 0,1%, por 10 min cada. Seguido da incubação com o anticorpo secundário: anticorpo policlonal produzido em cabra contra IgG de camudongo, conjugado a HRP (*horsedish peroxidase*) (BIO-RAD) diluído em PBS tween 0,05%, BSA 1% (diluição 1:10,000) e incubado por 1 h a temperatura ambiente. Após o período de incubação a membrana foi lavada por três vezes com PBS Tween20 0,1%, por 10 min cada e incubada com a solução para revelação (luminol/peróxido 1/1) *ECL Prime wertern blotting detection (GE Healthcare)* por 5 min. O sinal foi detectado usando o equipamento *alpha Innotech FluorChem®* FC2. Após a dectecção, foi feito o *strip* da membrana ulitizando o tampão de remoção (Glicina 15 g/L; SDS 1g/L, Twenn20 1%, pH 2,2). A membrana foi incubada duas vezes com a solução de remoção por 10 min, sob agitação, lavada com PBS entre uma incubação e outra. Após a remoção dos anticorpos a membrana foi incubada com a solução de

detecção para confirmar a eficiência do *strip* (nenhum sinal foi detectado). Novamente a membrana foi bloqueada com leite desnatado 10%, por 12 h a 4 °C, lavada três vezes com PBS Tween20 0,1%, 10 min, sob agitação, sequida da incubação com o anticorpo primário monoclonal anti-αtubulina (Sigma-Aldrich ®) diluído em PBS tween 0,05%, BSA 1% (diluição 1:500), por 1 h, a teperatura ambiente. A membrana foi lavada e incubada com o anticorpo secundário, como descrito anteriormente e o sinal foi detectado novamente utilizando o mesmo equipamento.

2.5.3.9 Microscopia de fluorescência

As células SMB (1 x 10^6) cultivadas em meio HMI-9 (com ou sem Gln e recuperadas por 48 h após cultivo em meio sem Gln por 24 h) foram transferidas para tubos de 1,5 mL, lavadas uma vez com PBS e ressuspendidas em 200 µL de PBS e foram fixadas pela adição de 300 µL da solução de paraformaldeido (4%) concentração final 2,4%, por 2 h, a 4 °C. Após a fixação os parasitas foram lavados uma vez com PBS e foram ressuspendidos, cuidadosamente, em 500 µL de tampão fosfato de sódio/glicina (Na_2HPO_4 100 mM; glicina 100 mM; pH 7,2) por 15 min a temperatura ambiente. Após a incubação as células foram permeabilizadas pela adição de 500 µL de triton 0,2%, homogenizado por inversão do tubo e incubado por 5 min, após a incubação as células foram lavadas duas vezes com BSA 1% e ressuspendida em 100 µL do anticorpo GT335, diluido em BSA 1% (1:5000), por 1 h, a temperatura ambiente. Após o período de incubação as células foram lavadas duas vezes com BSA 1% e ressuspendidos em 100 µL do anticorpo secundário *goat anti-mouse IgG alexa fluor 488*, diluído em BSA 1% e incubados por 1 h, a 4 °C. Após a incubação com o anticorpo secundário, foi adicionado 1 µL de DAPI (10 µg/mL) e incubado por 5 min. As células foram lavadas uma vez com BSA 1% e uma vez com H_2O destilada, ressuspendidas em H_2O destilada e transferidas para a lâmina para a análise por microscopia de fluorescência.

2.5.4 Análises estatísticas

Todos os resultados apresentados são referentes a pelo menos três réplicas biológicas com pelo menos três réplicas técnicas cada. O programa Excel foi utilizado para calcular média e desvio padrão das réplicas dos ensaios. O programa *GraphPadPrism5* foi utilizado para construção dos gráficos e ajustes dos mesmos. O método ANOVA de uma via seguido do teste *Tukey*, ou o teste *T* foram utilizados nas análises estatísticas dos tratamentos em relação ao controle. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 *T. cruzi*

3.1.1 Caracterização do transporte de Glutamina

Para conhecer em detalhe como a Gln extracelular é disponibilizada no interior da célula para participar dos diferentes processos biológicos, nos quais está a princípio envolvida, iniciamos a caracterização do sistema de transporte em formas epimastigotas de *T. cruzi*.

3.1.1.1 Cinética

A capacidade do *T. cruzi* internalizar Gln a partir do meio externo foi avaliada inicialmente em função do tempo. Formas epimastigotas foram incubadas por diferentes tempos na presença de uma concentração considerada *a priori* saturante de Gln (3 mM), baseado no nosso conhecimento de outros sistemas de transporte de aminoácidos caracterizados anteriormente no parasita (Silber, Tonelli et al., 2002; Barison, Damasceno et al., 2016). A Gln é internalizada pelo parasita, em função do tempo de incubação (Figura 6 A). Interessantemente, esse processo não mostrou uma saturação ao longo do tempo analisado (180 min) sugerindo que a Gln internalizada é rapidamente metabolizada pelas células. A curva em função do tempo pode ser considerada linear até 15 min de incorporação (r^2=0,996) (Figura 6 B) e apresentou uma velocidade inicial nas condições descritas de 0,22 nmols por minuto.2 x 10^7 parasitas. Para os experimentos subsequentes o tempo de incubação escolhido para obter velocidades iniciais de transporte foi de 1 min.

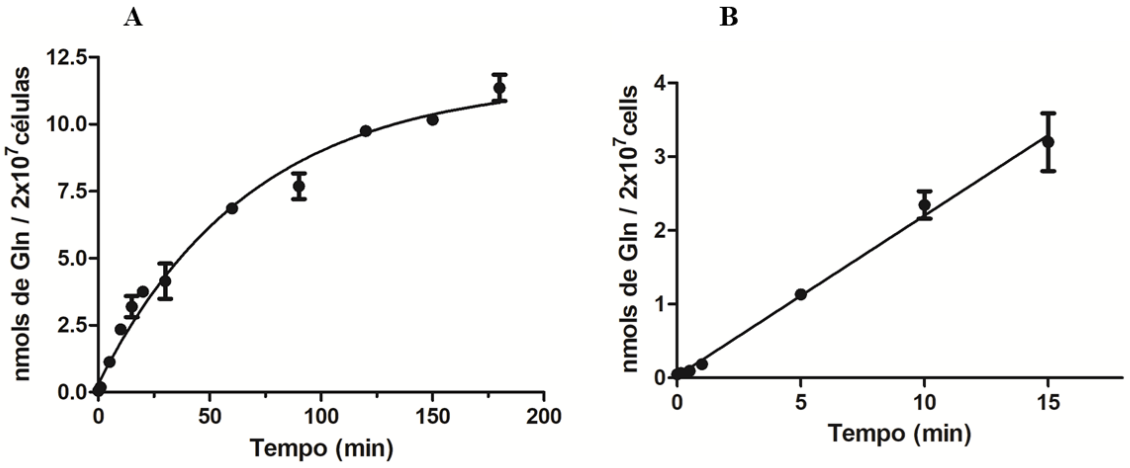

Figura 6 - Transporte de Gln pelo *T. cruzi* a partir do meio externo em função do tempo. Formas epimastigotas foram incubadas na presença de 3 mM de Gln radioativamente marcada (L-[3,4-3H(N)]-Glutamina) por diferentes tempos (0-180 min). (**A**) Internalização da Gln em função do tempo. (**B**) Intervalo de tempo em que o transporte de Gln apresenta uma relação linear (15 min r^2=0,996). (n = 4)

Para obter os valores de K_m e V_{max}, a velocidade inicial do transporte de Gln (V_0) foi avaliada em função da concentração extracelular do substrato, utilizando-se concentrações de Gln entre 0 e 5 mM. Os dados permitem inferir que a Gln é transportada por um único sistema saturável que se ajusta ao modelo cinético de Michaelis-Menten. Os valores das constantes cinéticas foram obtidos a partir do ajuste dos dados obtidos para V_0 à função hiperbólica (r^2=0,968), derivada do modelo cinético de Michaelis-Menten (Figura 7). O valor obtido para K_m foi de 1,29 ± 0,08 mM e para V_{max} foi de 0,36 ± 0,05 nmols Gln/min.2 x 10^7 células.

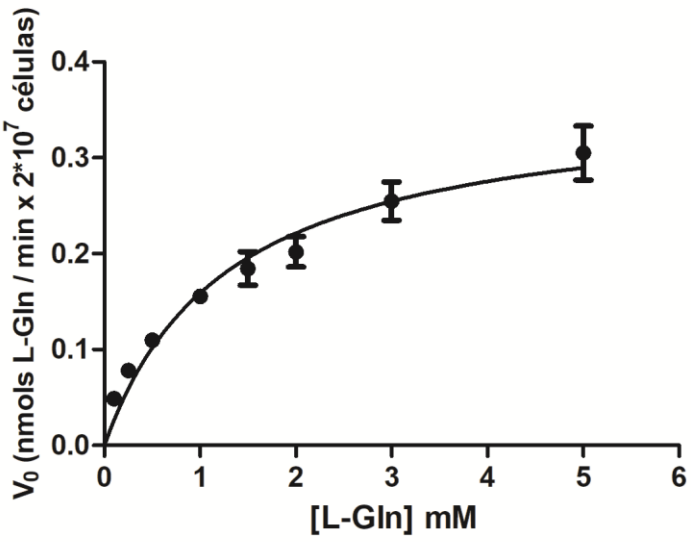

Figura 7 - Transporte de glutamina em função da concentração do substrato. O transporte de Gln foi medido em função da concentração de substrato (0-5 mM) por um minuto. Os valores obtidos para V_{max} e K_m foram de 0,364 ±0,04 mM e 1,29 ± 0,2, respectivamente. (n = 4)

3.1.1.2 Termodinâmica do transporte de Gln

Após a caracterização cinética do transporte de Gln, foi determinada a funcionalidade do transportador a diferentes temperaturas, incubando os parasitas na presença de 3 mM de Gln traçada com Gln radioativa a diferentes temperaturas (10 a 45 °C). Nossos resultados mostram que o transporte de Gln acontece a temperaturas a partir de 20 °C, incrementado-se de forma aproximadamente linear até 45 °C, temperatura em que observa-se a máxima atividade (Figura 8 A). A Energia de ativação do sistema (Ea) foi calculada por meio da equação de Arrhenius utilizando-se os dados obtidos entre a temperatura 28 °C e 45 °C (faixa dentro da qual observa-se um incremento linear do transporte em relação à temperatura, r^2= 0,990). O valor obtido foi de 63,29 ± 1,18 kJ/mol (Figura 8 B).

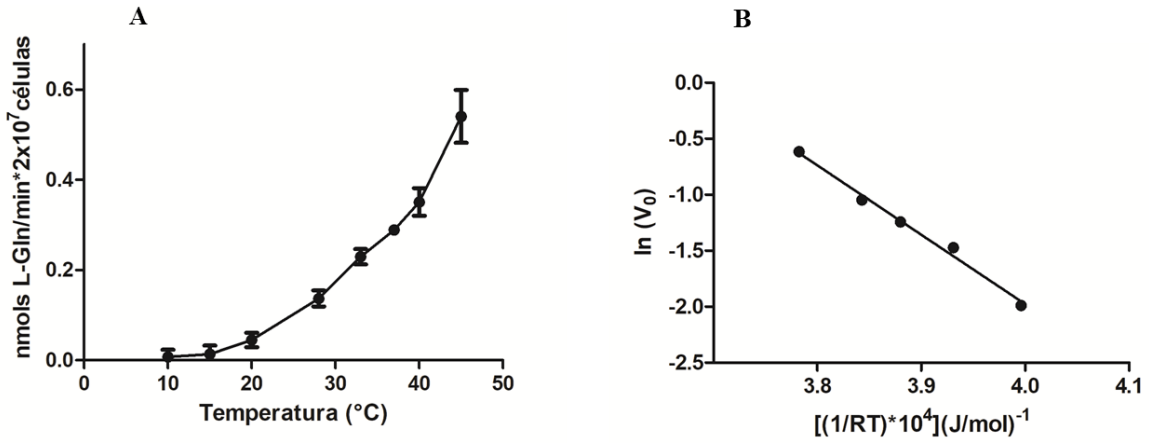

Figura 8 - Transporte de Gln em função da temperatura. A dependência da temperatura para o transporte Gln foi analisado pela incubação dos parasitas em diferentes temperaturas na presença de 3 mM de Gln. (**A)** Transporte em função da temperatura. (**B)** Cálculo da energia de ativação utilizando-se a equação de Arrhenius (r^2= 0,990). O valor obtido foi 63,29 ± 1,18 kJ/mol.(n = 3)

3.1.1.3 Caracterização do mecanismo envolvido no transporte de Gln

Para analisar que mecanismos poderiam estar envolvidos no transporte de Gln, primeiro foi avaliada a incorporação de Gln em função da concentração de H^+ no meio extracelular. Para isso, durante o transporte, os parasitas foram incubados em tampões com distintos pH (5,0 – 7,5), sendo o tampão citrato utilizado para o pH entre 5,0 e 6,5; e o tampão PBS utilizado para o pH entre 6,0 e 7,5. O fato de utilizar dois tampões diferentes para um mesmo pH (6,0 e 6,5) garante que as diferenças observadas no transporte se devam exclusivamente a variações no pH e não a composição do meio. Os dados obtidos mostram que a Gln é transportada nos diferentes pHs, no entanto observa-se uma tendência de maior incorporação de Gln entre o pH 6,0 e 7,0 (Figura 9).

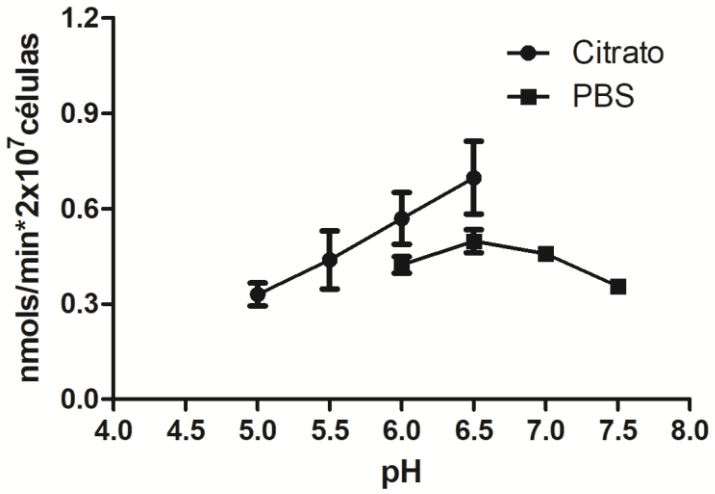

Figura 9 - Efeito do pH externo no transporte de Gln. O efeito do pH externo no transporte de Gln foi avaliado entre os valores de pH 5,0 e 7 ,5 nos tampões citrato e PBS. (n = 4)

Além da presença de íons H^+ no meio externo, outros íons extracelulares podem ser relevantes para a atividade de transportadores, como por exemplo o Na^+ e o K^+. Para avaliar a interferência destes íons no transporte de Gln foram utilizadas variantes do tampão PBS contendo Na^+ ou K^+ exclusivamente. O PBS na sua formulação convencional (contendo Na^+ e K^+) como descrito em material e métodos, e tampão salino equilibrado osmoticamente com colina (sem Na^+ nem K^+) foram utilizados como controle. O transporte de Gln não foi dependente da presença desses íons no meio externo, visto que não há diferença na internalização da Gln pelo parasita nos diferentes tampões (Figura 10).

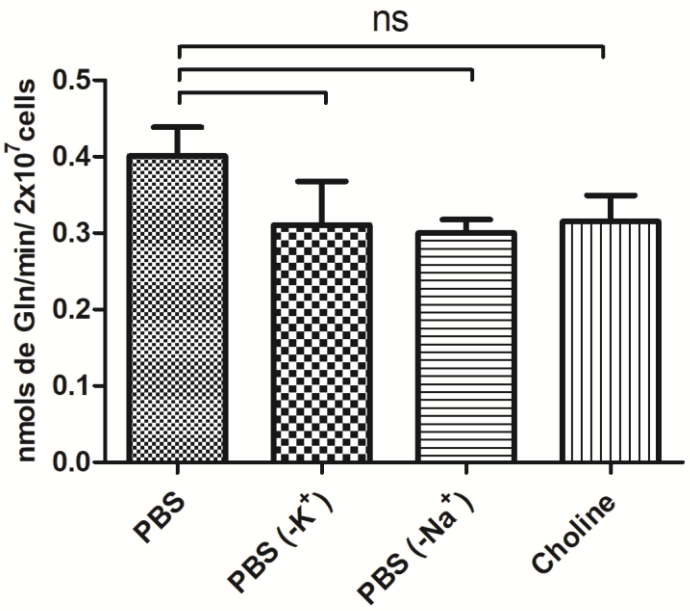

Figura 10 - Avaliação da interferência de Na^+ e K^+ no transporte de Gln. O efeito da presença de Na^+ e K^+ no meio externo para o transporte de Gln foi avaliado pela incubação das formas epimastigotas em diferentes tampões durante o transporte de Gln. O tampão colina foi utilizado como controle na ausência de íons. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida do teste *Tukey*, P=0,0461. (n=3)

Os resultados apresentados até aqui mostram que o transporte de Gln apresenta pouca variação em relação ao pH externo, e não é dependente da presença de Na^+ e K^+ no meio extracelular. Com base nessas informações, considerou-se relevante avaliar se a incorporação de Gln é dependente do estado energético do parasita. Para isto, o ensaio de transporte foi realizado na presença de oligomicina A, inibidor da F_1F_o/ATP sintase. A oligomicina foi adicionada em três diferentes tempos de incubação: 0, 30 e 60 min antes do início da medição do transporte. Esses diferentes tempos de incubação permitem distinguir entre um efeito direto da oligomicina no transportador de Gln (0 min) e o efeito da depleção dos níveis de ATP intracelular (em dois tempos diferentes, 30 ou 60 min) nos quais os níveis de ATP intracelular decaem (Manchola, Rapado et al., 2016). O resultado demonstra que não há diferença entre o controle (sem oligomicina) e o tempo zero de incubação. No entanto, quando os parasitas foram pré-incubados, por 30 ou 60 min, observou-se uma dimuição da incorporação de Gln de 30% e 45%, respectivamente (Figura 11). Quando F_1F_o/ATP sintase está inibidida, o nível intracelular de ATP pode ser reestabelecido pela adição de Glc, que estimula a fosforilação em nível de substrato pela glicólise. Deste modo se o nível de ATP é

relevante para o sistema de transporte, a adição de Glc mesmo em condições de inibição da F_1F_o/ATP sintase, poderia reestabelecer a incorporação de Gln. O ATP formado a partir da glicólise foi capaz de reestabelecer o transporte de Gln mesmo na presença de oligomicina (Figura 11). Assim, demonstramos que o nível de energia celular é importante para o transporte de Gln.

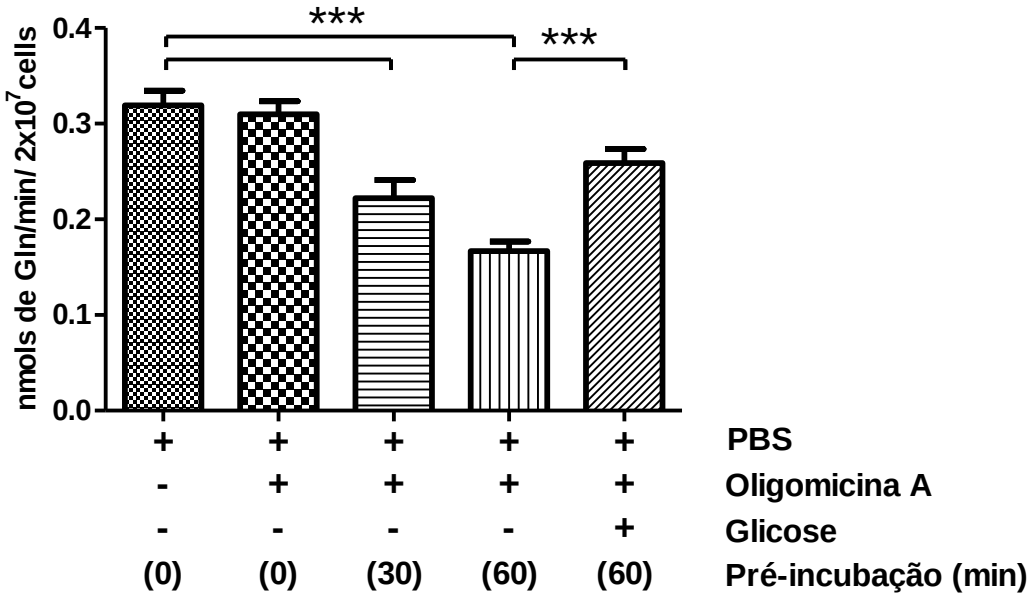

Figura 11 - Avaliação da dependência do transporte de Gln em relação aos níveis intracelulares de ATP. Os parasitas foram incubados na presença de oligomicina A (5 µg/mL), por diferentes tempos (30 e 60 min) na presença ou não de glicose. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguida do teste *Tukey*, P=0,0001. (n=4).

Tendo observado que variações no pH externo podem gerar variações na atividade do transportador, mesmo que discretas, avaliamos se o gradiente de prótons através da membrana citoplasmática poderia ser importante para o transporte de Gln. Para isso os parasitas foram incubados na presença do ionóforo FCCP, desacoplador do gradiente de H^+. O tratamento com FCCP também pode desacoplar o potencial de membrana mitocondrial, e desse modo desencadear a hidrólise de ATP pela própria F_1F_o/ATP sintase funcionando em modo reverso (como H^+/ATPase) diminuindo assim os níveis de ATP intracelular. Para distinguir entre os dois processos (desacoplamento do gradiente de H^+ e dimuição do ATP intracelular), a influência do FCCP no transporte de Gln foi medida na presença ou ausência de oligomicina.

Desse modo seria possível desacoplar o efeito do colapso dos gradientes de H^+ do efeito causado pela queda dos níveis de ATP. Nossos resultados mostram que quando a membrana plasmática está despolarizada em relação ao gradiente de H^+, o transporte de Gln diminuiu aproximadamente 30%, tanto na presença quanto na ausência de oligomicina (Figura 12), mostrando que o gradiente de H^+ através da membrana do parasita também é importante para o sistema de transporte de Gln. Interessantemente, estes dados sugerem que, para a janela de tempo utilizada neste ensaio, a atividade H^+/ATPase da F_1F_o/ATP sintase não produziria um efeito significativo nos níveis de ATP intracelular.

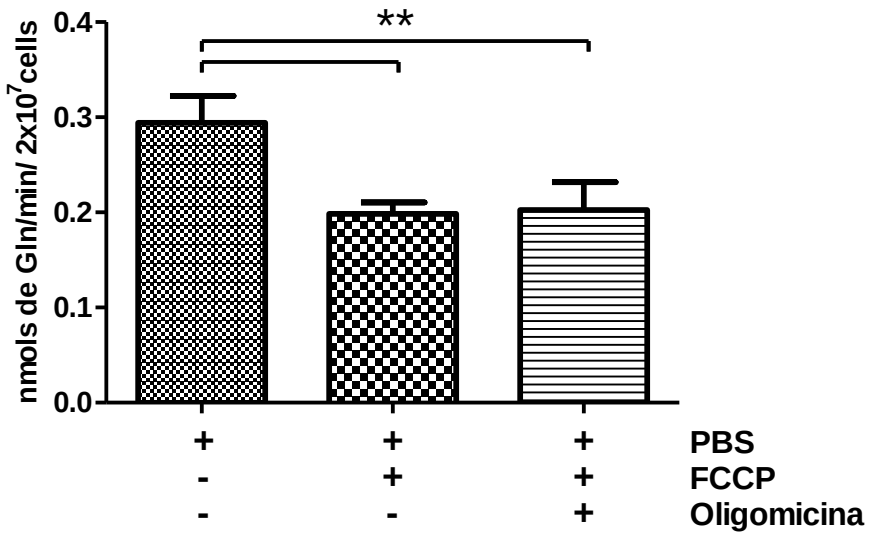

Figura 12 - Avaliação do transporte de Gln em função do gradiente de H^+ da membrana citoplasmática. O transporte foi realizado na presença de FCCP (5 µM), desacoplador do gradiente de H^+, ou FCCP + Oligomicina A (5 µg/mL), inibidor da F_1F_o/ATP sintase. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguida do teste *Tukey*, P=0,0049 (n=3).

Para confirmar a participação do estado energético do parasita na incorporação de Gln a partir do meio extracelular os parasitas foram incubados por 3 h em PBS, com a finalidade de induzir a depleção dos níveis intracelulares de ATP. Após esse período foi medido o transporte. Parasitas incubados em LIT foram usados como controle. Os resultados obtidos demonstram que a incubação dos parasitas em PBS interfere na internalização da Gln a partir do meio extracelular (Figura 13). Foi observada uma diminuição no transporte de Gln (aproximadamente 70%) em relação ao controle. Este resultado confirma que a incorporação de Gln a partir do meio extracelular pelo parasita depende do estado energético da célula.

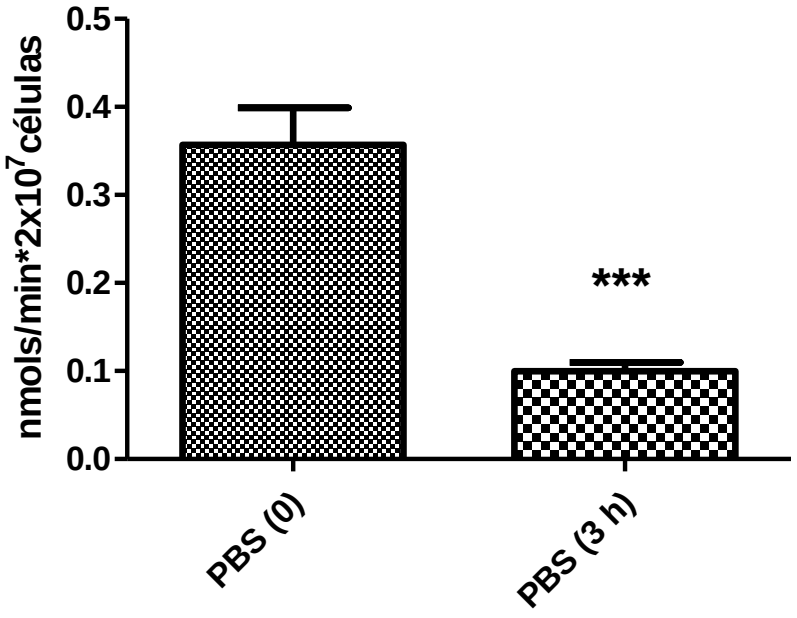

Figura 13 - Efeito do estresse nutricional no transporte de Gln. Os parasitas foram incubados em PBS durante 3 h e depois foi realizado o transporte. Parasitas sem pré-incubação em PBS foram usados como controle. Análise estatística: Teste *T*, valor de P= 0,0005. (n = 3)

3.1.1.4 Especificidade do transportador

Os transportadores de aminoácidos podem ser utilizados para o transporte de mais de um tipo de aminoácido. Para determinar se o sistema de transporte de Gln é um sistema específico, foi avaliada a incorporação de Gln na presença de diferentes análogos estruturais e diferentes aminoácidos em um ensaio de competição. Sob a hipótese do transportador poder utilizar como substratos análogos estruturais da Gln, os ensaios de inibição foram feitos em condições que permitiriam detectar uma inibição do tipo competitiva, utilizando-se portanto concentrações de Gln correspondentes ao valor de K_m (1,29 mM), e os possíveis inibidores a concentrações equivalentes a 10 x K_m. Como controle de inibição foi utilizado como competidor a própria Gln (Figura 14). Os análogos estruturais que foram avaliados como prováveis competidores foram: ACV, AZA, MS e DPA, além dos aminoácidos relacionados estrutural ou metabolicamente a Gln: Glu, Asp, Asp, Ala, Arg e His (Figura 14 C). O transporte de Gln não foi inibido pelos análogos estruturais nem pelos outros aminoácidos, sugerindo que o sistema de transporte de Gln em *T. cruzi* é específico (Figura 14 A e B).

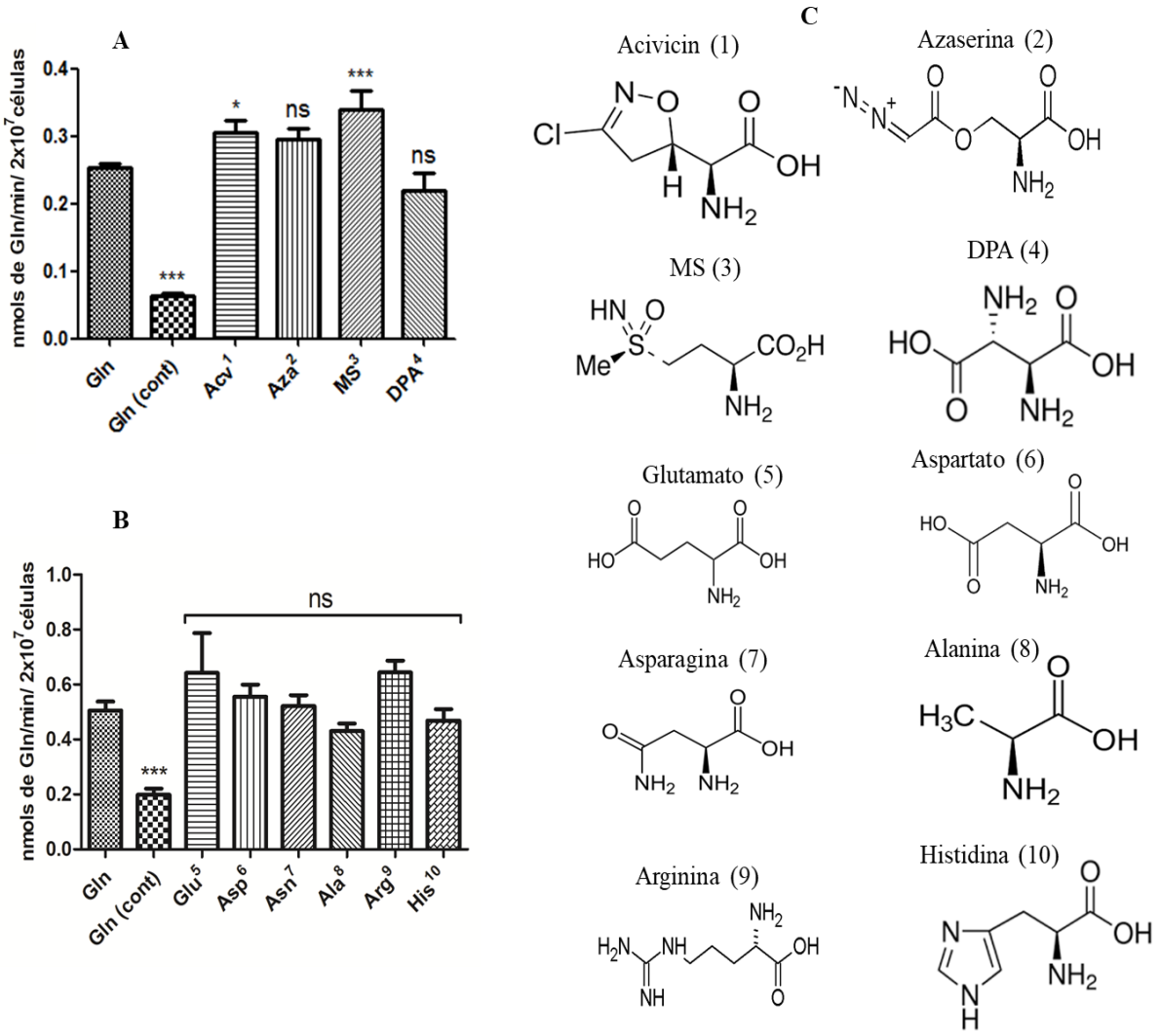

Figura 14 - Transporte de Gln na presença de análogos estruturais ou aminoácidos como possíveis competidores. (**A**) Transporte de Gln na presença de análogos estruturais na concentração 10x maior que a K_m do transporte de Gln. (**B**) Transporte de Gln na presença de diferentes aminoácidos na concentração 10x maior que a K_m do transporte de Gln. (**C**) estrutura dos análogos e aminoácidos utilizados no experimento. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguida do teste *Tukey*, $P < 0,05$. (n = 3)

3.1.1.5 Transporte de Gln em epimastigotas na fase exponencial e estacionária

Sabe-se que os epimastigotas de *T. cruzi* são capazes de mudar de um metabolismo baseado no consumo de Glc para um metabolismo baseado no consumo de aminoácidos quando transitam da fase exponencial para a fase estacionária de crescimento (Cazzulo, 1994; Barison, Rapado et al., 2017). Por esse motivo, foi do nosso interesse avaliar se a mudança no perfil metabólico entre essas fases, reflexo da adaptação a disponibilidade de nutrientes, teria influência no transporte de Gln. Como pode ser observado, não há diferença na internalização de Gln nas duas condições analisadas (Figura 15), sugerindo que a incorporação de Gln seria importante para o parasita nas duas fases do crescimento.

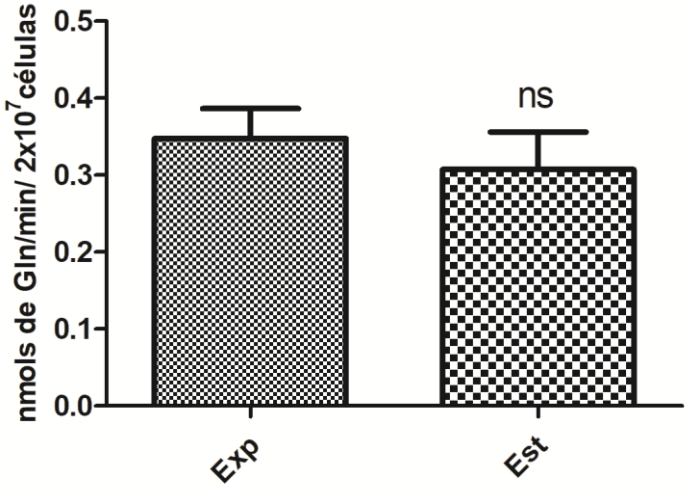

Figura 15 - Comparação do transporte de Gln em parasitas na fase exponencial e fase estacionária. Os parasitas foram cultivados em LIT por 48 h para atingirem a fase exponencial, após esse período parte dos parasitas foram utilizados para o transporte e outra parte foi diluída para 5 x 10^6 mL^{-1} em LIT, a cultura foi incubada por 4 dias até atingirem a fase estacionária, após esse período o transporte foi avaliado. Análise estatística: teste *T*, valor de P= 0,2425. (n = 3)

3.1.1.6 Avaliação do transporte de Gln ao longo do ciclo de vida do T. cruzi

Os aminoácidos não são relevantes só para as formas epimastigotas, visto que já foi descrita a importância de vários aminoácidos para os diferentes estágios do parasita. Sendo assim decidimos avaliar a atividade do transportador de Gln nos demais estágios do *T. cruzi*. Para isso avaliamos nos estágios presentes no hospedeiro mamífero: tripomastigotas oriundos de cultivo celular, epimastigotas intracelulares, amastigotas, como também nos estágios encontrados no inseto vetor: epimastigotas (fase exponencial e estacionária de crescimento), tripomastigotas metacíclicos. Os dados obtidos demonstram que as formas epimastigotas são as que mais transportam Gln a partir do meio extracelular (0,354 nmols/min*2 x 10^7 células) seguido pela forma epimastigota intracelular (0,128 nmoles/min*2 x 10^7 células). O estágio tripomastigota metacíclico é o que menos internaliza Gln a partir do meio externo (0,017 0,12 nmols/min*2 x 10^7 células), (Figura 16).

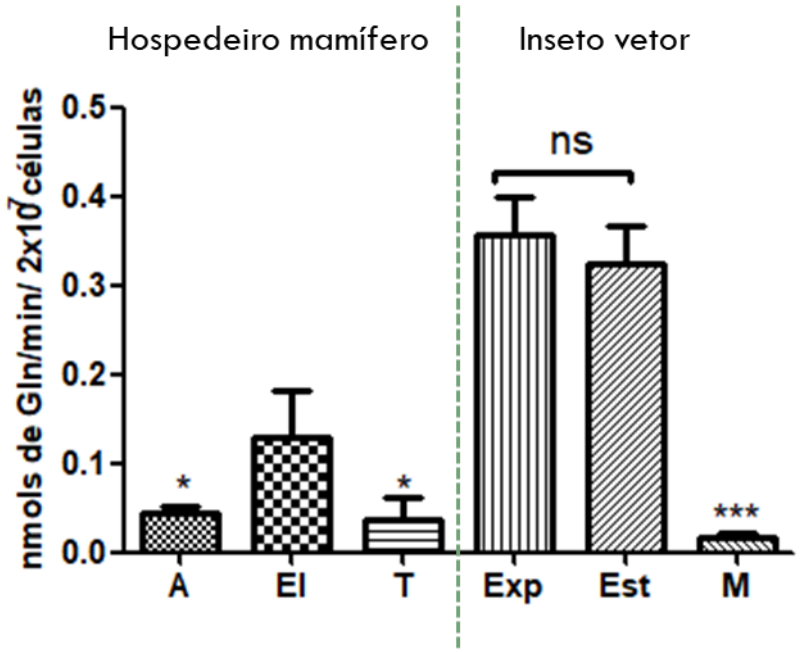

Figura 16 - Transporte de Gln nos diferentes estágios do *T. cruzi*. Amastigotas (**A**) e Epimastigota intracelular (**Ei**), tripomastigota oriundos de infecção em células de mamífero (**T**); Epimastigotas em fase exponencial de crescimento (**Exp**); epimastigotas em fase estacionária de crescimento (**Est**) tripomastigota metacíclico (**M**). Os parasitas foram obtidos conforme descrito em material e métodos. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguida do teste *Tukey*. $P < 0,05$. (n = 3)

Esses dados demonstram que todos os estágios do ciclo de vida do *T. cruzi* são capazes de transportar Gln, com maior ou menor velocidade, a partir do meio extracelular, sendo que a Gln é incorporada mais rapidamente pelos epimastigotas.

3.1.2 Participação da Gln em processos biológicos relevantes para o T. cruzi

Os estudos sobre o transporte de Gln em diferentes estágios demonstrou que os epimastigotas são os que apresentam maior atividade. O transporte de Glu, precursor da síntese de Gln, também já foi caracterizado em formas epimastigotas (Silber, Rojas et al., 2006) e foi demonstrado que esse estágio é capaz de incorporar Glu a partir do meio externo. Além do mais, como já mencionado anteriormente, sabe-se que Gln pode ser sintetizada pela enzima *Tc*GS a partir de Glu, NH_4^+ e ATP pelo *T. cruzi* (Crispim et al[*].). Com base nessas informações, considerou-se relevante avaliar se a Gln poderia ser utilizada pelo parasita como fonte de energia. Para essa avaliação, medimos inicialmente a capacidade dos metabólitos de interesse de manter a viabilidade do parasita em condições de estresse metabólico severo. Os parasitas foram incubados por 24 ou 48 h em PBS suplementado com Gln ou não (controle de máxima perda de viabilidade). Afim de distinguir o possível efeito da Gln incorporada a partir do meio externo, daquele da Gln formada a partir do Glu, os parasitas também foram incubados na presença de Glu. Pro, aminoácido já descrito como importante na manutenção da viabidade dos parasitas (Magdaleno, Ahn et al., 2009) foi utilizado neste ensaio como controle positivo para a manutenção da viabilidade. Os parasitas que foram incubados na presença de Gln, por 24 ou 48 horas, permaneceram mais viáveis do que os parasitas incubados na presença de Glu, demonstrando assim que a incorporação de Gln a partir do meio externo é capaz de manter a viabilidade dos parasitas (Figura 17).

[*] Crispim, M.; Damasceno, F.S.; Hernández, A.; Barisón, M.J.; Sauter, I.P.; Pavani, R.S.; Moura, A.S.; Pral, E.M.F.; Cortez, M.; Elias, M.C.; Silber, A.M.; The glutamine synthetase of *Trypanosoma cruzi* is requerid for its resistance to ammonium accumulation and evasion of the parasitophorous vacuole during host-cell infection. Submitted.

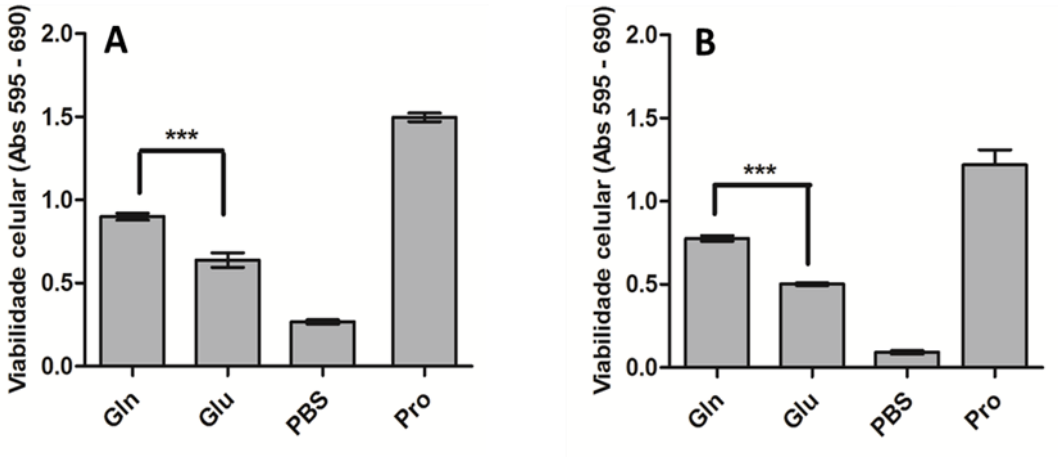

Figura 17 - Viabilidade de formas epimastigotas cultivadas na presença de Glu ou Gln. Os parasitas foram incubados por 24 h (**A**) ou 48 h (**B**) na presença de Gln, Glu, Pro ou PBS. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguida do teste *Tukey*. $P < 0,05$.(n = 3)

Considerando que a Gln é capaz de manter a viabilidade dos parasitas como única fonte de energia, nos interessou avaliar também se Gln seria capaz de manter os níveis de ATP intracelular. Para isso, os parasitas foram incubados nas mesmas condições do experimento anterior e foram avaliados os níveis de ATP intracelular após 24 h. Não foram encontradas diferenças entre os níveis de ATP dos parasitas cultivados na presença de Gln, Glu ou Pro, sugerindo que Gln também participa do metabolismo energético do *T. cruzi*, da mesma forma que o Glu e a Pro (Figura 18). Este resultado também sugere, que a viabilidade tal como avaliada no experimento anterior, não depende só dos níveis de ATP intracelular, e que há outros fatores que influenciariam de forma diferencial o efeito desses aminoácidos na viabilidade celular.

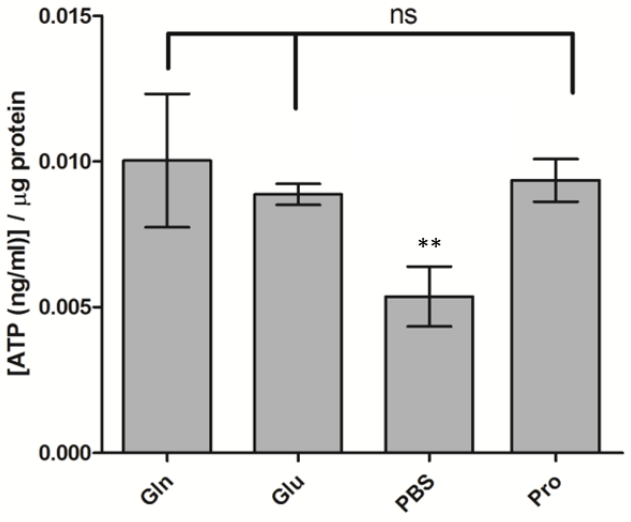

Figura 18 - Nível de ATP intracelular em parasitas cultivados na presença de diferentes metabólitos. Os parasitas foram incubados por 24 h na presença de Gln, Glu, Pro ou PBS. O nível de ATP intracelular foi detectado por bioluminescência utilizando-se o kit da luciferase para células somáticas da Sigma. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguida do teste *Tukey*. $P < 0,05$.(n = 3)

Sabendo-se que a Gln é incorporada a partir do meio extracelular ao longo das diferentes fases de crescimento de formas epimastigotas, e que é capaz de manter a viabilidade participando do metabolismo energético da célula, foi considerado relevante avaliar a participação da Gln no processo de diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos (metaciclogênese). Contreras et al. descreveram um meio definido de diferenciação, que contém na sua formulação os metabólitos Glu, Pro, Asp e Glc (meio TAU3AAG) (Contreras, Salles et al., 1985). Para avaliar a capacidade da Gln de induzir a metaciclogênese, fizemos um ensaio no qual foi utilizado TAU3AAG como controle, e meio TAU no qual foi substituido o complemento 3AAG por Gln (meio TAUGln). TAUGlu também foi utilizado, visto que é um dos componentes do meio padrão e também pode ser convertido a Gln pela ação da enzima *Tc*GS, a qual é mais ativa em formas metacíclicas do que nas formas epimastigotas (Crispim et al[*].).

[*] Crispim, M.; Damasceno, F.S.; Hernández, A.; Barisón, M.J.; Sauter, I.P.; Pavani, R.S.; Moura, A.S.; Pral, E.M.F.; Cortez, M.; Elias, M.C.; Silber, A.M.; The glutamine synthetase of *Trypanosoma cruzi* is requerid for its resistance to ammonium accumulation and evasion of the parasitophorous vacuole during host-cell infection. Submitted:.

O perfil da diferenciação, nas diferentes condições, foi acompanhado ao longo do tempo, a partir do 1º dia da transferência dos parasitas para o meio TAU, por contagem em câmara de Neubauer e observação da morfologia dos parasitas. Os resultados obtidos demonstraram que a diferenciação dos parasitas ocorreu de forma similar em todas as condições analisadas (Figura 19), mostrando que Gln é capaz de promover a metaciclogênese dos parasitas no mesmo nível do controle, como também o Glu foi capaz de promover a diferenciação.

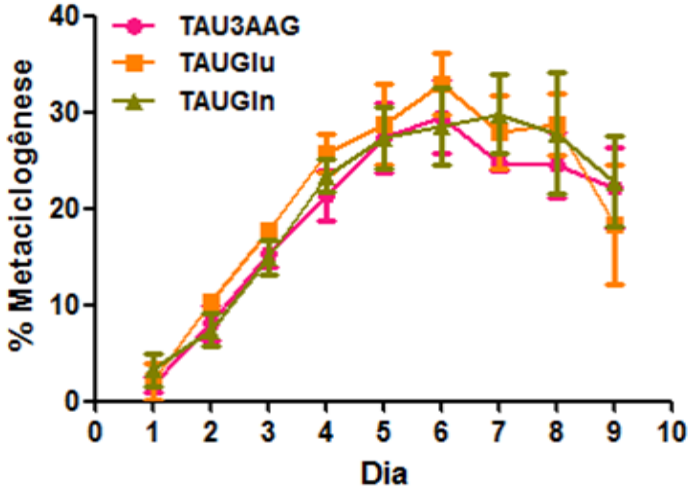

Figura 19 - Efeito da Gln na diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos. Os parasitas foram mantidos em meio TAU3AAG (controle), TAUGln ou TAUGlu. A diferenciação foi acompanhda por contagens diárias em câmara de Neubauer (número total e número de metacíclicos) observando-se a morfologia dos parasitas.(n = 3)

Uma vez observado que a Gln promove a metaciclogênese, considerou-se importante avaliar se os parasitas diferenciados em meio apenas com Gln, como fonte de energia teriam as mesmas propriedades de infectividade (capacidade de invadir a célula hospedeira) que os parasitas diferenciados em meio TAU3AAG. A capacidade infectiva também foi comparada com os parasitas diferenciados em TAUGlu. Com esta finalidade, células CHO-K_1 foram infectadas com as formas metacíclicas diferenciadas nas diferentes condições descritas. Após 24 h, os núcleos das células e dos parasitas intracelulares foram corados com *Hoechst* (marcador de DNA) para contagem, e o número de céluas infectadas foi avaliado (Figura 20).

Como pode-se observar, independente da condição de diferenciação utilizada, os parasitas foram igualmente capazes de invadir a célula hospedeira, demonstrando assim que parasitas diferenciados em meio contendo apenas Gln, são parasitas competentes para a invasão celular no hospedeiro mamífero.

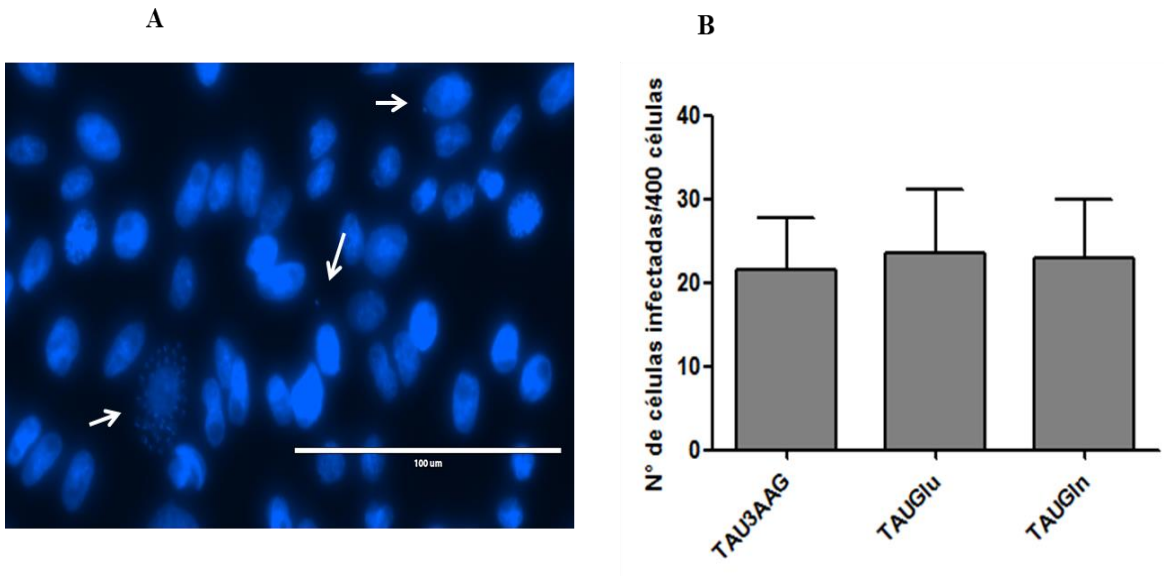

Figura 20 - Infectividade das formas tripomastigotas metacíclicos diferenciados em meio TAU3AAG, TAUGln ou TAUGlu. (**A**) Foto de microscopia de fluorescência representativa das células CHO-K_1 marcadas com *Hoechst* para contagem das células infectadas. (**B**) Contagem de células infectadas com as formas metacíclicas oriundas das diferentes condições de diferenciação. O número de células infectadas foi analisado 24 h após a infecção. (n = 3)

Outro aspecto relevante para a manutenção do ciclo de vida do parasita é a progressão do ciclo intracelular, ou seja, a capacidade da forma tripomastigota (metacíclico ou sanguíneo) invadir a célula, estabelecer a infecção e se diferenciar para amastigota, epimastigota intracelular e novamente para tripomastigota. Considerando que os parasitas diferenciados em meio TAUGln são eficientes para invadirem a célula hospedeira, foi avaliado se esses parasitas teriam a capacidade de completar o ciclo celular e diferenciar novamente para tripomastigotas. Para isso, as células CHO-K_1 foram infectadas com parasitas diferenciados nos meios de cultivo mencionados anteriormente e as formas tripomastigotas que eclodiram das células infectadas, a partir do 6° dia pós-infecção, foram contadas em

câmara de Neubauer. Os dados obtidos demonstram que quando as células hospedeiras foram infectadas com parasitas diferenciados em meio TAUGln, a quantidade de formas tripomastigotas presentes no sobrenadante após o ciclo intracelular, foi maior do que nas demais condições analisadas (Figura 21). Este resultado indica que os parasitas diferenciados na presença de Gln são aptos para estabelecer a infecção na célula hospedeira, como também passar por todas as etapas de diferenciação intracelular de forma mais eficiente do que os parasitas diferenciados em condição padrão de cultivo. Como também observa-se que, parasitas diferenciados em meio TAUGlu, são capazes de invadir as células hospedeiras, mas completam o ciclo intracelular de forma menos eficiente.

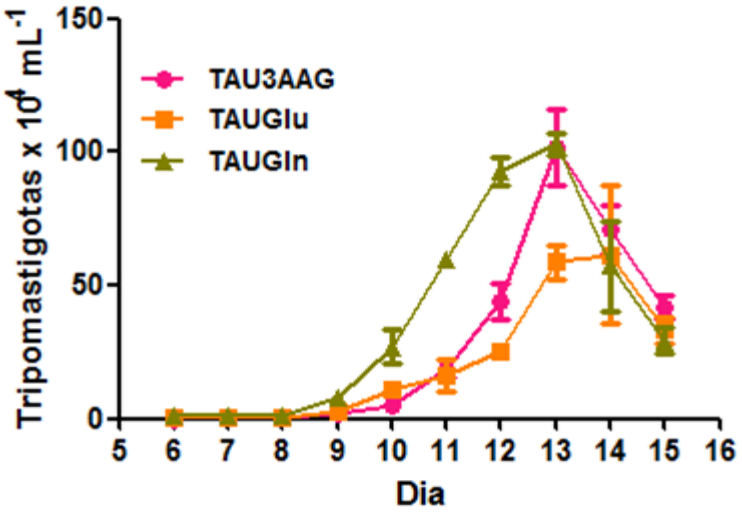

Figura 21 - Eclosão das formas tripomastigotas. Células CHO-K_1 foram infectadas com formas metacíclicas diferenciadas em meio TAU3AAG, TAUGln ou TAUGlu. Os parasitas liberados no sobrenadante do cultivo a cada dia, foram contados em câmara de Neubauer do 6º ao 15º dia pós-infecão. (n = 3)

Os resultados obtidos anteriormente demonstraram que a Gln tem um papel relevante para os estágios do parasita, presentes no hospedeiro invertebrado, fornecendo às formas metacíclicas as condições necessárias para completar o ciclo intracelular no hospdeiro mamífero de forma eficiente. Com base nessas informações, considerou-se importante avaliar se a Gln também seria importante para as formas encontradas no hospedeiro mamífero. Para este fim os parasitas, formas tripomastigotas oriundas de infecções prévias em células CHO-K_1, foram estressados metabolicamente por incubação em PBS por 4 horas e após esse

período os aminoácidos Gln, Glu ou Pro (3 mM) foram adicionados no cultivo. Parasitas mantidos em meio RPMI (meio padrão de cultivo para células de mamífero) ou PBS (ausência de nutrientes) foram utilizados como controle. Após o período de recuperação, na presença dos diferentes metabólitos, foi avaliada a capacidade de invasão celular pelos parasitas, e 24 h após a infecção foi avaliado o número de células infectadas. Os parasitas que foram recuperados na presença de Gln infectaram as células hospedeiras da mesma forma que os parasitas controle e de forma mais eficiente que os parasitas recuperados na presença de Glu ou não recuperados. Esses dados sugerem que, mesmo a Gln sendo transportada com menos eficiência pelas formas tripomastigotas, este aminoácido consegue fornecer ao parasita as condições necessárias para a invasão celular. O mesmo não foi observado quando os parasitas foram recuperados na presença de Glu (Figura 22).

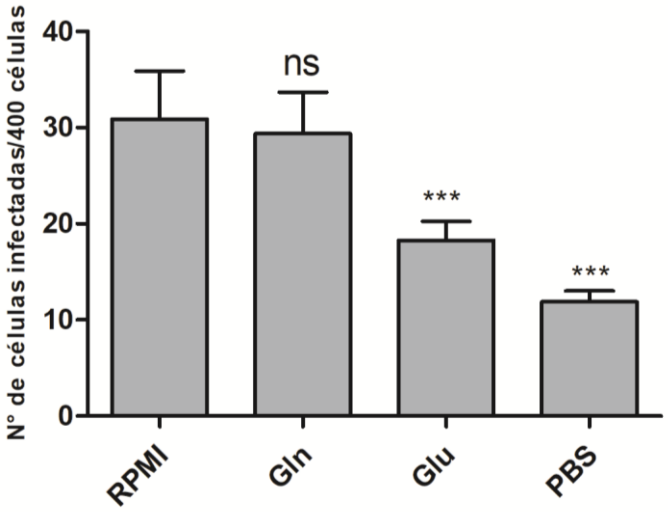

Figura 22 - Infectividade de formas tripomastigotas após estresse em PBS e recuperação na presença de Gln ou Glu. Os parasitas foram estressados metabolicamente em PBS por 4 horas e posteriormente foram recuperados em Gln ou Glu (3mM). Parasitas mantidos em RPMI ou PBS foram utilizados como controle. Após 24 horas da infecção as células foram marcadas com *Hoechst* e o número de células infectadas foi avaliado em um total de 400 células. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguida do teste *Tukey*. $P < 0,05$. ($n = 3$)

Uma vez observado que formas tripomastigotas estressados metabolicamente em PBS e recuperados na presença de Gln, mantêm a capacidade de invadir a célula hospedeira, o próximo passo foi avaliar a capacidade desses parasitas completarem o ciclo intracelular e novamente diferenciarem para formas tripomastigotas. Com esta finalidade, os parasitas foram manipulados como descrito anteriormente e utilizados para infectar as células CHO-K_1, conforme descrito em material e métodos. Após o período de replicação e diferenciação intracelular, os parasitas que se encontravam no sobrenadante dos cultivos foram contados a partir do 4° dia pós-infecção (Figura 23). Os dados obtidos demonstram que apesar dos parasitas recuperados na presença de Gln conseguirem invadir as células hospedeira com a mesma eficiência que os parasitas controle, não são capazes de proseguir no ciclo intracelular com o mesmo perfil observado no controle. O número de formas tripomastigostas que eclodiram ao longo da infecção é menor do que o número de parasitas que eclodiram na condição controle. Também foi observado que o número de parasitas presentes no sobrenadante dos cultivos no 5° dia pós-infecção, é maior na condição recuperados em Gln quando comparado aos parasitas recuperados em Glu, possivelmente pelo fato do número de células infectadas por estes parasitas ser menor do que as células infectadas por parasitas recuperados em Gln. Isso sugere que a Gln incorporada a partir do meio extracelular, nestas condições, não é suficiente para manter a infecção no mesmo nível do controle.

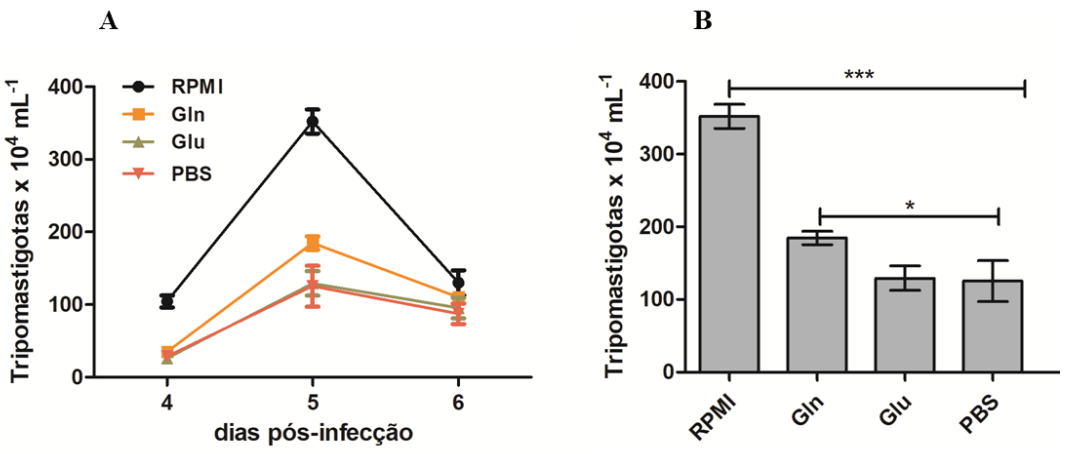

Figura 23 - Eclosão de formas tripomastigotas de células CHO-K_1. Os parasitas foram estressados metabolicamente em PBS por 4 h e recuperados na presença de Gln ou Glu por 1 h. Parasitas mantidos em RPMI ou PBS foram utilizados como controle. Os parasitas que estavam no sobrenadante dos cultivos foram contados em câmera de Neubauer entre o dia 4 e 6 pós-infecção. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguida do teste *Tukey*. $P < 0,05$.(n = 3)

3.1.3 Efeito dos análogos estruturais da Gln na biologia do T. cruzi

Os resultados que foram descritos até o momento demonstraram que a Gln: i. Pode ser transportada a partir do meio externo; ii. Participa da manutenção da viabilidade e dos níveis de ATP em formas epimastigotas; iii. Promove a diferenciação de formas epimastigotas para formas tripomastigotas metacíclicos, resultando em parasitas capazes de invadir a célula hospedeira e completar o ciclo intracelular de forma eficiente; e iv. é importante para a invasão celular de formas tripomastigotas oriundas de cultivo celular, sendo mais eficiente que o Glu, metabólito precursor da Gln. Com base nos resultados apresentados anteriormente, consideramos relevante avaliar o efeito de análogos estruturais de Gln, capazes de inibir enzimas que usam esse aminoácido como substrato, nos processos biológicos descritos anteriormente e dos quais a Gln participa. Esta abordagem permitiria validar a participação da Gln nestes processos, além de avaliar as vias metabólicas possivelmente envolvidas, as quais em última instância poderiam ser consideradas como potenciais alvos terapêuticos. Com esta finalidade foi feita uma busca na literatura por compostos estruturalmente análogos de Gln. Três análogos foram selecionados (Figura 24): azaserine (AZA) descrito como inibidor da enzima GF6PA que participa da via de biossíntese de hexosaminas (Rajapakse, Ming et al., 2009); acivicin (ACV) descrito como inibidor de enzimas glutamina amidotransferases (Maeda, Nakajima et al., 2014; Oliveira de Souza, Dawson et al., 2017) e também como inibidor da síntese de pirimidinas (Loh,Kufe, 1981); e o Ácido 2,4-Diamino-Pentanedióco (DPA) descrito como análogo estrutural de Gln, no entanto, ainda não foi encontrada descrição do seu mecanismo de ação.

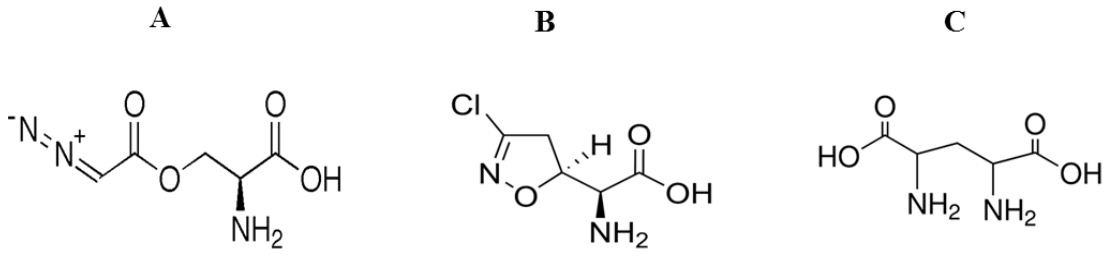

Figura 24 - Estrutura dos análogos estruturais de Gln. A- Azaserina; **B**- Acivicin e **C**- Ácido 2,4-Diamino-Pentanedioco (DPA).

Como mencionado anteriormente, mostramos que os análogos não inibiram o transporte de Gln nos parasitas (Figura 14). Com o intuito de avaliar se em *T. cruzi* os análogos seriam capazes de inibibir enzimas relacionadas ao metabolismo de Gln, medimos a possível interferência desses compostos com a atividade da enzima *Tc*GS, responsável pela síntese de Gln e a atividade da enzima *Tc*GF6PA, que utiliza Gln como substrato e participa da via de síntese dos aminoaçúcares, utilizando extratos proteicos de formas epimastigotas.

A atividade da enzima *Tc*GS foi avaliada em extrato de formas epimastigotas, na presença de 100 µM de cada um dos análogos. A atividade da enzima *Tc*GS não foi inibida pela adição dos análogos na reação (Figura 25). Como controle de 100% de atividade a reação foi realizada sem a adição dos análogos. O resultado obtido demonstra que esta enzima não é alvo do mecanismo de ação dos análogos.

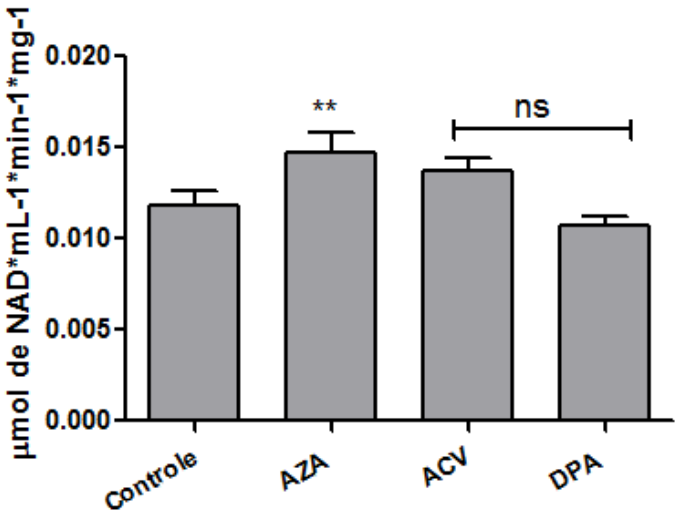

Figura 25 - Efeito dos análogos de Gln na atividade da enzima *Tc*GS. A atividade enzimática da *Tc*GS foi medida na presença dos análogos (100 µM) por 5 min, acompanhada pelo monitoramento da oxidação do NADH, por medidas de absorbância a 340 nm. Como controle, a reação foi medida na ausência dos análogos. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguida do teste *Tukey*. $P < 0,05$. (n = 3)

A atividade da enzima *Tc*GF6PA, presente no extrato dos parasitas, também foi avaliada na presença dos análogos de Gln, por meio de uma reação com dois passos: primeiro foi avaliada a atividade da enzima *Tc*GF6PA, utilizando os substratos e cofatores descritos para a reação e o extrato de parasitas. Em seguida, o Glu formado na primeira reação foi utilizado como substrato para a enzima glutamato desidrogenase (GDH), assim a atividade da GDH é proporcional à quantidade de Glu na amostra. Como controle, o primeiro passo da reação, foi realizado sem a adição do extrato (ou seja, da *Tc*GF6PA) ou também sem a adição da frutose-6-fosfato, um dos principais substratos da reação. Os três análogos analisados inibiram a atividade da *Tc*GF6PA, sendo que o análogo AZA inibiu completamente a atividade da enzima (Figura 26).

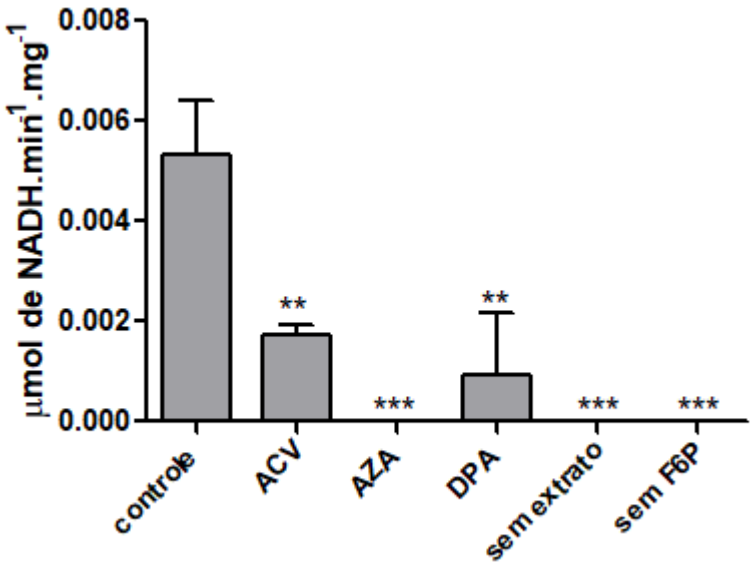

Figura 26 - Efeito dos análogos de Gln na atividade da enzima *Tc*GF6PA. A atividade enzimática da *Tc*GF6PA foi avaliada na presença da concentação de 100 µM dos análogos, por 5min. Após a interrupção da reação, o Glu formado foi utilizado como substrato para medir a atividade da enzima GDH, conforme descrito em material e métodos. As medições foram acompanhadas pelo monitoramento da redução do NAD^+, por medidas de absorbância a 340 nm. Como controle foi medida a reação na ausência dos análogos, como também na ausência do extrato ou da frutose-6-fosfato, um dos principais substratos da reação. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguida do teste *Tukey*. $P < 0,05$. (n = 3)

3.1.3.1 Avaliação do efeito dos análogos de Gln nos estágios encontrados no inseto vetor

Após demonstrar que os análogos são capazes de inibir a atividade da enzima *Tc*GF6PA em extrato de epimastigotas, foi avaliado o possível efeito do DPA, ACV e AZA na proliferação de formas epimastigotas, visto que Gln é importante para manutenção da viabilidade destas formas. Para isso os epimastigotas, em fase exponencial de crescimento, foram tratados com diferentes concentrações dos análogos (5 µM a 200 µM). O tratamento com os análogos apresentou um efeito inibitório na proliferação de formas epimastigotas de forma dose-dependente (Figura 27 A). No 5º dia de proliferação (aproximadamente metade da fase exponencial de crescimento) foi calculada a concentração correspondente à inibição de 50% da proliferação (IC_{50}). O valor de IC_{50} obtido foi similar para os três compostos: DPA 6,2 ± 0,72 µM; ACV 6,2 ± 1,01 µM e AZA 6,1 ± 2,1 µM, (Figura 27 B, D e F). Estes resultados sugerem que a inibição de vias, que possivelmente utilizam Gln, poderiam impedir processos relacionados à replicação das formas epimastigotas.

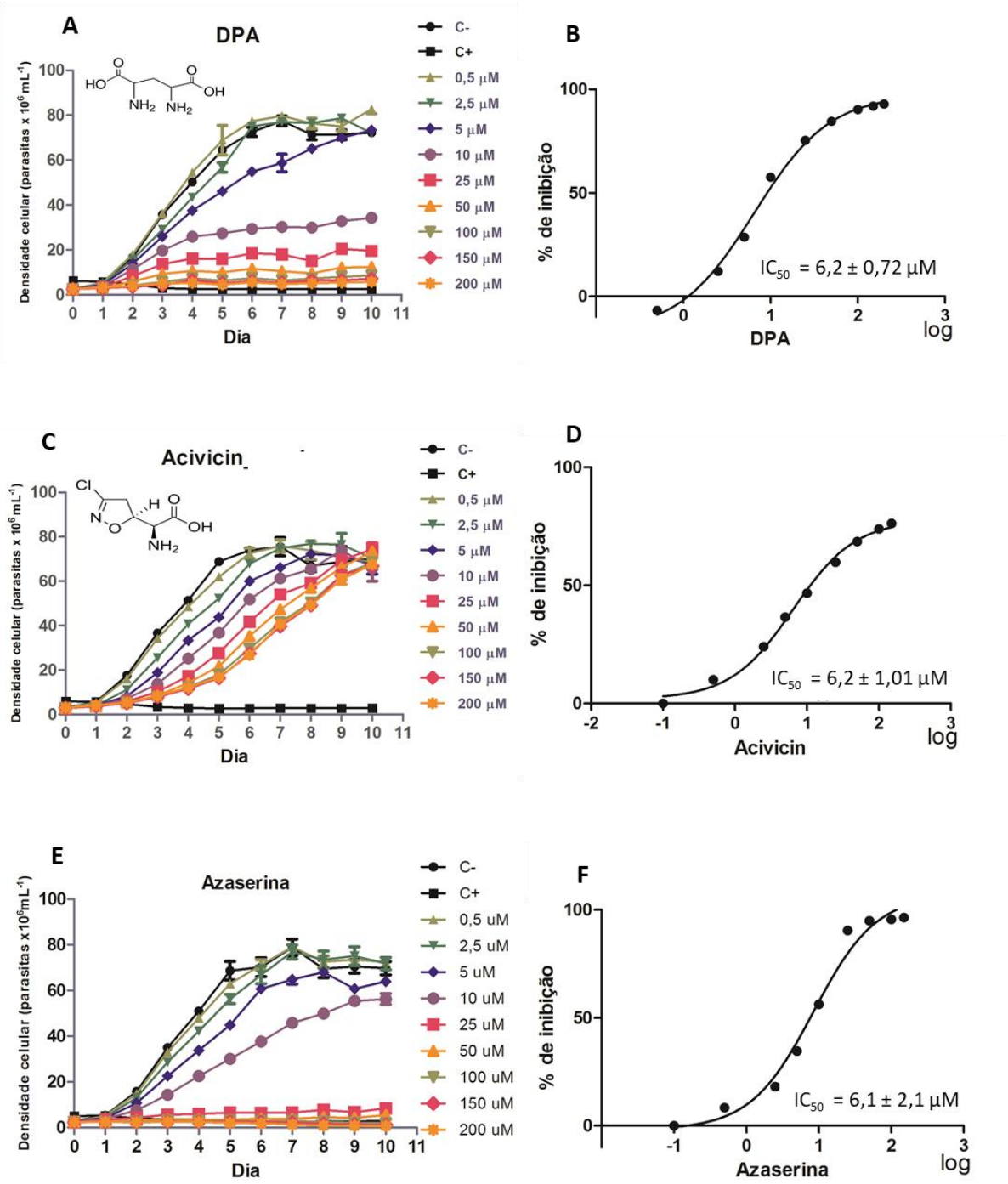

Figura 27 - Avaliação do efeito dos análogos de Gln na proliferação de formas epimastigotas. Os análogos DPA, ACV e AZA foram avaliados nas concentrações entre 0,5 µM e 200 µM. Os parasitas foram mantidos a 28 °C, cultivados em meio LIT pH 7,2**.** O controle negativo (C^-) foi realizado sem adição de composto na cultura. Para o controle de inibição (C^+) foi utilizada uma combinação de antimicina (0,5 µM) e rotenona (60 µM). (**A**, **C** e **E**) curvas de proliferação durante o período observado. (**B**, **D** e **F**) Curvas dose-resposta e IC_{50} calculado correspondente a cada tratamento. (n = 3)

Uma vez observado o efeito dos análogos na proliferação de formas epimastigotas, foi considerado importante avaliar alguns parâmetros que poderiam estar relacionados com a inibição da proliferação dos parasitas. Inicialmente avaliamos se o efeito dos análogos ocorre de forma irreversível ou se uma vez interrompido o tratamento, os parasitas seriam capazes de retomar a capacidade proliferativa normalmente, em outras palavras, se os compostos estariam agindo como tripanocidas ou tripanostáticos. Em caso de terem atividade tripanocida, é do nosso interesse avaliar se os parasitas tratados apresentam características de morte celular por necrose ou morte celular programada. Em conjunto com esses dados, foi considerado relevante analisar se o estresse nutricional dos parasitas potencializaria o efeito do tratamento, como também se o tratamento na presença de Gln ou Glu teria algum efeito protetor para o parasita. Os parasitas (formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento) foram incubados em PBS na presença de Gln ou Glu e tratados com o valor correspondente ao IC_{50} de cada um dos análogos por 48 h. Parasitas mantidos em LIT ou PBS sem suplementar, na presença dos inibidores, foram utilizados como controle. Após o período de incubação (48 h) foi analisada a viabilidade celular e a capacidade de recuperação em LIT após o tratamento. Também foram avaliados marcadores de morte celular, como exposição de fosfatidilserina (indicador do processo de apoptose) e integridade da membrana (indicador de necrose). Os parasitas que foram incubados apenas em PBS, sem a presença de nenhum metabólito como fonte de energia e carbono, apresentaram uma diminuição da viabilidade de ˜50%, em comparação aos parasitas incubados na presença de Gln ou Glu (Figura 28, painel i). No entanto, quando foi analisado o perfil de morte celular, o número de células marcadas com anexina (exposição de fosfatidilserina) e iodeto de propídio (integridade de membrana) correspondem a menos de 5% das células, valor esperado para epimastigotas em cultivo. Além do mais não há diferença entre os parasitas mantidos em PBS tratados ou não com os análogos (Figura 28 A e B), demonstrando que a ausência de nutrientes não potencializa o efeito do tratamento.

Em relação aos parasitas que foram mantidos na presença de Glu e tratados ou não com os análogos, observou-se que a viabilidade estava diminuída quando tratados com AZA e aumentada no tratamento com DPA. Os parasitas que foram tratados com ACV não apresentaram diferença na viabilidade celular quando comparados aos parasitas mantidos apenas na presença de Glu (Figura 28 C). Quando analisados os marcadores para morte celular, todos os parasitas incubados na presença de Glu, independente do tratamento ou não com os análogos, mantêm a integridade da membrana mas apresentam um aumento na exposição de fosfatidilserina, aproximadamente 12% de células positivas (Figura 28 D). Estes

resultados sugerem que Glu, como única fonte de energia e carbono, pode desencadear, em uma pequena fração da população, mecanismos de morte celular com características de apoptose.

Os parasitas que foram mantidos na presença de Gln, apresentaram a sua viabilidade diminuída quando tratados com AZA e aumentada no tratamento com DPA. Não há diferença na viabilidade entre os parasitas mantidos apenas na presença de Gln ou Gln+ACV (Figura 28 E). Quando analisados os marcadores de morte celular, observa-se que os parasitas mantidos em Gln, tratados ou não com os análogos, também mantêm a integridade da membrana (Figura 28 F).

Interessantemente, os parasitas controle, mantidos na presença de LIT, tratados ou não com os análogos, não apresentaram diferença em relação a viabilidade (Figura 28 G), no entanto, observou-se que parasitas incubados na presença dos análogos ACV e AZA, mantiveram a integridade da membrana e apresentaram uma proporção maior de células positivas para exposição de fosfatidilserina, quando comparado as outras condições de cultivo. Já os parasitas que foram mantidos na presença de LIT+DPA não mostraram diferenças quando comparados ao controle (Figura 28 H). Estes dados sugerem qua parasitas metabolicamente ativos, são mais suscetíveis ao tratamento com os análogos AZA e ACV, em relação ao perfil de morte celular, mesmo mantendo a viabilidade, possivelmente pela inibição de vias metabólicas que dependem de Gln.

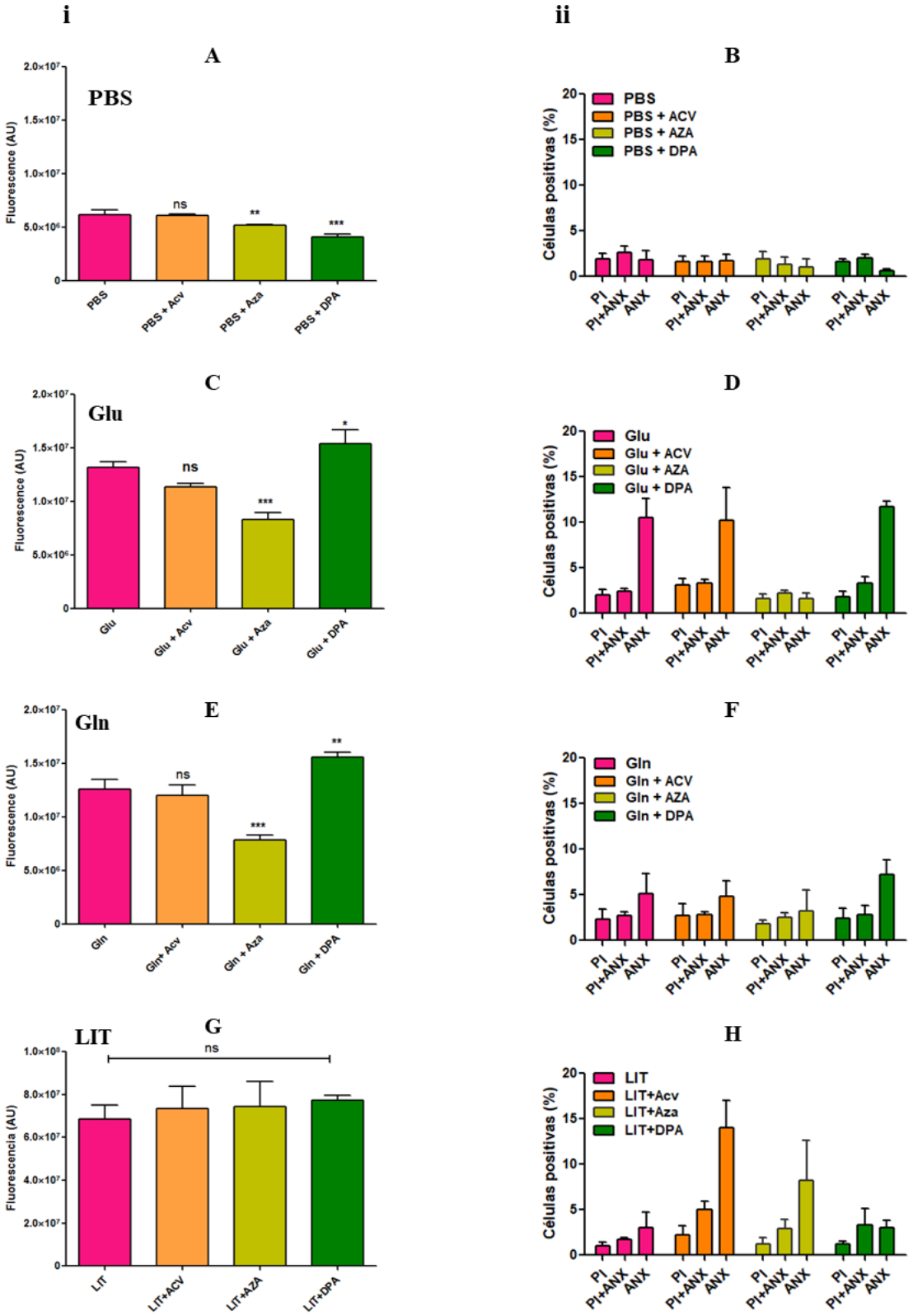

Figura 28 - Análise da viabilidade e morte celular em formas epimastigotas de *T. cruzi* na presença dos análogos. (**A; C; E e G**) parasitas mantidos em PBS, Glu, Gln, ou LIT na presença da concentração do análogo correspondente ao IC_{50}. A viabilidade foi analisada pelo método de resazurina (*Alamar blue*) após 48 h de incubação. (**B; C; F e G)** Análise do perfil de morte celular nos parasitas tratados como descrito anteriormente. Foi utilizado anexina, marcador de exposição de fosfatidilserina (indicador de apoptose) e iodeto de propídio (PI) marcador de integridade de membrana (indicador de necrose). Análise estatística: ANOVA de uma via, seguida do teste *Tukey*. $P < 0,05$. (n = 3)

Como mencionado anteriormente, um dos propósitos destes experimentos seria avaliar se os efeitos dos análogos nos parasitas seriam reversíveis após a interrupção do tratamento. Para analisar essas possibilidades, após o cultivo dos parasitas por 48 h nas condições descritas anteriormente, o tratamento foi removido e os parasitas foram transferidos para o meio LIT. A capacidade de recuperação da proliferação normal dos parasitas foi avaliada durante 10 dias (Figura 29, painel i). No quinto dia, após a transferência dos parasitas para o meio LIT, também foi analisado o perfil de morte celular (Figura 29, painel ii).

Como pode ser observado, em todas as condições de cultivo em que os parasitas foram tratados com ACV proliferaram normalmente quando foram transferidos para o meio LIT, independente da condição de incubação prévia, como também não apresentaram células positivas para marcadores de morte celular no 5° dia de cultivo, sugerindo que o efeito deste análogo pode ser revertido após a interrupção do tratamento. Já os parasitas que foram tratados com DPA e incubados apenas em PBS apresentaram uma recuperação lenta, em relação ao controle (parasitas mantidos apenas em PBS), sendo perceptível a partir do 6° dia de cultivo em LIT (Figura 29 A). No entanto, quando os parasitas foram mantidos previamente em Gln+DPA apresentaram uma recuperação parcial da proliferação, perceptível a partir do 3° dia; sendo que a recuperação após a transferência para o meio LIT foi de ˜50% em relação ao controle, (Figura 29 E). Estes resultados sugerem que provavelmente o mecanismo de ação do DPA está mais envolvido com as vias metabólicas que utilizam Gln diretamente, sendo o efeito, apenas parcialmente revertido. Em relação aos marcadores de morte celular, quando os parasitas foram mantidos previamente na presença de PBS+DPA apresentaram um maior número de células positivas para necrose (PI ± 15%) e para apoptose em fase tardia (PI+Anx ± 18%) (Figura 29 B), em relação a análise após o período de 48 h de tratamento. Os parasitas mantidos previamente na presença de Glu+DPA (figura 27 D) ou Gln+DPA (Figura 29 F), mantiveram o perfil de marcação para anexina e aumentaram o número de células positivas para necrose (PI ± 8% para ambos e dupla marcação PI+Anx ± 12% para Glu e ± 8% para Gln) quando comparados ao perfil apresentado após 48 h de tratamento. Esses dados de morte celular são compatíveis com o perfil de proliferação apresentado pelos parasitas, e também demonstram que Gln e Glu podem estar envolvidos na proteção da integridade de membrana do parasita durante o tratamento com DPA. Outro dado importante é que Gln parece ter um papel de proteção também em relação a morte celular programada, tanto em 48 h de tratamento quanto no 5° dia de recuperação, os parasitas que foram mantidos na presença de Gln apresentam um número menor de células positivas para

dupla marcação (PI+ANX) quando comparado aos parasitas que foram mantidos em Glu ou apenas em PBS.

A análise dos dados referentes ao tratamento com AZA demonstra que os parasitas que foram previamente mantidos em PBS+AZA ou Gln+AZA, não recuperaram a capacidade de proliferação quando cultivados em LIT (Figura 29 A e E), já os parasitas que foram mantidos em Glu+AZA apresentaram um perfil de recuperação a partir do 8° dia (Figura 29 C). Em relação aos marcadores de morte celular (Figura 29 B, D e F) observou-se um aumento da marcação por anexina (PBS+AZA 25%; Glu+AZA 15% e Gln+AZA 20%); como também um aumento de células positivas para dupla marcação (PI+Anx), PBS+AZA 20%; Glu+AZA e Gln+AZA 15%. No entanto a marcação para PI, indicador de necrose, é menor (PBS+AZA 4%; Glu+AZA 10% e Gln+AZA 8%) demonstrando que AZA desencadeia um processo de morte celular programada, com características de apoptose, que é caracterizada pela manutenção da integridade da membrana e exposição de fosfatidilserina. Provavelmente, AZA atuaria de forma irreversível em vias metabólicas que dependem de Gln. Já os pararasitas que foram tratados com os análogos na presença de LIT, proliferaram normalmente após a remoção do tratamento, como também recuperaram o perfil de exposição de fosfatidilserina apresentado após 48 h de tratamento (Figura 29 G e H). Estes resultados em conjunto, demonstram que a Gln é relevante para a replicação das formas epimastigotas, mais também mostram que a inibição de vias relacionadas com o metabolismo de Gln pode desencadear mecanismos de morte celular programada, com características de apoptose.

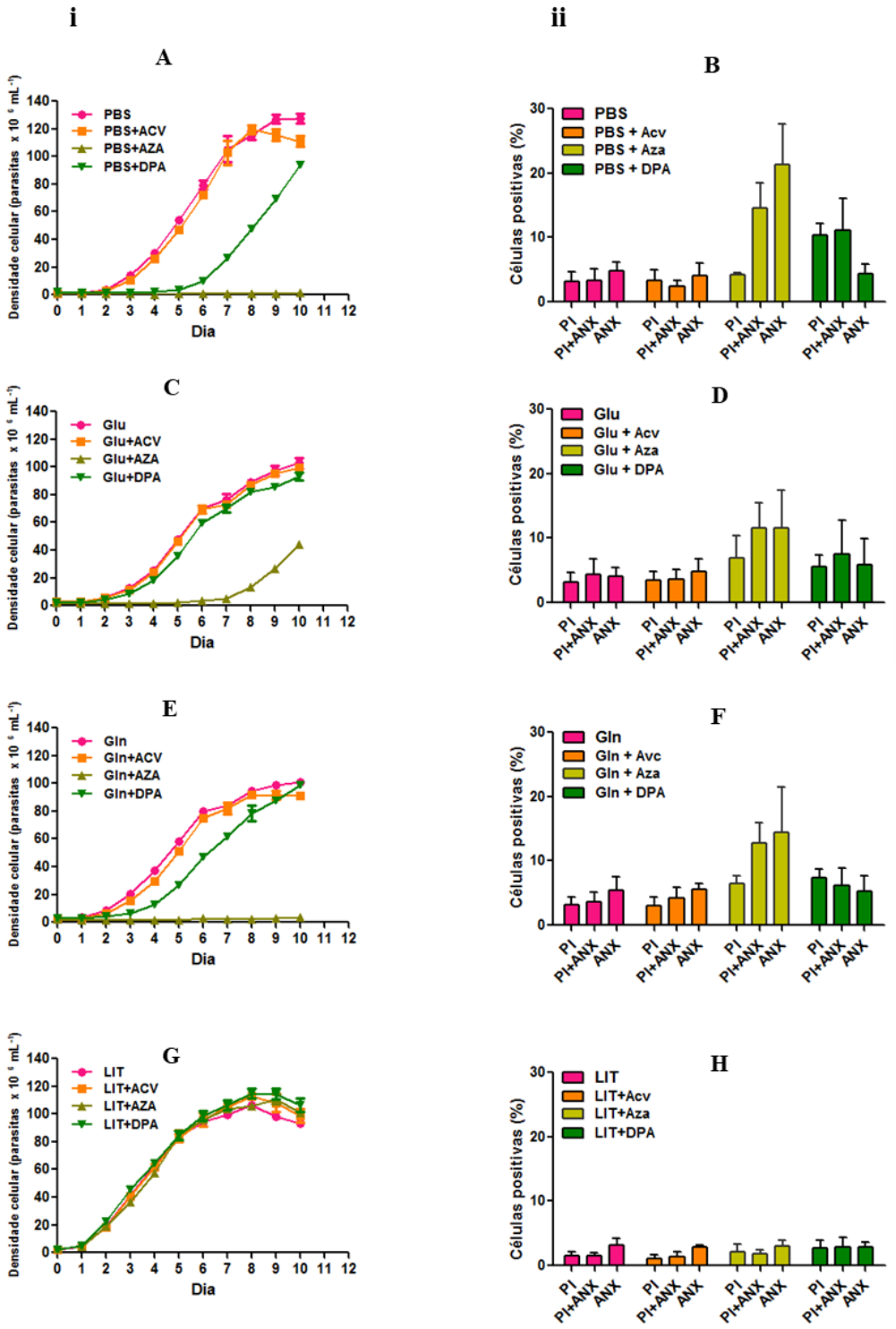

Figura 29 - Recuperação dos parasitas em LIT após incubação em PBS, Glu, Gln ou LIT e tratados com os análogos de Gln. (**A; C; E e G**) Proliferação de formas epimastigotas de *T. cruzi* incubadas em meio LIT após 48 h em PBS, Gln ou Glu e/ou tratadas com o valor correspondente ao IC_{50} dos análogos de Gln. A proliferação foi acompanhada por leituras de absorbância a 620 nm, durante 10 dias, parasitas mantidos em LIT foram usados como controle. (**B; C; F** e **H)** Análise do perfil de morte celular nos parasitas tratados previamente, como descrito anteriormente, no 5° dia de cultivo em LIT. Foi utilizado anexina, marcador de exposição de fosfatidilserina (indicador de apoptose) e iodeto de propídio (PI) marcador de integridade de membrana (necrose), (n = 3).

Após a análise do efeito dos análogos de Gln na proliferação das formas epimastigotas, e tendo sido demonstrado que a proliferação dos parasitas é inibida de forma irreversível quando tratado com AZA, o próximo passo foi avaliar um possível efeito dos análogos no processo de metaciclogênese, visto que foi demonstrado que Gln tem a capacidade de promover a diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos. Com este objetivo, os parasitas em fase estacionária de crescimento foram tranferidos para TAU3AAG, e tratados com a concentração correspondente ao valor de IC_{50} para cada análogo. Os dados obtidos demonstram que apenas o tratamento com AZA inibiu a diferenciação dos parasitas (Figura 30). Como já mencionado anteriormente, AZA é descrito como inibidor da via de síntese de hexosaminas, mais precisamente da enzima GF6PA, que utiliza Gln como um dos seus substratos, além do mais foi demonstrado neste trabalho que AZA inibiu completamente a enzima *Tc*GF6PA em extratos de epimastigotas. Este resultado confirma a importância da Gln para o processo de diferenciação de formas epimastigotas para formas tripomastigotas metacíclicas.

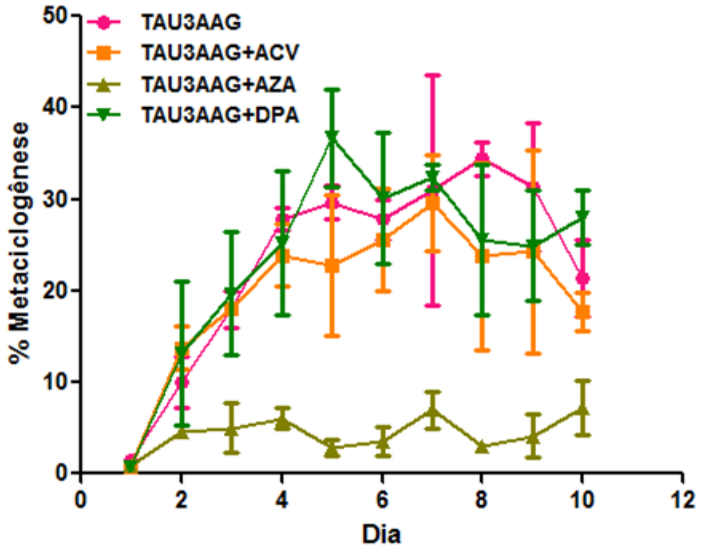

Figura 30 - Efeito dos análogos de Gln na metaciclogênese. Após a tranferência dos parasitas para o meio TAU, os mesmos foram tratados com concentração correspondente ao IC_{50} de cada um dos análogos, durante todo o período de diferenciação. O processo de diferenciação foi acompanhado durante 10 dias por contagem em câmara de Neubauer e observação da morfologia dos parasitas, (n = 3).

3.1.3.2 Avaliação do efeito dos análogos de Gln nos estágios encontrados no hospedeiro mamífero

Os resultados obtidos até agora em relação ao efeito dos análogos de Gln, demonstram que a Gln tem uma participação efetiva na proliferação de formas epimastigotas e também no processo de metaciclogênese. Tendo em vista que o ciclo intracelular, processo este que ocorre no hospedeiro mamífero, também apresenta formas replicativas (amastigota e epimastigota intracelular) que após a replicação diferenciam para formas tripomastigotas, foi considerado importante avaliar o efeito dos análogos também no ciclo intracelular. O primeiro passo foi avaliar a toxicidade dos análogos para as células hospedeiras CHO-K_1, modelo experimental utilizado neste estudo. Para isso as células foram tratadas com diferentes concentrações dos análogos por 48 h e após esse período a viabilidade foi avaliada pelo método de MTT. Os dados obtidos demonstram que ACV e AZA aprensentam um efeito tóxico para as células a partir da concentração 1µM, sendo 0,8 µM a concentração máxima tolerada pelas células (Figura 31 A e B). Já o tratamento com o análogo DPA foi tóxico para as células a partir da concentação 200 µM (Figura 31 C).

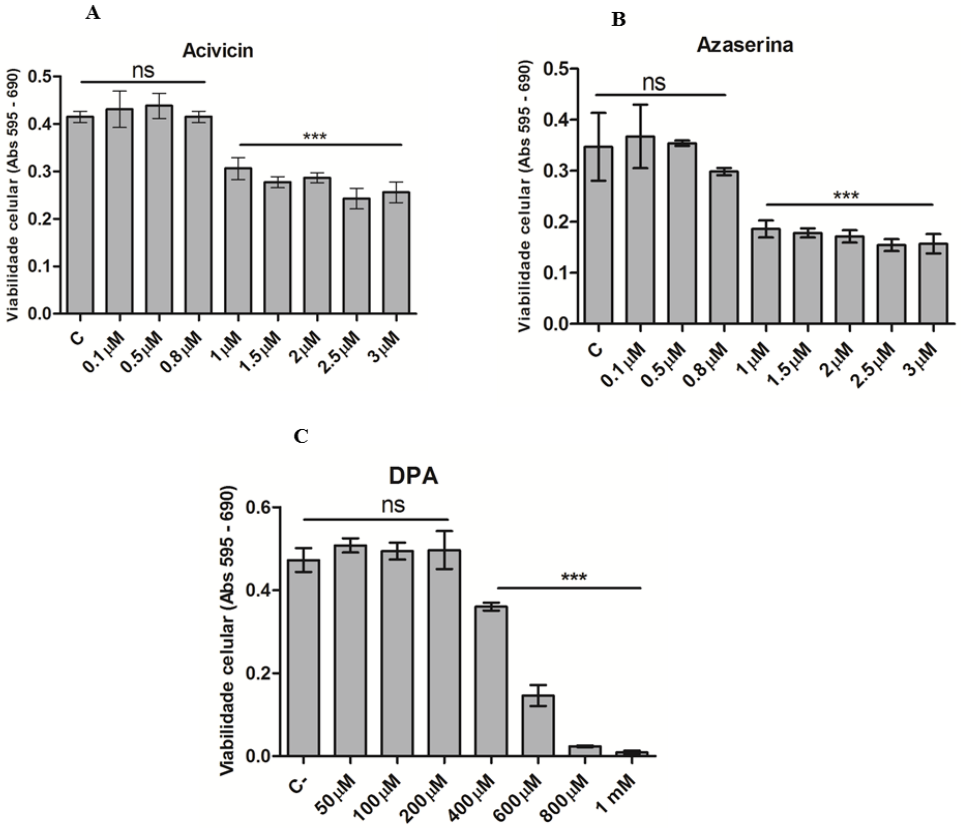

Figura 31 - Toxicidade dos análogos de Gln em células CHO-K_1. Viabilidade das células CHO-K_1 tratadas com diferentes concentrações dos análogos de Gln. As células foram avaliadas pelo método de MTT, após 48 horas de tratamento. (**A**) acivicin; (**B**) e (**C**) DPA. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguida do teste *Tukey*. $P < 0,05$. (n = 3)

Após a análise da toxocidade nas células CHO-K_1, foi avaliado o efeito dos análogos no tratamento do ciclo intracelular do parasita, respeitando-se a concentração máxima tolerada pela célula, para cada composto. Inicialmente foi avaliado o efeito do análogo DPA no ciclo intracelular do parasita, pelo tratamento das células infectadas com formas tripomastigotas, conforme descrito em material e métodos. Brevemente, após a invasão das células pelos parasitas, as mesmas foram tratadas com diferentes concentrações de DPA, utilizando-se a concentração máxima de 200 µM. Como demonstra a figura 30, o tratamento com DPA reduziu o número de formas tripomastigotas que eclodiram ao longo da infecção. No 5º dia após a infecção, as concentrações entre 25µM a 200µM, apresentaram uma redução de forma dose-dependente do número de parasitas, em relação ao controle. Estes dados foram utilizados para o cálculo do IC_{50} (Figura 32 C).

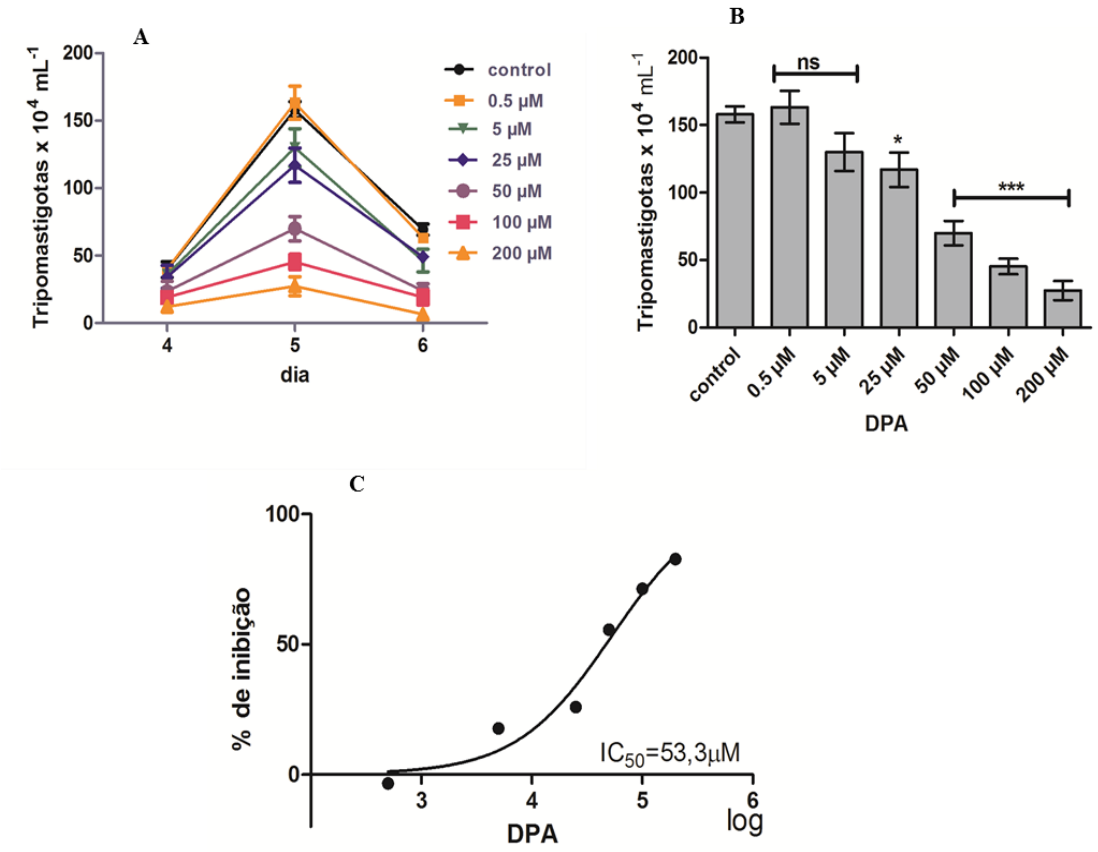

Figura 32 - Efeito do análogo DPA no ciclo intracelular do *T. cruzi*. As células infectadas foram tratadas com as concentrações entre 0,5 a 200 µM**. (A)** Efeito do DPA ao longo do período de eclosão de formas tripomastigotas, 4º, 5º e 6º dia pós-infecção. **(B)** Efeito do DPA no 5º dia pós-infecção na eclosão de tripomastigotas. **(C)** IC_{50} calculado no 5° pós-infecção (53,3 µM)**.** Análise estatística: ANOVA de uma via, seguida do teste *Tukey*. $P < 0,05$. (n = 3)

O efeito do análogo ACV no ciclo intracelular também foi analisado. Devido à alta toxidade do composto para as células hospedeiras, a concentração máxima utilizada foi de 0,5 µM. O tratamento com o análogo ACV também inibiu a eclosão de forma dose-dependente (Figura 33 A), sendo que o IC_{50} calculado foi de 152,9 nM (Figura 33 C), o que confirmaria a importância da Gln para o ciclo intracelular dos parasitas.

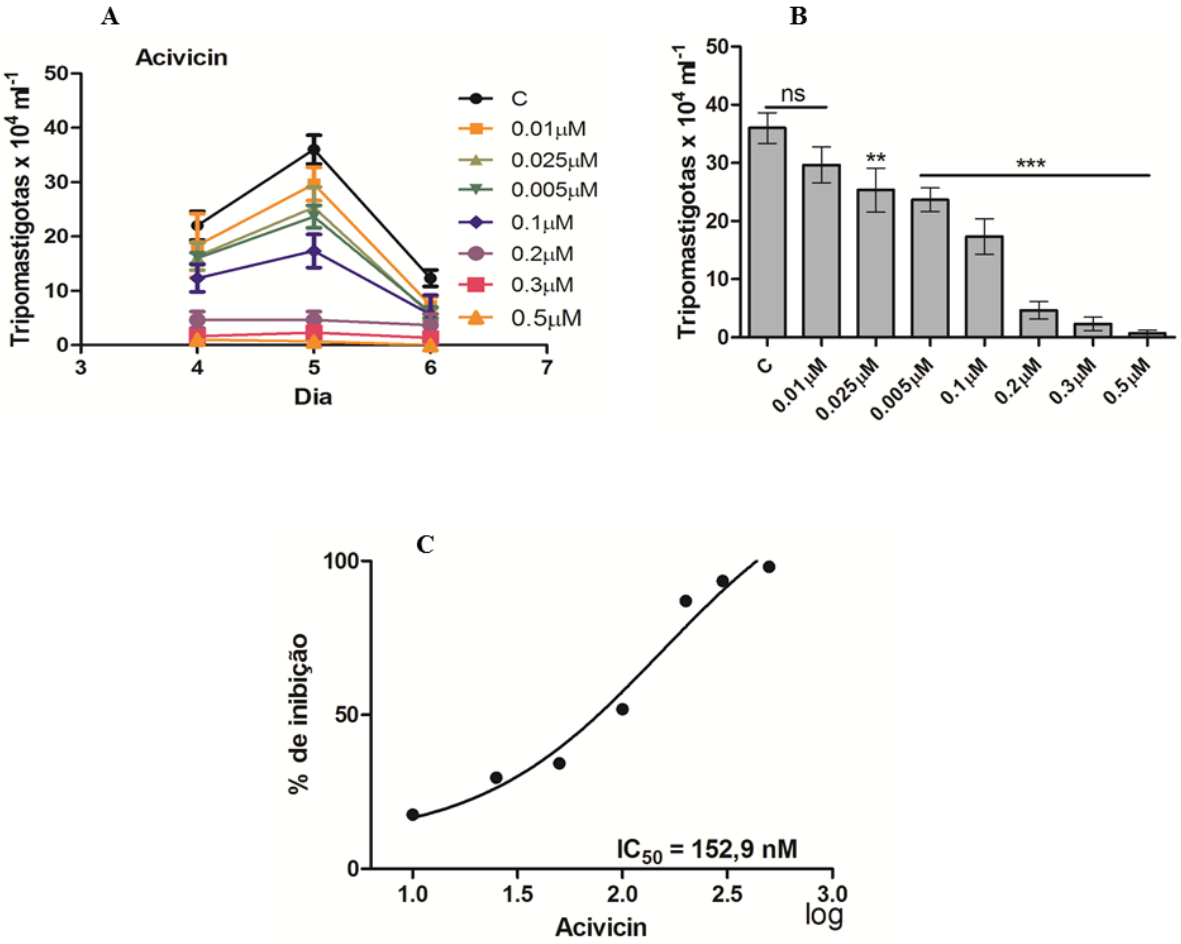

Figura 33 - Efeito do análogo acivicin no ciclo intracelular do *T. cruzi*. As células infectadas foram tratadas com as concentrações entre 0,01 a 0,5 µM. **(A)** Efeito do acivicin ao longo do período de eclosão de formas tripomastigotas, 4º, 5º e 6º dia pós-infecção. **(B)** Efeito do acivicin no 5º dia pós infecção, dia do pico máximo de eclosão de tripomastigotas. **(C)** IC_{50} calculado no 5° pós-infecção (152,9 nM)**.** Análise estatística: ANOVA de uma via, seguida do teste *Tukey*. $P < 0,05$. (n = 3)

Após a análise do efeito dos análogos DPA e ACV no ciclo intracelular do *T. cruzi*, também foi analisado o efeito de AZA nas mesmas condições de cultivo. Devido à alta toxicidade deste análogo para as células hospedeiras, foi utilizada a concentração 0,5 µM para análise no ciclo intracelular. O tratamento inibiu aproximadamente 20% da eclosão de formas tripomastigotas (Figura 34). Devido à impossibilidade de aumentar as concentrações do composto no tratamento, devido à toxicidade para a célula hospedeira, não foi possível a determinação da concentração correspondente ao IC_{50}.

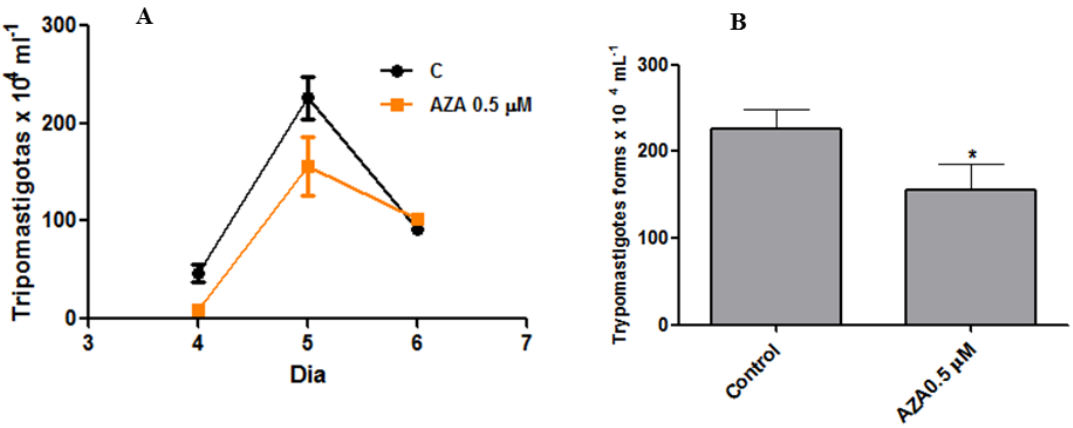

Figura 34 - Efeito do análogo AZA no ciclo intracelular do *T. cruzi*. As células infectadas foram tratadas com 0,5 µM. **(A)** Efeito do AZA ao longo do período de eclosão de formas tripomastigotas, 4º, 5º e 6º dia pós-infecção. **(B)** Efeito do AZA no 5º dia pós infecção, dia do pico máximo de eclosão de tripomastigotas. Análise estatística: teste *T*, $P < 0,05$. (n = 3)

Conforme os dados apresentados, os análogos de Gln inibem o ciclo intracelular do parasita. Provavelmente o efeito ocorre pela inibição de vias que utilizam Gln como substrato, visto que, o transporte de Gln não foi inibido pelos análogos, sendo demonstrada uma inibição da enzima GF6PA em extratos de epimastigotas. Isto demonstra mais uma vez a participação da Gln em processos importantes para a manutenção do ciclo celular, como por exemplo, replicação e/ou diferenciação.

Na tabela 1, pode-se encontrar um resumo dos resultados referentes à análise do efeito dos análogos de Gln nos diferentes processos nos quais foram analisados.

Análogo / **Efeito**	Acivicin	Azaserina	DPA
IC_{50} (epimastigota)	6,2 ±1,01 µM	6,1 ±2,1 µM	6,2 ±0,72 µM
Viabilidade (48 h após tratamento)	PBSGlu – igual ao controle PBSGln – igual ao controle	PBSGlu – diminuída PBSGln – diminuída	PBSGlu – aumentada PBSGln – aumentada
Morte celular (%) (48 h após tratamento)	(PBSGlu) PI – 3,11 PI+Anx – 3,2 Anx – 10,2 (PBSGln) PI – 2,7 PI+Anx – 2,8 Anx – 4,8	(PBSGlu) PI – 1,6 PI+Anx – 2,2 Anx – 1,5 (PBSGln) PI – 1,8 PI+Anx – 2,5 Anx – 3,1	(PBSGlu) PI – 1,7 PI+Anx – 3,3 Anx – 11,7 (PBSGln) PI – 2,4 PI+Anx – 2,8 Anx – 7,2
Recuperação em LIT	PBSGlu – sim PBSGln – sim	PBSGlu – sim (8° dia) PBSGln – não	PBSGlu – sim (˜80%) PBSGln – sim (˜50%)
Morte celular (%) (5° dia recuperação em LIT)	(PBSGlu) PI – 3,4 PI+Anx – 3,6 Anx – 4,7 (PBSGln) PI – 3 PI+Anx – 4,1 Anx – 5,5	(PBSGlu) PI – 6,9 PI+Anx – 11,5 Anx – 11,5 (PBSGln) PI – 6,4 PI+Anx – 12,8 Anx – 14,4	(PBSGlu) PI – 5,6 PI+Anx – 7,4 Anx – 5,8 (PBSGln) PI – 7,3 PI+Anx – 6,1 Anx – 5,2
Inibição da metaciclogênese	não	sim	não
Tocixidade em CHO (Máx. Tolerado)	0,8 µM	0,8 µM	200 µM
IC_{50} (ciclo intracelular)	152,9 nM	0,5 µM (inibe 20%)	53,3 µM
Inibição da GS	não	não	não
Inibição da GF6PA	sim	sim	sim
Inibição do transporte de Gln	não	não	não

Tabela 1- Resumo do efeito dos análogos de Gln nos diferentes estágios do *T. cruzi*

3.2 *T. brucei*

Uma vez analisada a importância da Gln para o *T. cruzi*, sendo demonstrado que a Gln tem uma participação relevante ao longo do ciclo de vida do parasita e sabendo-se da importância da enzima *Tc*GS na biologia do *T. cruzi*, considerou-se relevante avaliar a participação da Gln e da enzima GS na biologia do *T. brucei*. Ambos os parasitas são organismos relacionados filogeneticamente, e causadores de doenças consideradas negligenciadas pela OMS. Para avaliar a importância da Gln e da enzima *Tb*GS na biologia do *T. brucei* utilizamos a estratégia da diminuição dos níveis da enzima *Tb*GS, por meio da técnica de RNA de interferência (iRNA), como também o cultivo dos parasitas em meio sem Gln.

3.2.1 Tranporte de Gln em formas sanguícolas de T. brucei

Inicialmente avaliamos a capacidade das formas sanguícolas de *T. brucei*, (*Single Marker Bloodstream form*, SMB), transportarem Gln a partir do meio extracelular. Para isso os parasitas, em fase exponencial de crescimento, foram incubados na presença de Gln radioativamente marcada (3 mM), mesma concentração saturante utilizada no tranporte em *T. cruzi*. A incorporação de Gln pelos parasitas foi avalida em diferentes tempos de incubação. Formas sanguícolas de *T. brucei* são capazes de incorporar Gln a partir do meio externo (Figura 35 A). A incorporação de Gln ao longo do tempo se ajustou a uma função de decaimento exponencial (R^2 0,996). A curva em função do tempo pode ser considerada aproximadamente linear até 10 min (R^2 0,977) (Figura 35 B) e apresentou uma velocidade inicial nas condições descritas de 0,27 nmols por minuto.

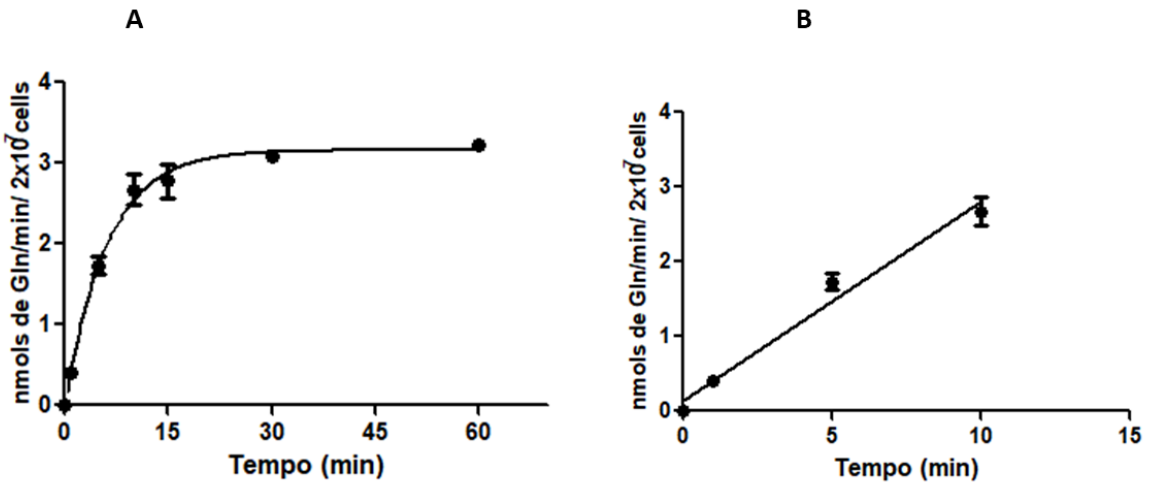

Figura 35 - Transporte de Gln em formas sanguícolas de *T. brucei*. A incorporação de Gln pelos parasitas foi avaliada em função do tempo, pela incubação na presença de Gln radioativamente marcada (3mM) (n = 3)

3.2.2 Atividade da enzima TbGS em extrato de formas sanguícolas

Após avaliar a capacidade dos parasitas incorporarem Gln a partir do meio extracelular, avaliamos a atividade da enzima *Tb*GS em extrato dos parasitas. Para medir a atividade da *Tb*GS utilizamos o sistema clássico de acoplamento com as enzimas piruvato quinase (PK) e lactato desidrogenase (LDH), padronizado para *T. cruzi* por (Crispim et al*.). A reação foi acompanhada em tempo real por espectrofotometria, monitorando a diminuição da absorbância a 340 nm correspondente a oxidação do NADH (substrato da enzima LDH). A atividade *Tb*GS em extrato dos parasitas foi proporcional a quantidade de extrato adicionado na reação (Figura 36). Como controle da atividade, a reação foi feita sem a adição do extrato (0 µg).

* Crispim, M.; Damasceno, F.S.; Hernández, A.; Barisón, M.J.; Sauter, I.P.; Pavani, R.S.; Moura, A.S.; Pral, E.M.F.; Cortez, M.; Elias, M.C.; Silber, A.M.; The glutamine synthetase of *Trypanosoma cruzi* is requerid for its resistance to ammonium accumulation and evasion of the parasitophorous vacuole during host-cell infection. Submitted.

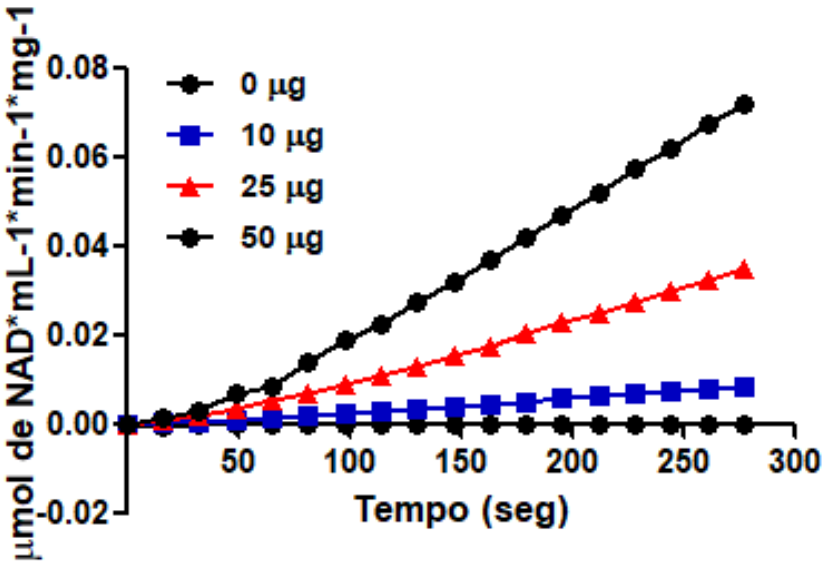

Figura 36 – Atividade da enzima *Tb*GS em extrato de formas sanguícolas de *T. brcei*. A atividade enzimática da *Tb*GS foi acompanhada pelo monitoramento da oxidação do NADH, por medidas de absorbância a 340 nm. Como controle, a reação foi medida na ausência do extrato (*Tb*GS). (n = 3)

3.2.3 Amplificação da sequência da enzima GS e clonagem no vetor induzível para interferência de RNA

Uma vez demonstrado que o parasita é capaz de incorporar Gln a partir do meio externo e que a enzima *Tb*GS é ativa, iniciamos a clonagem da sequência gênica para indução do *knockdown* por RNA de interferência (RNAi). Com este intuito, a sequência gênica que codifica para a *Tb*GS foi identificada por análise *in silico* e foram desenhados iniciadores específicos para amplificação por PCR do fragmento escolhido, conforme descrito em material e métodos. A sequência correspondente a *Tb*GS completa foi amplificada (1266 pb) (Figura 37 A), e clonada no vetor induzível para interferência de RNA (p2T7). A construção obtida foi utilizada para transformação de bactérias XL1Blue. Colônias de bactérias foram submetidas à reação de PCR para avaliação da presença da construção clonada, utilizando-se iniciadores específicos para *Tb*GS. Foi selecionada uma colônia positiva (Figura 37 B) e após islolamento da construção p2T7*Tb*GS, o clone foi confirmado novamente mediante PCR e padrão de corte com enzimas de restrição (Figura 37 C).

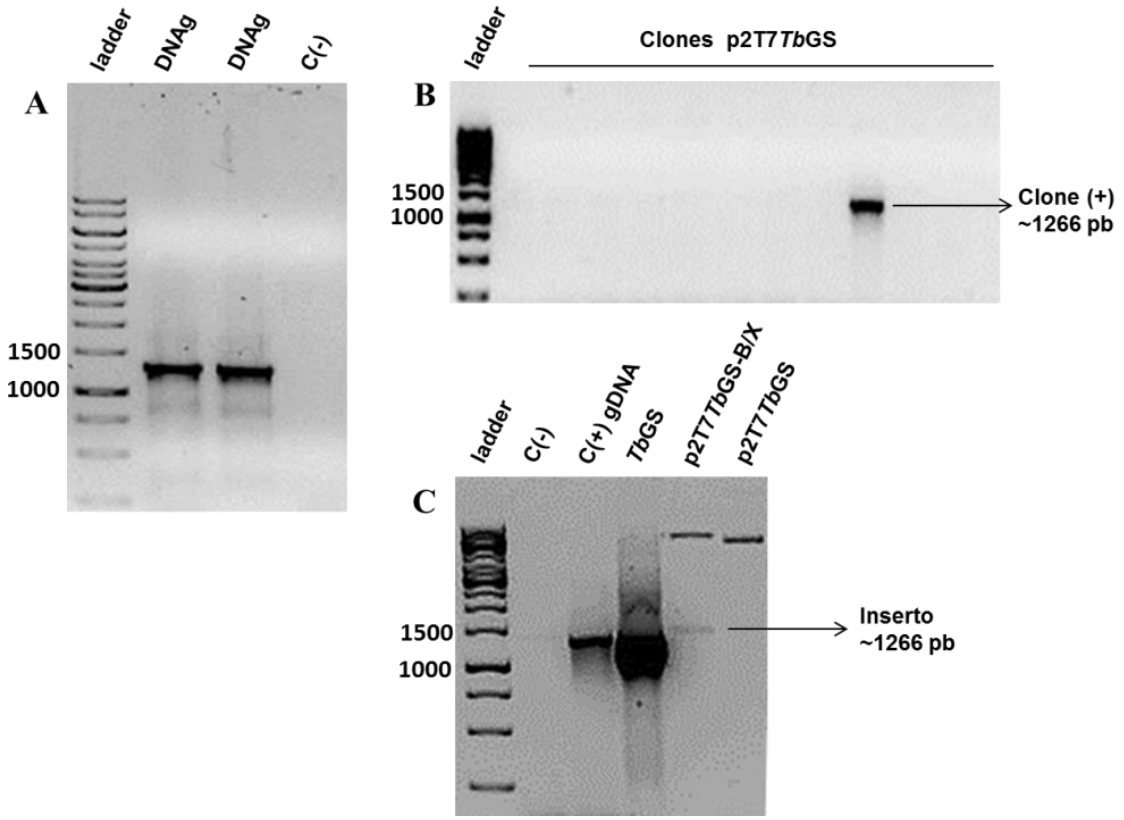

Figura 37 - Clonagem da sequência correspondente a enzima *Tb*GS em vetor induzível para iRNA. (**A**) A sequência da *Tb*GS foi amplificada a partir do DNA genômico (gDNA) e clonada no vetor p2T7. O produto da ligação foi utilizado para transformar bactérias XL1Blue. (**B**) Clones positivos foram confirmados pela técnica de PCR de colônias. (**C**) Confirmação da clonagem através de PCR utilizando o clone positivo identificado em **B** (*Tb*GS) como molde e gDNA como controle positivo. Confirmação por digestão com enzimas de restrição, liberação do inserto após tratamento com as enzimas BamHI e XhoI (p2T7*Tb*GS-B/X). Plasmídeo sem digerir foi utilizado como controle (p2T7*Tb*GS).

3.2.4 Transfecção dos parasitas com a construção p2T7TbGS

Após a clonagem e confirmação da construção p2T7*Tb*GS, o plasmídeo foi purificado em larga escala, e utilizado para transfectar formas sanguícolas de *T. brucei*. Após a seleção dos parasitas transfectados, avaliamos a efetividade do sistema de indução do *knockdown* da enzima *Tb*GS. Com esta finalidade, os parasitas foram cultivados em meio HMI-9, e o sistema foi induzido pela adição de tetraciclina (Tet) no meio de cultivo (2µg/mL). Os parasitas foram cultivados por 48 h e após esse período avaliamos os níveis de transcritos para a enzima *Tb*GS

por meio da técnica de qRT-PCR. Também foi avaliada a atividade da enzima no extrato dos parasitas cultivados nas mesmas condições. Os parasitas induzidos apresentaram níveis reduzidos de transcritos para *Tb*GS (Figura 38 A), como também apresentaram uma diminuição da atividade da enzima no extrato de aproximadamente 50% (Figura 38 B). Estes resultados demonstraram que o sistema de indução para diminuição da expressão da enzima *Tb*GS foi efetivo.

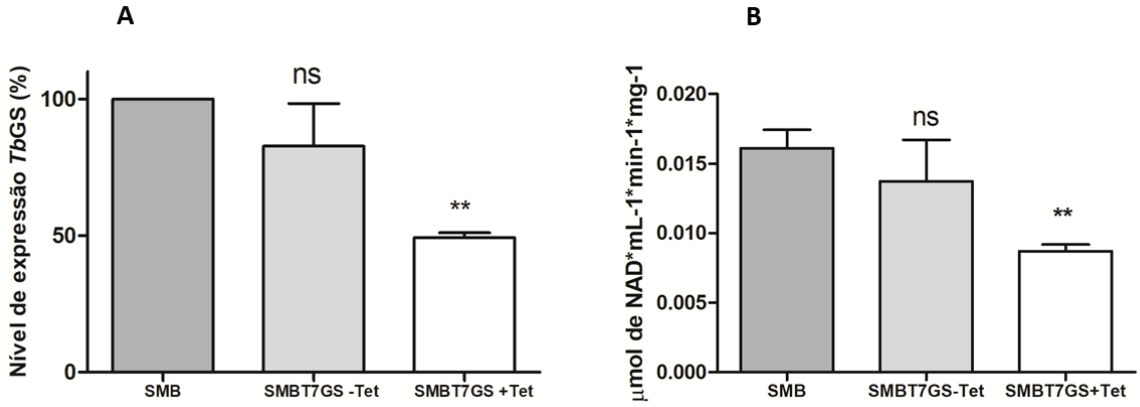

Figura 38 - Confirmação do *knockdown* da enzima *Tb*GS. Formas sanguícolas de *T. brucei* (SMB) foram cultivadas em meio HMI-9 e induzidas (SMBT7GS+Tet) ou não (SMBT7GS-Tet) pela adição de tetraciclina (2µg/mL), após 48 h de cultivo foram avaliados: (**A**) Transcritos para a enzima *Tb*GS por qRT-PCR. (**B**) Atividade da enzima *Tb*GS em extrato dos parasitas. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguida do teste *Tukey*. $P < 0,05$.(n = 3)

3.2.5 Análise do fenótipo dos parasitas transfectados

Após a verificação da capacidade de *T. brucei* de transportar Gln a partir do meio extracelular, e da confirmação da diminuição dos transcritos e da atividade enzimática da *Tb*GS, foi avaliada a proliferação dos parasitas nas seguintes condições: *knckdown* para *Tb*GS ou não em meio HMI-9 com a concentração padrão de Gln (584 µg/mL) e/ou em meio HMI-9 com uma concentração reduzida de Gln (5 µg/mL). Os resultados demonstram que os parasitas *knckdown* para *Tb*GS proliferaram menos que o controle, independente da concentração de Gln no meio de cultivo (Figura 39).

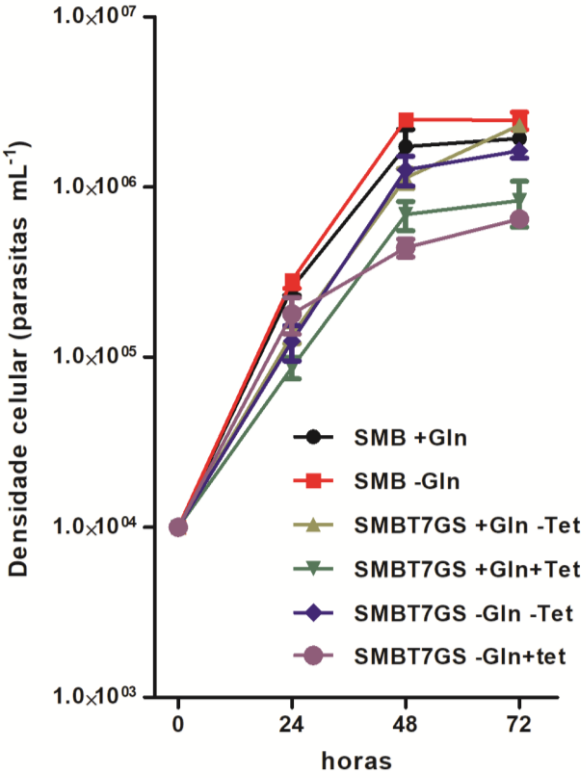

Figura 39 - Curva de proliferação de formas sanguícolas SMB. Os parasitas foram cultivados em meio HMI-9, na presença da concentração padrão de Gln ou na presença de uma concentração reduzida de Gln **(+Gln = 584 µg/mL; -Gln = 5 µg/mL)** e *knckdown* para *Tb*GS pela adição de tetraciclina (2 µg/mL). Os parasitas foram contados a cada 24 em câmara de Neubauer por 72 h. (n = 3)

Considerando que os parasitas *knockdown* para *Tb*GS proliferaram menos que os parasitas não induzidos, foi considerado relevante analisar se a diminuição da proliferação estava relacionada com alguma alteração do ciclo celular. Para isto foi analisado o ciclo celular dos parasitas a cada 24 h (Figura 40). Os parasitas *knockdown* para *Tb*GS e/ou cultivados em meio HMI-9 com a concentração reduzida de Gln (5µg/mL) apresentaram um aumento na população celular em G2/M e células poliplóides (parasitas com mais de dois núcleos que não completaram a divisão celular), como também uma diminuição da população celular em G1 e S, após 72 h de cultivo (Figura 40 C).

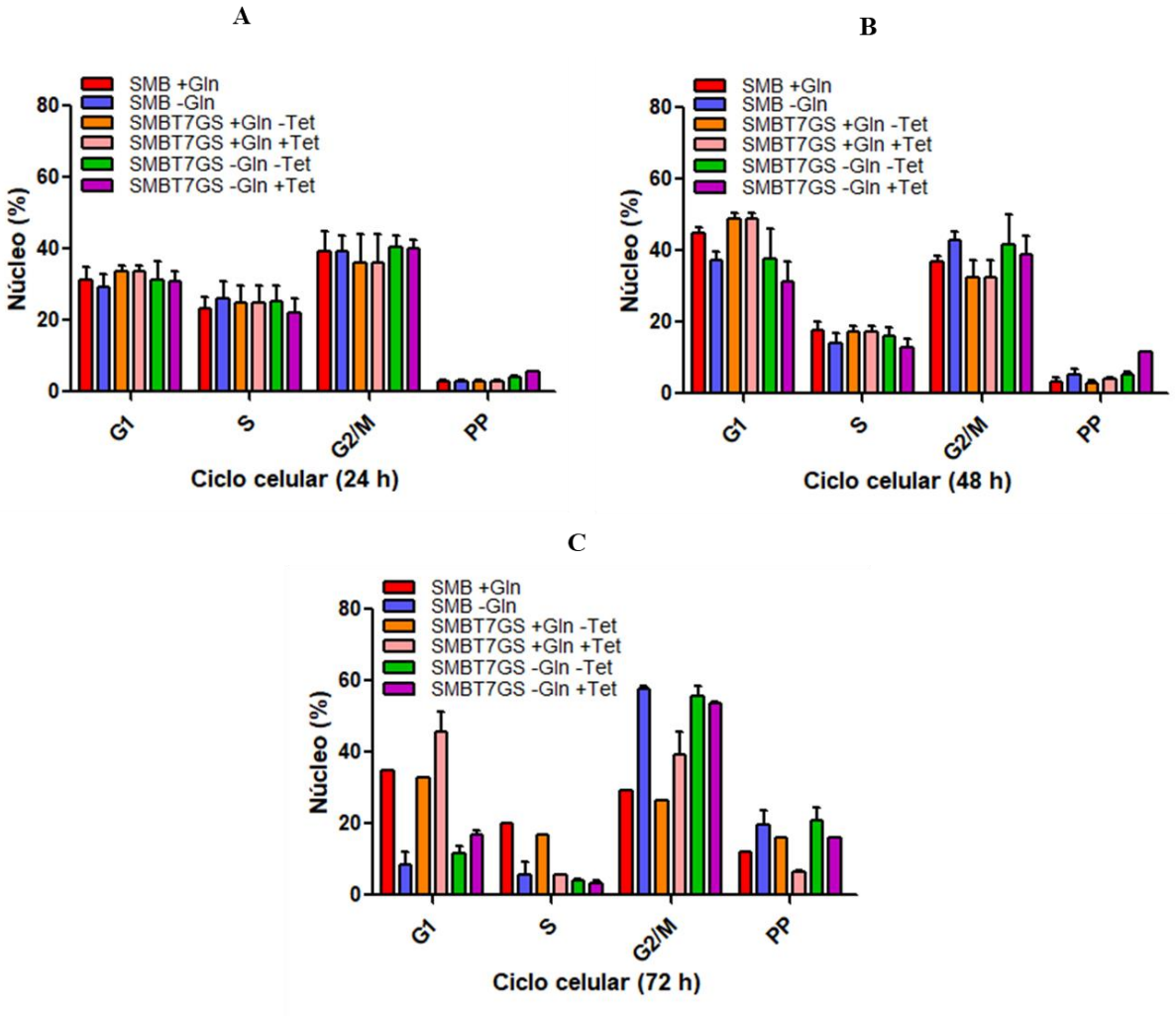

Figura 40 - Análise do ciclo celular em formas sanguícolas SMB cultivadas por 72 h. Os parasitas foram cultivados em meio HMI-9 (**+Gln = 584 µg/mL; -Gln = 5 µg/mL**), *knockdown* para *Tb*GS ou não pela adição de tetraciclina (2 µg/mL). A cada 24 h as células foram marcadas com iodeto de propídio e analisadas por citometria de fluxo. (**A)** 24 h; (**B)** 48 h; (**C)** 72 h. (n = 3)

Também foi analisado se os parasitas *knockdown* para *Tb*GS e/ou cultivados em meio com concentração reduzida de Gln apresentavam degradação de DNA, indicativo de morte celular. Os dados obtidos demonstram que após 48 h de cultivo os parasitas *knockdown* para *Tb*GS e cultivados em meio com menos Gln apresentaram um aumento na porcentagem de degradação de DNA (Figura 41). Além do mais, pode-se observar que com 72 horas de cultivo, todas as condições nas quais os parasitas foram mantidos em meio com concentração de Gln reduzida, independente de ser *knockdown* para *Tb*GS ou não, apresentaram um

aumento da porcentagem de degradação de DNA, sendo mais evidente na condição *knockdown* para *Tb*GS e cultivado em meio com uma concentração reduzida de Gln.

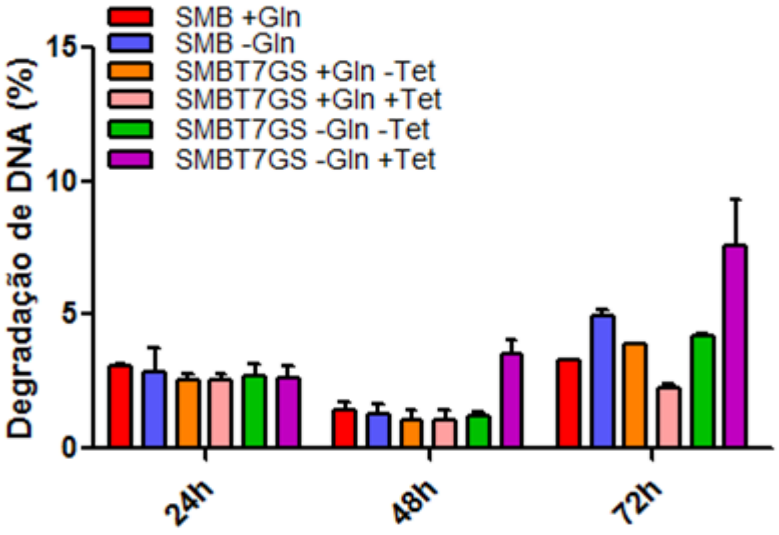

Figura 41 - Análise da degadação de DNA. Os parasitas foram cultivados em meio HMI-9 **(+Gln = 584 µg/mL; -Gln = 5 µg/mL)**, *knockdown* para *Tb*GS ou não pela adição de tetraciclina (2 µg/mL). A cada 24 h as células foram marcadas com iodeto de propídio e analisadas por citometria de fluxo. (n = 3)

Os resultados obtidos até aqui, em relação ao *T. brucei*, sugerem que a Gln e a enzima *Tb*GS são relevantes para a correta progressão do ciclo celular e consequetemente afetam a proliferação. Sabendo-se que formas sanguícolas de *T. brucei* apresentam um tempo de duplicação de ˜8 h, e que a densidade celular no cultivo aumenta em escala exponencial em um período de 24 h, apresentando o mesmo perfil de proliferação em diluições sucessivas, decidimos avaliar a dependência de *Tb*GS de parasitas em meio com redução gradual da concentração de Gln. Com este objetivo, os parasitas foram cultivados em uma densidade celular inicial de 1 x 10^5 mL^{-1}, e a cada 24 h foram contados em câmara de Neubauer, diluídos novamente para a densidade inicial, em meio com concentração de Gln diminuída de forma seriada a partir da presente na formulação inicial (a concentração de Gln foi diminuída de 584 a 0,5 µg/mL). Os parasitas mantidos em meio com a concentração padrão de Gln, proliferam normalmente ao longo do experimento (Figura 42), enquanto que os parasitas que foram

cultivados em condições de redução gradual da concentração de Gln, morreram após 48 h de cultivo em 0,5 µg/mL de Gln (Figura 42 A). No entanto quando a concentração padrão de Gln foi reestabelecida no meio, após o cultivo dos parasitas por 24 h em meio com 0,5 µg/mL de Gln, os mesmos recuperaram a capacidade proliferativa (Figura 42 B). Outro dado relevante observado é que os parasitas com o nível normal da enzima *Tb*GS não foram capazes de manter o perfil normal de proliferação quando cultivados em meio com redução da concentação de Gln, sugerindo que a enzima *Tb*GS não é capaz de suprir a necessidade de Gln dos parasitas.

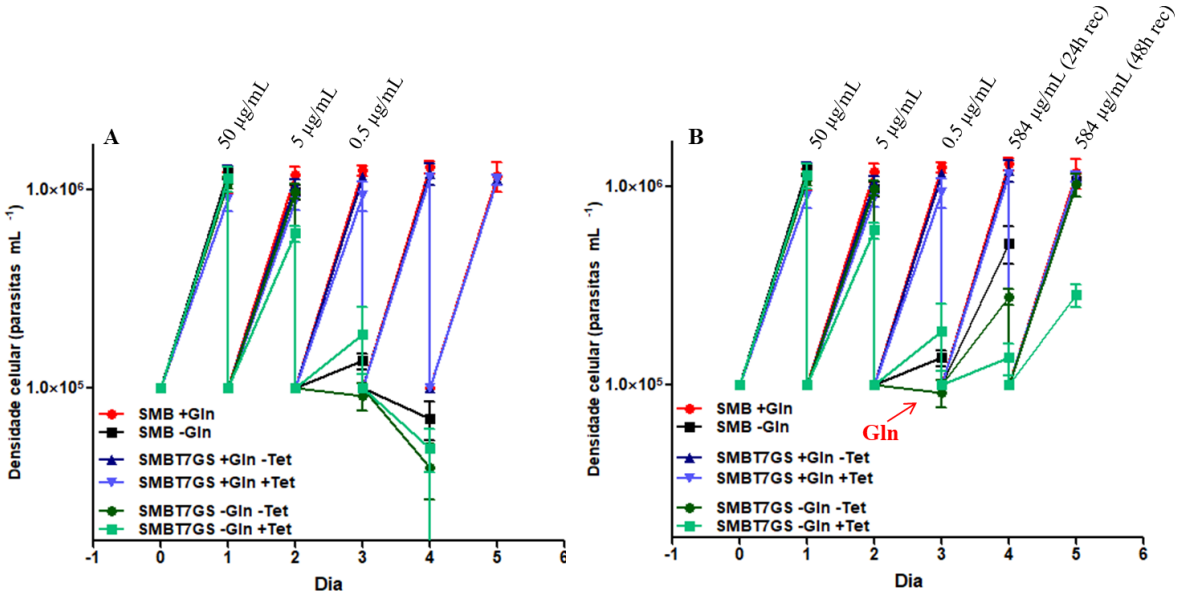

Figura 42 - Efeito da diminuição gradual da concentração de Gln na proliferação do parasitas. Os parasitas foram cultivados em meio HMI-9, *knckdown* para *Tb*GS ou não pela adição de tetraciclina (2 µg/mL) no meio. As células foram contadas a cada 24 h e diluídas novamente à concentração inicial de 1 x 10^5 mL^{-1}. Na condição **– Gln** a concentração foi diminuída 10% a cada di, de 584µg/mL a 0,5µg/mL. (**A**) curva sem a recuperação dos parasitas (**B**) recuperação dos parasitas com adição de Gln no meio de cultivo. (n = 4)

Os dados obtidos no experimento anterior demonstram que os parasitas cultivados em meio com redução gradual de Gln não mantêm o perfil padrão de proliferação. Esse comportamento pode ser resultante da parada no ciclo celular ou alternativamente, da morte dos parasitas. Para analisar se o padrão normal de ciclo celular estava alterado, os parasitas foram marcados com iodeto de propídio e o ciclo celular foi analisado por citometria de fluxo. Os parasitas cultivados em meio com redução gradual da concentração de Gln apresentaram uma diminuição do número de parasitas em fase G1 e S e um aumento do número de células em fase G2/M e poliploídes a medida que a concentração de Gln foi diminuida (Figura 43 B e C). No entanto, quando a Gln foi adicionada novamente no meio de cultivo, os parasitas iniciaram a recuperação do fenótipo normal, reestabelecendo o ciclo celular (Figura 43 D) e recuperando completamente o número de células em fase G1, S, G2/M e poliploídes após 48 h de cultivo em meio com a concentração padrão de Gln (Figura 43 E). Observa-se também, que os parasitas *knockdown* para a enzima *Tb*GS cultivados em meio com concentração padrão de Gln (SMBT7GS +Gln +Tet) apresentaram um perfil de divisão celular normal, semelhante ao controle (SMB +Gln). No entanto, nas condições em que a concentração de Gln foi diminuída gradualmente, tanto os parasitas com os níveis normais da enzima *Tb*GS (SMB; SMBT7GS -Tet) quanto os parasitas *knockdown* (SMBT7GS +Tet) apresentaram o mesmo perfil de ciclo celular, confirmando que a enzima *Tb*GS não produz a quantidade de Gln requerida pelo parasita. Interessantemente, apesar dos parasitas *knockdown* para *Tb*GS (SMBT7GS +Tet) não recuperarem a proliferação completamente em 48 h de recuperação em meio com Gln (Figura 42 B), recuperaram completamente o perfil normal do ciclo celular (Figura 43 E).

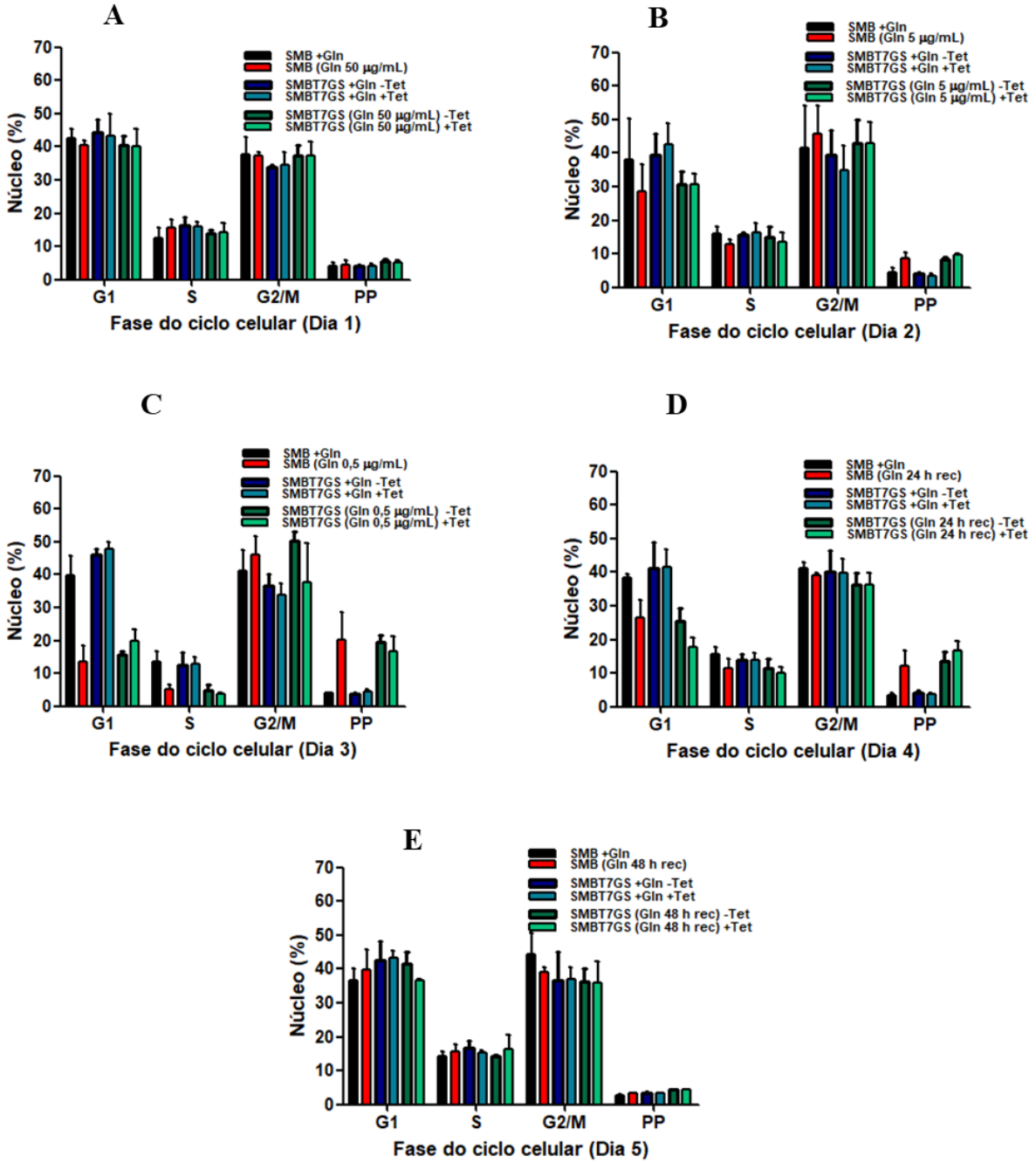

Figura 43 - Efeito da diminuição gradual da concentração de Gln no ciclo celular. Os parasitas foram cultivados em meio HMI-9, *knockdown* para *Tb*GS ou não. As células foram contadas a cada 24 h e diluídas novamente à densidade inicial de 1 x 10^5 mL^{-1}. Na condição **– Gln** a concentração foi diminuída a cada dia de 584µg/mL a 0,5µg/mL. (**A**) **Dia 1**: +Gln = 584 µg/mL; -Gln = 50 µg/mL; (**B**) **Dia 2**: +Gln = 584 µg/mL; -Gln = 5 µg/mL; (**C**) **Dia 3**: +Gln = 584 µg/mL; -Gln = 0,5 µg/mL; (**D**) **Dia 4** e (**E**) **Dia 5**: +Gln = 584 µg/mL; 24 h e 48 h de recuperação em meio com a concentração padrão de Gln, respectivamente. (n = 4)

Como demonstrado na análise anterior, independetemente dos níveis de expressão da *Tb*GS, os parasitas cultivados em meio com redução gradual da concentração de Gln, apresentam uma mudança no perfil do ciclo celular. Esse dado pode ser melhor observado na sobreposição dos histogramas da citometria de fluxo para as condições de cultivo SMB +Gln e SMB -Gln (Figura 44). Os picos correspondentes às fases do ciclo celular se deslocam a medida que a concentração de Gln diminui no meio de cultivo, e voltam a sobrepor completamente após 48 h de recuperação em meio com a concentração padrão de Gln.

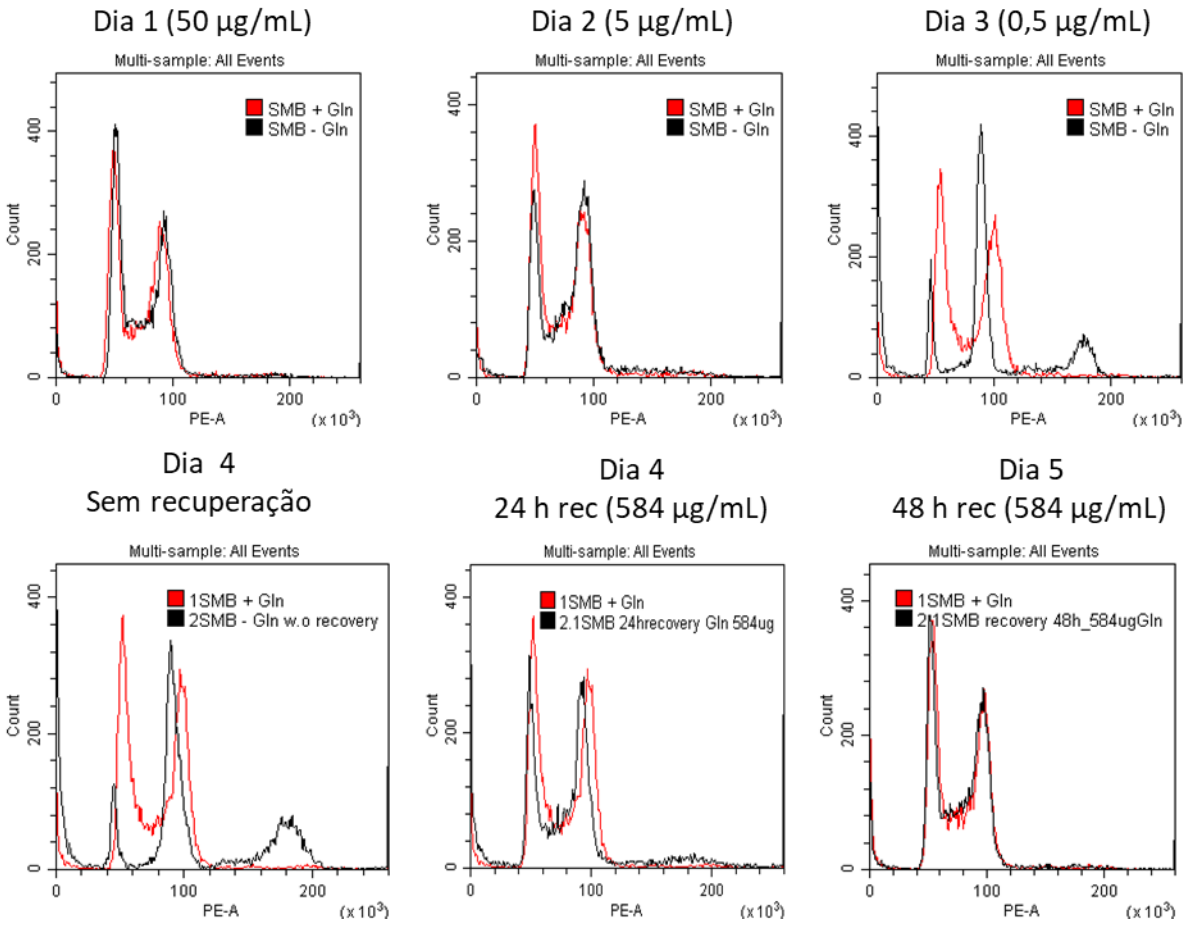

Figura 44 - Sobreposição dos histogramas correspondentes a cada dia de análise do ciclo celular. Parasitas cultivados em meio com a concentração padrão de Gln (linha vermelha) e parasitas cultivados em meio com redução gradual de Gln (584 µg/mL a 0,5 µg/mL) e recuperados pela adição de Gln no meio (linha preta).

Os dados obtidos confirmam que a mudança no perfil da proliferação dos parasitas é uma consequência das alterações no padrão do ciclo celular, visto que aumenta o número de parasitas em fase G2/M e poliplóides. Esses mesmos dados mostraram também que a enzima *Tb*GS, apesar de ativa, não é capaz de produzir a quantidade de Gln requerida pelo parasita, o que o torna completamente dependente da concentração de Gln no meio extracelular. Com base nestas informações, foi considerado relevante avaliar se a recuperação dos parasitas seria dependente da concentração de Gln no meio de cultivo. Com esta finalidade, os parasitas foram cultivados em meio sem Gln por 24 h ou em meio com a concentração padrão de Gln, como controle. Após 24 h de cultivo foram contados em câmara de Neubauer e analisados por citometria de fluxo para avaliar ciclo celular, degradação de DNA e número de células em necrose. Após o cultivo dos parasitas em meio sem Gln, o número de parasitas poliploides foi ˜20%, enquanto que no controle foi observado apenas ˜4% (Figura 45 A e C). Em relação à morfologia desses parasitas, observamos que quando cultivados em meio sem Gln apresentam mais de um flagelo (Figura 45 B). Estes dados confirmam que nessas condições os parasitas não conseguem completar a divisão celular. Em relação à degradação de DNA e à integridade de membrana, não há diferença entre os parasitas controle (cultivados na presença de Gln) e os parasitas que foram cultivados em meio sem Gln por 24 h (Figura 45 D e E). Esses dados demonstram que os parasitas têm possibilidade de recuperação, visto que não apresentam características de morte celular.

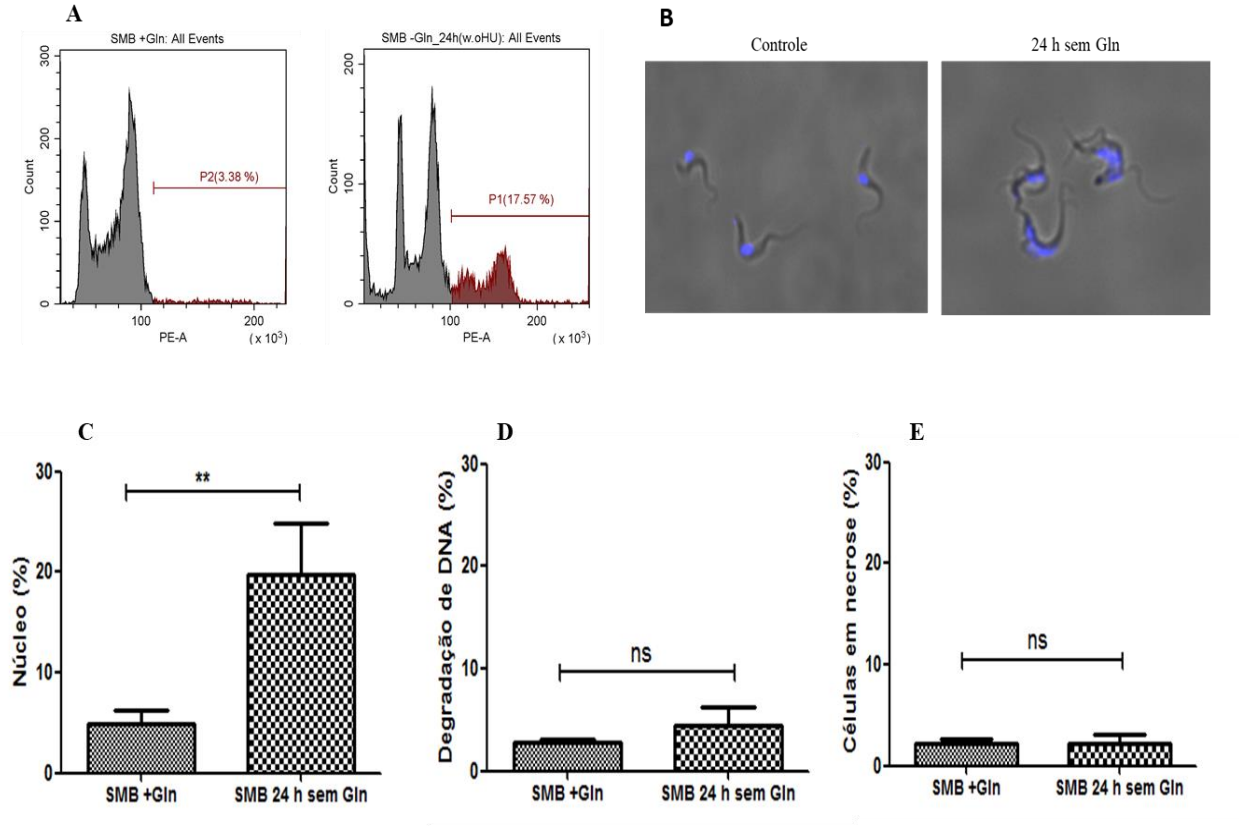

Figura 45 - Análise de ciclo celular, degradação de DNA e necrose. Os parasitas foram mantidos em meio com Gln (controle) ou meio sem Gln por 24 h. Após esse período os parasitas foram marcados com iodeto de propídio e analisados por citometria de fluxo. (**A**) Histograma da análise por citometria de fluxo. (**B**) Fotos de microscopia representativa dos parasitas controle e cultivados em meio sem Gln por 24 h. (**C**) Porcenteagem de células poliplóides. (**D**) Degradação do DNA. (**E**) Integridade da membrana dos parasitas. Teste *T*, valor de P < 0,05. (n = 3)

Uma vez analisado o fenótipo dos parasitas após o cultivo em meio sem Gln, os mesmos foram transferidos para o meio de cultivo com diferentes concentrações de Gln, com o objetivo de avaliar se a recuperação desses parasitas dependeria da concentração de Gln no meio extracelular. Os resultados obtidos demonstram que nas primeiras 24 h de recuperação, a proliferação dos parasitas é dependente da concentração de Gln no meio externo (Figura 46). Também foi observado que após 48 h de recuperação, apenas os parasitas que foram mantidos em meio com 0,5 µg de Gln/mL não recuperaram o perfil normal de proliferação. Além do mais, pode ser observado que a recuperação depende especificamente da presença de Gln, visto que todos os outros metabólitos permaneceram em concentrações normais no meio de

cultivo. A adição extra de Glu (substrato para a biossíntese de Gln) também não foi capaz de reverter a parada da proliferação dos parasitas.

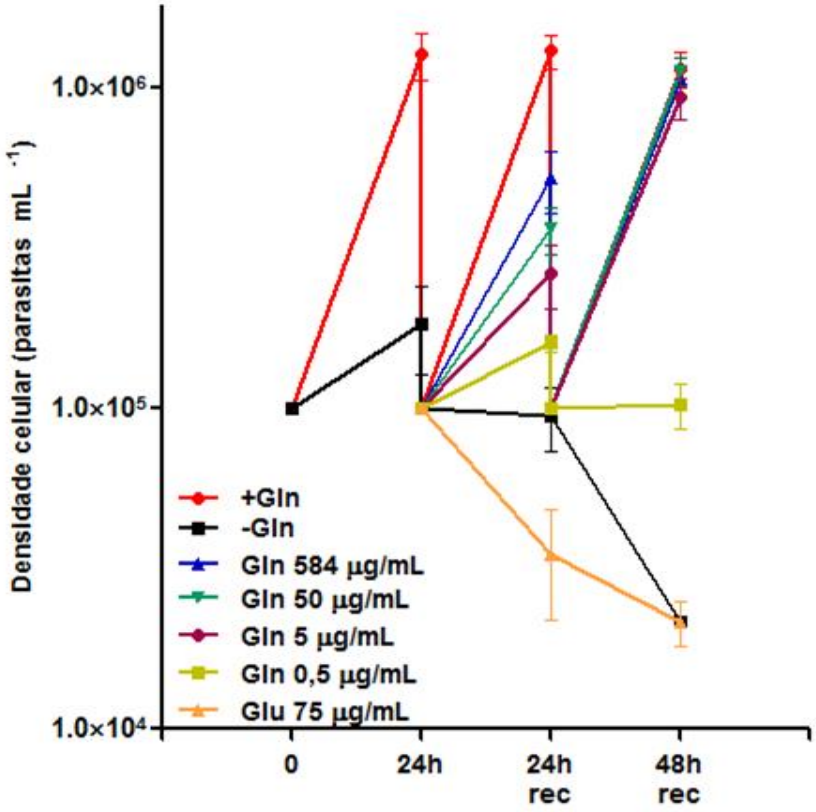

Figura 46 - Recuperação dos parasitas em diferentes concentrações de Gln. Os parasitas foram cultivados em meio sem Gln por 24 h e após esse período foram recuperados em diferentes concentrações de Gln (584 a 0,5 µg/mL) ou na presença de Glu (75 µg/mL) por 24 e 48 h. A cada 24 h os parasitas foram contados em câmara de Neubauer e diluídos novamente à concentração inicial de 1 x 10^5 células/mL. (n = 3)

Com o intuito de avaliar se o perfil do ciclo celular na recuperação também é proporcionalmente dependente da concentração de Gln externa, os parasitas foram marcados com iodeto de propídio e analisados por citometria de fluxo. O número de células poliplóides diminuiu ao longo do período de recuperação na condição em que os parasitas foram mantidos em Gln nas concentrações de 584 µg/mL; 50 µg/mL e 5 µg/mL. Os parasitas que foram mantidos em 0,5 µg/mL de Gln, 75 µg/mL de Glu ou mesmo em meio sem Gln, apresentaram um aumento do número de células poliplóides em função do tempo (Figura 47 A e B), demonstrando que a retomada do ciclo celular também depende da concentração externa de Gln durante a recuperação.

A análise dos parâmetros relacionados à morte celular (degradação de DNA e integridade de membrana) demonstrou que a concentração de Gln no meio externo também é importante para manutenção da viabilidade dos parasitas (Figura 47 C e D), visto que quando mantidos em 0,5 µg/mL de Gln, 75 µg/mL de Glu ou meio sem Gln, os parasitas apresentaram um aumento do número de células positivas para necrose e degradação de DNA. Estes dados demonstram que nessas condições de cultivo, os parasitas não retomam o perfil normal de proliferação devido ao fato de não conseguirem completar a divisão celular, como também não mantêm a viabilidade celular, levando os mesmo a morte.

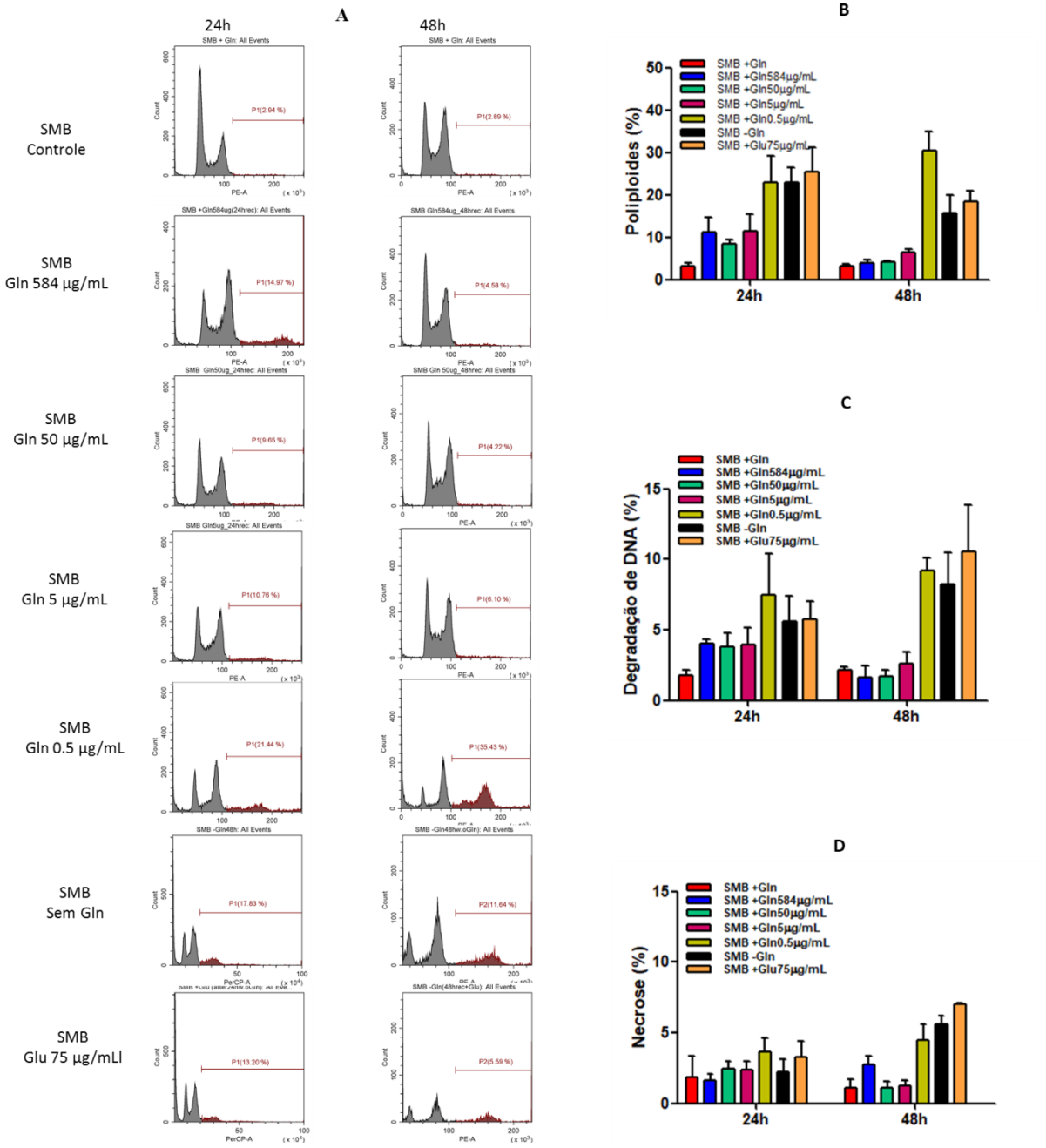

Figura 47 - Análise do ciclo celular, degradação de DNA e necrose em parasitas recuperados por 24 e 48 h em diferentes concentrações de Gln. Os parasitas foram cultivados em meio sem Gln por 24 h e após esse período foram recuperados em diferentes concentrações de Gln por 24 e 48 h, em cada período de recuperação os parasitas foram analisados por citometria de fluxo. (**A)** Histograma da análise de ciclo celular. (**B)** Representação gráfica do número de células poliplóides em cada condição de cultivo. (**C)** Representação gráfica da manutenção da integridade do DNA nas diferentes condições. (**D)** Representação gráfica da análise da integridade de membrana dos parasitas recuperados por 24 e 48 h nas diferentes condições de cultivo. (n = 3)

3.2.6 Fase do ciclo celular para a qual a Gln é crítica

Os dados apresentados demonstraram que Gln é importante para a correta progressão do ciclo do celular, no entanto não estava claro em qual fase do ciclo celular, G1, S ou G2/M, a Gln seria relevante. Para analisar mais detalhadamente este envolvimento da Gln no ciclo celular, consideramos importante sincronizar o ciclo celular dos parasitas. Com esta finalidade, os parasitas foram tratados com hidroxiurea (HU) para sincronizar o ciclo celular em fase G1. Após 2 horas de tratamento, a maioria dos parasitas estava em fase G1 (Figura 48). Após a confirmação da sincronização o tratamento com HU foi interrompido e a cultura foi dividida em duas partes: uma foi cultivada em meio com Gln e a outra parte em meio sem Gln. Após 48 h de cultivo em meio sem Gln, a análise por citometria de fluxo demonstrou que 23% dos parasitas eram poliplóides (Figura 48, 48 h), ou seja, os parasitas passaram da fase G1 para S e G2/M, mas não completaram a divisão celular na ausência de Gln. Estes dados demonstram que Gln é fundamental para o processo de citocinese dos parasitas. Também pode ser observado que, confirmando os resultados anteriores, quando a Gln foi adicionada novamente no meio de cultivo os parasitas retomaram a correta progressão do ciclo celular, enquanto que os parasitas que continuaram em meio sem Gln, morreram 72 h após o tratamento com HU (Figuras 48 e 49).

A proliferação dos parasitas também foi acompanhada a cada 24 h por contagem em câmara de Neubauer (Figura 49). Os parasitas que foram mantidos em meio sem Gln não proliferaram, no entanto quando a Gln foi adicionada novamente no meio de cultivo, os parasitas retomaram o padrão normal de proliferação, recuperando completamente a capacidade proliferativa após 72 h da adição de Gln. Confirmando assim os resultados anteriores e demonstrando que a participação da Gln se dá efetivamente em processos relacionados com a citocinese.

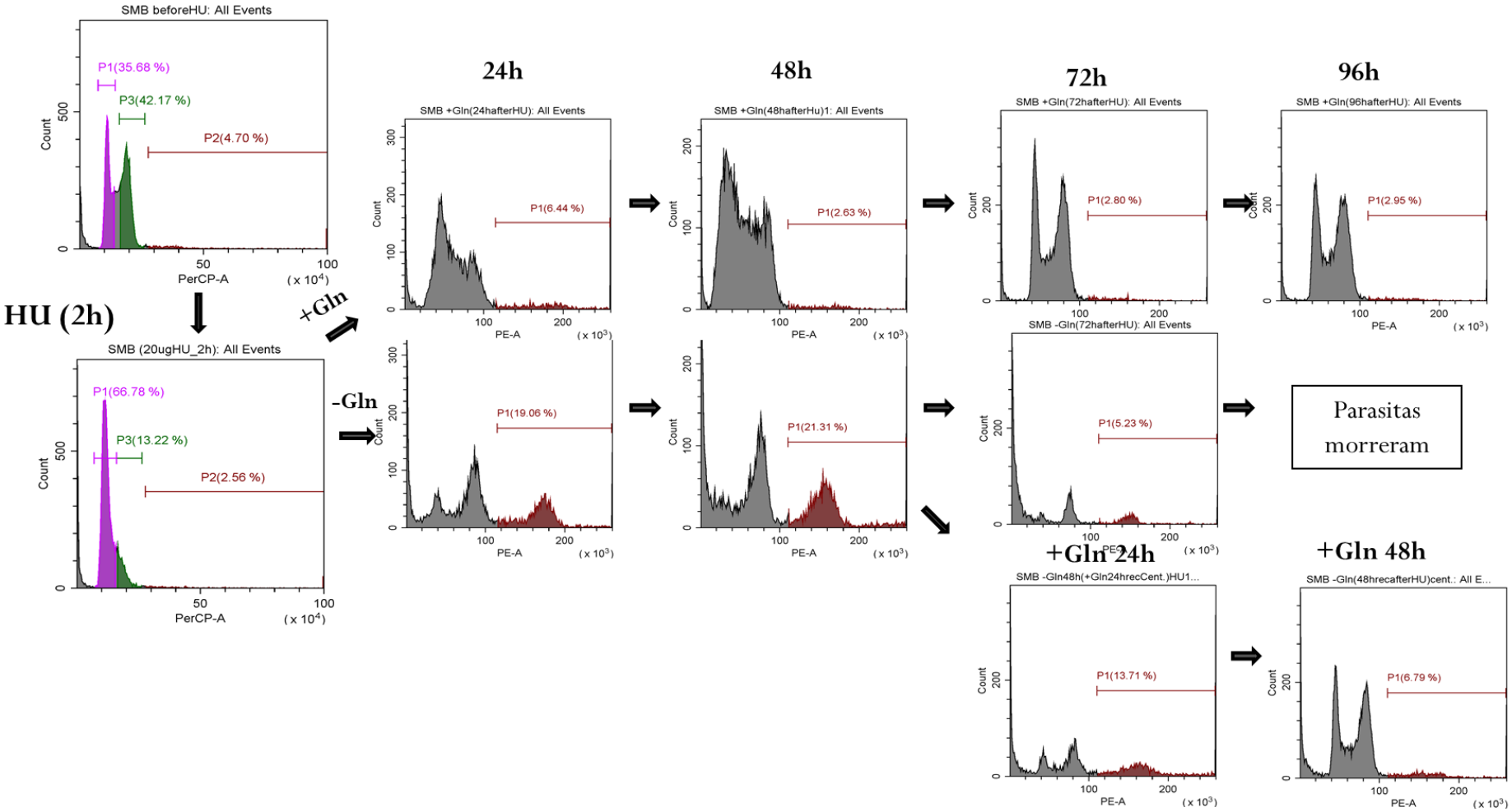

Figura 48 - Análise do ciclo celular em parasitas tratados com hidroxiurea. Os parasitas foram tratados com hidroxiurea (HU) por 2 h, após esse período o tratamento foi removido e a cultura foi dividida em duas partes: uma mantida em meio com Gln e a outra mantida em meio sem Gln. Após 48 h de cultivo em meio sem Gln, novamente a cultura foi dividida em duas, uma parte continuou sendo mantida em meio sem Gln e foi adicionado Gln na outra parte. Os parasitas foram marcados com iodeto de propídio e analisados por citometria de fluxo nos tempos indicados.

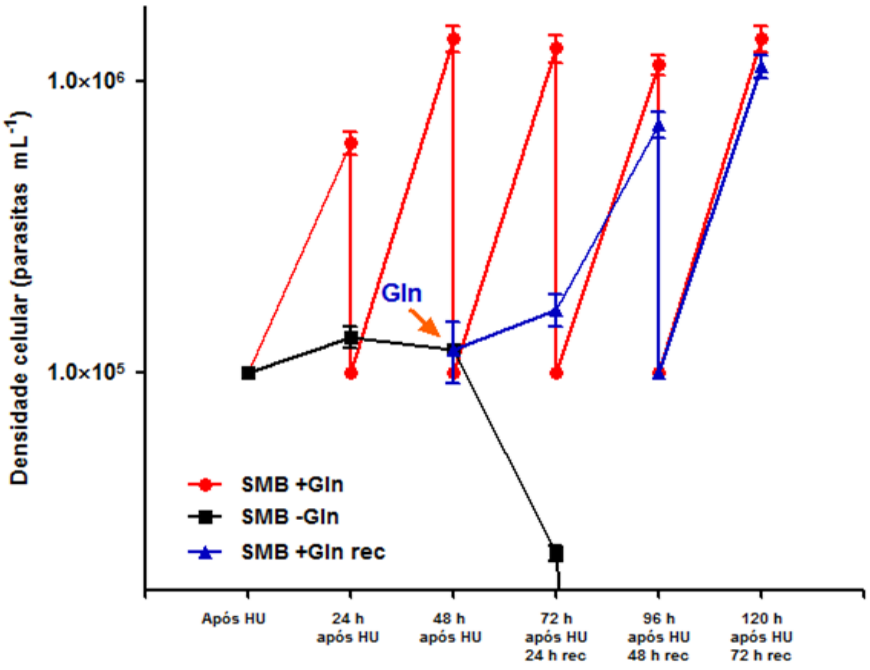

Figura 49 - Proliferação dos parasitas após o tratamento com hidroxiurea. Os parasitas foram tratados com HU por 2 h e após o tratamento foram cultivados em meio com Gln ou sem Gln. Após 48 h de cultivo em meio sem Gln, os parasitas foram novamente cultivados em meio com Gln. A contagem dos parasitas foi feita em câmara de Neubauer a cada 24 h. (n = 3)

Confirmando os resultados anteriores, também foi demonstrado que na ausência de Gln aumenta o número de células poliploides e após a adição de Gln no meio de cultivo a porcentagem de células poliplóides voltam ao padrão normal no cultivo (Figura 50 A). A análise dos parâmetros relacionados à morte celular, também confirma os resultados anteriores: aumento da degradação do DNA na ausência de Gln, a qual é revertida ao padrão normal após a adição de Gln no meio (Figura 50 B). Ao avaliar a integridade de membrana dos parasitas, os dados demonstram que nas primeiras 48 h de cultivo em meio sem Gln os parasitas mantêm a integridade de membrana, no entanto após 72 h de cultivo em meio sem Gln o número de células positivas para necrose aumenta de 4% em 48 h, para 32 % em 72 h (Figura 50 C). Também foi mostrado que a adição de Gln mantém a integridade da membrana dos parasitas, confirmando os resultados apresentados anteriormente.

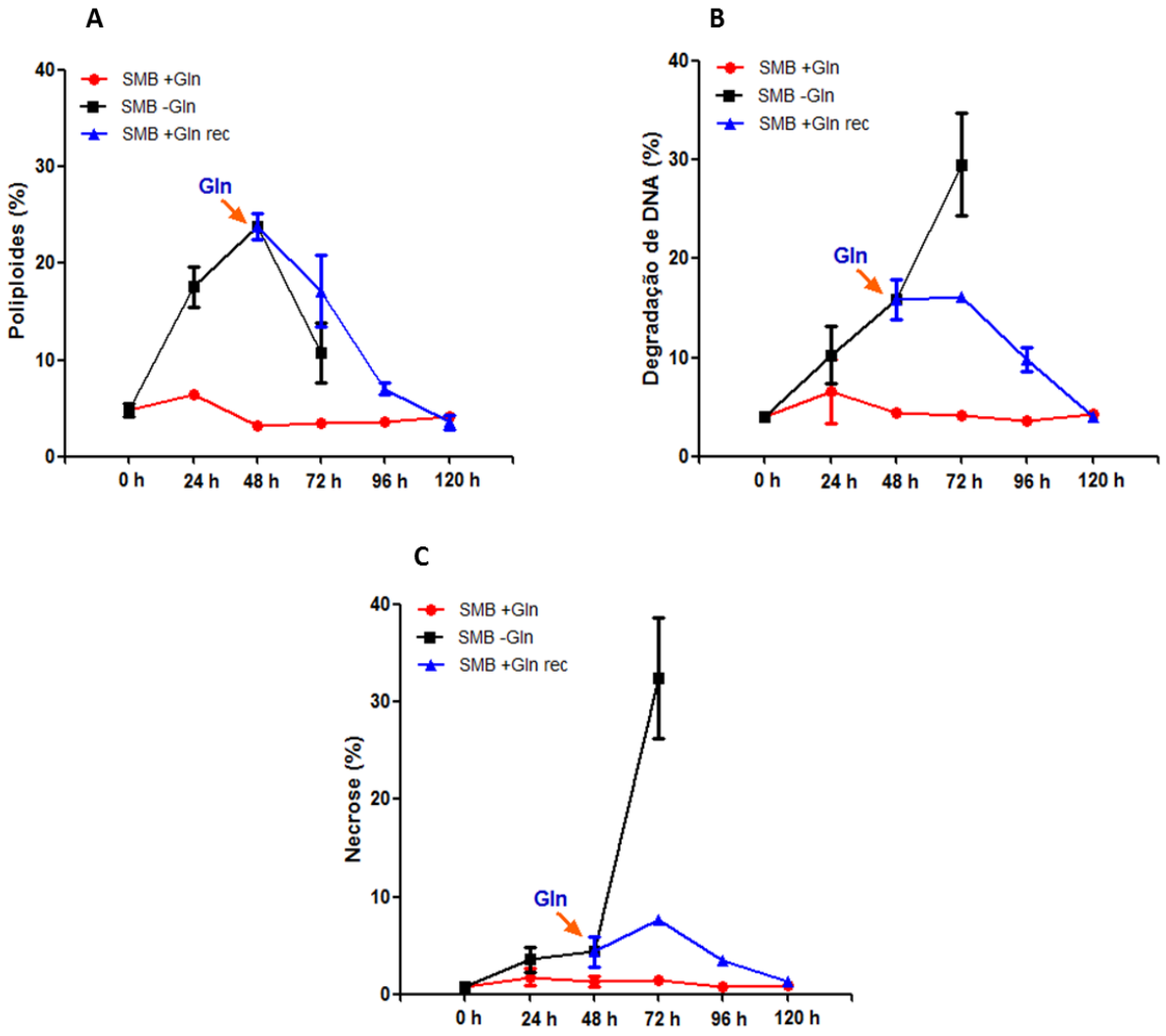

Figura 50 - Análise do número de parasitas poliplóides, degradação de DNA e necrose após tratamento com hidroxiurea. Os parasitas foram tratados com hidroxiurea por 2 h e após esse período parte da cultura foi mantida em meio sem Gln e a outra parte em meio com Gln (controle). (**A**) Porcentagem de células poliploídes. (**B**) Degradação de DNA e (**C**) Células positivas para necrose. (n = 3)

3.2.7 Análise da glutamilação de tubulina

Os resultados apresentados demonstram que a Gln estaria envolvida com processos relacionados com a progressão da citocinese. Na literatura está descrito que determinadas modificações pós-traducionais são importantes para o correto posicionamento dos microtúbulos no flagelo e consequentemente para a progressão do ciclo e divisão celular em diferentes células como *Tetrahymena thermophila*, espermatozóides e neurônios (Janke, Rogowski et al., 2008; Wloga, Rogowski et al., 2008; Suryavanshi, Edde et al., 2010). Entre essas modificações está a glutamilação da tubulina, uma modificação pós-traducional importante para o correto arranjo dos microtúbulos no flagelo, interação com proteinas associadas aos microtúbulos e para a motilidade das células. Já foi descrito que os microtúbulos dos tripanossomatídeos são extensivamente glutamilados (Schneider, Plessmann et al., 1997; Casanova, de Monbrison et al., 2015). Levando em conta os resultados apresentados, consideramos relevante avaliar a possível participação da Gln no processo de glutamilação de tubulina em formas sanguícolas de *T. brucei*. Para isso foi utilizado o anticorpo GT335 que é específico para o reconhecimento de tubulina poliglutamilada. Os parasitas foram cultivados em meio sem Gln por 24 h e recuperados por 48 h em meio com a concentração padrão de Gln, parasitas cultivados em meio de cultivo padrão foram utilizados como controle. O nível de glutamilação de tubulina nos parasitas cultivados nas diferentes condições foi avaliado através da técnica de *western blotting* (Figura 51 A e B) e microscopia de fluorescência (Figura 51 C), utilizando o anticorpo específico mencionado anteriormente. Como demonstram os resultados obtidos, quando os parasitas foram mantidos por 24 h em meio sem Gln observou-se uma diminuição do nível de tubulina glutamilada em comparação com os parasitas mantidos em meio suplementado com Gln (controle) e foram capazes de recuperar os níveis normais de glutamilação após serem cultivados novamente em em meio com a concentração padrão de Gln.

Assim, demonstramos que a Gln participaria da modificação pós-traducional de tubulina, importante para a estrutura do arranjo de microtúbulos da célula, interação dos microtúbulos com proteínas associadas e mobilidade das células, sugerindo que parasitas deficientes em tubulina glutamilada possuem um ciclo celular interrompido pela incapacidade de completar a citocinese.

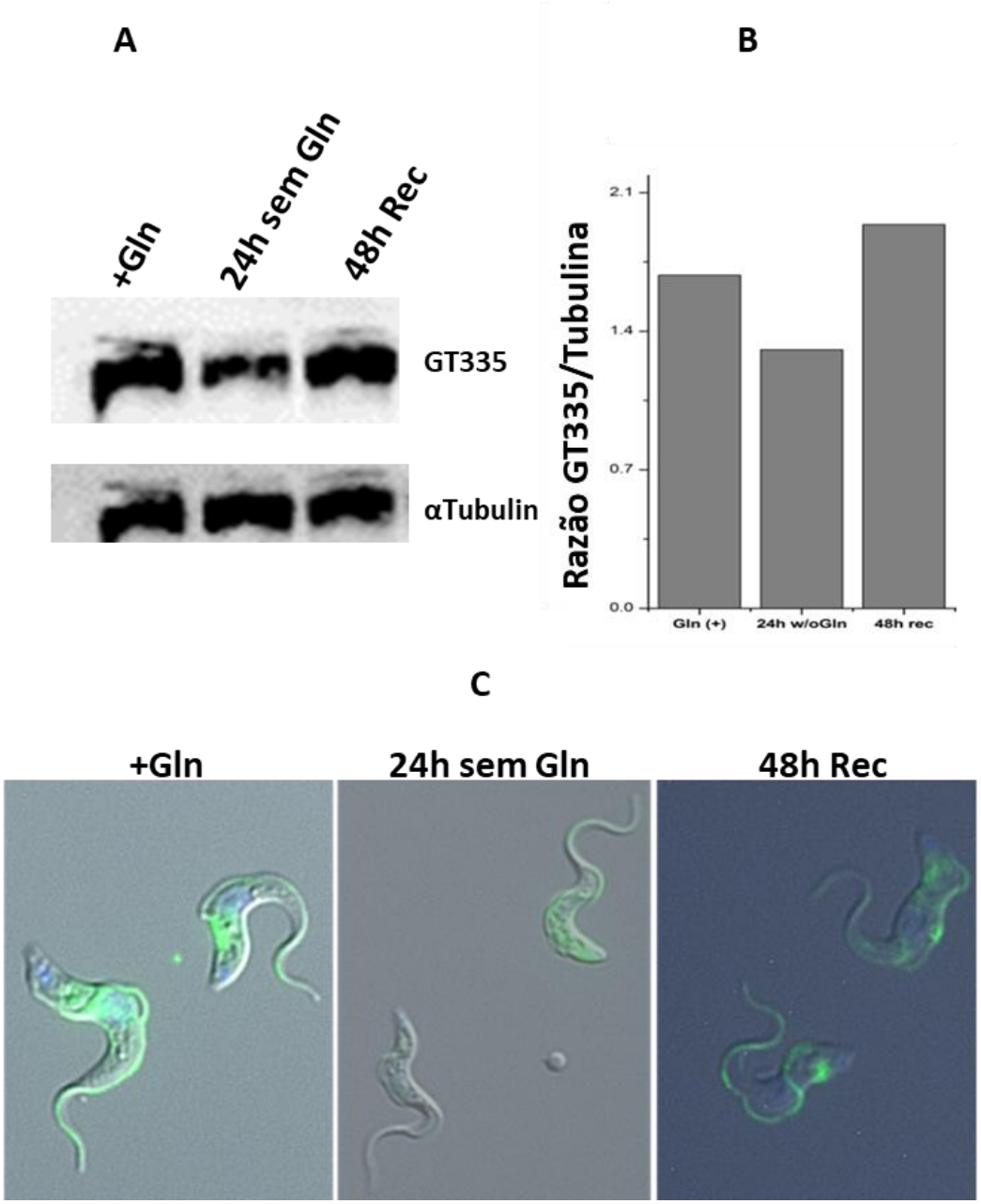

Figura 51 - Análise da glutamilação de tubulina. Os parasitas foram cultivados em meio HMI-9 com Gln como controle e sem Gln por 24 h. Após o cultivo dos parasitas em meio sem Gln, os mesmos foram recuperados em meio com Gln por 48 h. **A**- western blot. **B**- Desintrometria de bandas. **C**- imunofluorescência. O anticorpo GT335 foi utilizado para analisar os níveis de tubulina glutamilada e DAPI para a marcação de núcleo e cinetoplasto.

CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO

4.1 *T. cruzi*

4.1.1 Transporte de Gln e metabolismo de aminoácidos em T. cruzi

O *T. cruzi* pode obter aminoácidos pela sua incorporação a partir do meio extracelular por meio dos sistemas de transporte na membrana plasmática (Silber, Colli et al., 2005), e em alguns casos pela sua biossíntese. Devido à relevância dos aminoácidos ao longo do ciclo de vida do *T. cruzi*, já foram descritos sistemas de transporte para vários destes metabólitos (Tabela 2).

O transporte de Gln, caracterizado neste trabalho, apresentou uma dependência linear em relação ao tempo de incorporação, mas não atingiu um ponto de saturação do meio intracelular, sugerindo que na janela de tempo estudada (3 h), a velocidade que o parasita consome a Gln é maior do que a velocidade da incorporação. Análises *in silico* (www.tritrypsdb.org, acesso em julho 2017) e dados experimentais do nosso grupo demonstram que em *T. cruzi* várias reações metabólicas podem usar Gln como substrato. Quando comparados os parâmetros cinéticos determinados para outros sistemas de transporte já descritos, com os obtidos para o transporte da Gln, observa-se que o valor de K_m neste caso é similar ao que foi obtido para o transporte de baixa afinidade da Pro (Silber, Tonelli et al., 2002) e para o transporte dos aminoácidos ramificados (Manchola, Rapado et al., 2015), sugerindo que a Gln é incorporada por um sistema de transporte de baixa afinidade. Em relação aos valores de V_{max}, verificou-se que a Gln é transportada a uma velocidade maior que a Pro, e similar a velocidade de transporte dos aminoácidos ramificados. A dependência do transporte em relação à temperatura é um parâmetro relevante em *T. cruzi*, visto que o parasita passa por mudanças de temperatura importantes ao longo do seu ciclo de vida. Como esperado, o tansporte de Gln aumentou de forma aproximadamente linear com a temperatura. Porém, surpreendentemente, apresentou o máximo de atividade a 45 °C, o que sugere que o sistema de transporte de Gln é particularmente estável.

Aminoácido	K_m (mM)	V_{max} (nmoles/min*2x10^{7}cells)	Força motriz	Atividade no ciclo de vida	Ref.
Arginina	0.0042 (A. A.)	0.032	Independente de Na^+ e H^+	ND	(Pereira, Alonso et al., 1999)
	0.35 (B. A.)	0.194	H^+	E > T	(Canepa, Silber et al., 2004)
Prolina	0.31 (A. A)	0.012	H^+	ND	(Silber, Tonelli et al., 2002)
	1.36 (B.A.)	0.065	ATP	ND	(Silber, Tonelli et al., 2002)
Aspartato	0.032	0.0068	H^+	E = T	(Canepa, Bouvier et al., 2005)
Glutamato	0.30	0.096	H^+	E > T	(Silber, Rojas et al., 2006)
Cysteina	0.0495	0.026	H^+	ND	(Canepa, Bouvier et al., 2009)
Lisina	0.023	0.0048	H^+	ND	(Inbar, Canepa et al., 2012)
GABA	0.33	0.077	Na^+	E = TM	(Galvez Rojas, Ahn et al., 2015)
Leucina	1.07	0.94	H^+/ATP	ND	(Manchola, Rapado et al., 2015)
Isoleucina	0.47	0.16			
Valina	1.96	0.33			
Histidina	0.12	0.24	ATP	ND	(Barison, Damasceno et al., 2016)
Glutamina	1.29	0.36	H^+/ATP	E > Ei > A = T = TM	Este trabalho

Tabela 2 - Resumo dos sistemas de transporte de aminoácidos já descritos em *T. cruzi**.

*Todos os sistemas de transporte foram caracterizados em formas epimastigotas, em alguns casos, também foi medida a atividade do transportador em outros estágios do ciclo de vida. Sendo este trabalho, a primeira descrição da atividade do transportador em todos os estágios do ciclo de vida do *T. cruzi*. (**A.A**= alta afinidade; **B.A**. = baixa afinidade; **E**: epimastigotas; **Ei**: epimastigota intracelular; **A**: amastigota; **T**: tripomastigota derivado de cultura; **TM**: tripomastigota metacíclico; **ND**: não descrito).

Em mamíferos, a Gln pode ser incorporada por vários sistemas diferentes, sendo transportada principalmente por simporte Na^+/Gln, os quais apresentam diferentes mecanismos e especificidade (Soeters,Grecu, 2012; Scalise, Pochini et al., 2016). Diferente dos sistemas de transporte em mamíferos, o transporte de Gln em *T. cruzi* não é dependente nem de Na^+ nem de K^+ porém, foi influenciado pela concentração extracelular de H^+, o que pode explicar uma relativa sensibilidade ao pH. O fato do desacoplamento do gradiente de H^+ da membrana citoplasmática ter diminuído a atividade do transportador de Gln confirmou essa possibilidade. É interessante observar que o sistema de transporte de Gln é versátil, capaz de funcionar em diferentes condições de pH, o que o faz compatível com os diferentes ambientes pelos quais *T. cruzi* circula durante seu ciclo biológico natural. O parasita deve sobreviver em ambientes com diferentes pH (por exemplo no tubo digestivo do inseto vetor o pH é ˜5,5 (Contreras, Salles et al., 1985), no lisossomo da célula de mamífero (pH ˜4,5; ver em (Weisz, 2003)) e no citosol da célula de mamífero (pH ˜7,3; ver em (Llopis, McCaffery et al., 1998)). Em *T. cruzi*, Gln foi transportada em todos os pHs avaliados (5,0 - 7,5).

Alguns dos transportadores de metabólitos já descritos para *T. cruzi* são dependentes dos níveis de ATP intracelular, como o transporte de Pro e His (Silber, Tonelli et al., 2002; Barison, Damasceno et al., 2016). Neste trabalho foi demonstrado que o transporte de Gln também é dependente da concentração de ATP intracelular, mas não é necessariamente da funcionalidade mitocondrial: o ATP produzido por fosforilação em nível de substrato, pela glicólise, também é capaz de manter o transporte de Gln. Esse resultado pode explicar também o fato de após 3 h de incubação em PBS o transporte de Gln ter sido reduzido significativamente, sugerindo que a diminuição da incorporação de Gln, pode estar relacionada ao baixo nível de energia da célula. Uma vez incorporada na célula, a Gln pode ser derivada a uma quantidade de destinos metabólicos, nos quais Glu é um dos produtos resultantes, que pode ser oxidado para sintetizar ATP. Essa possibilidade foi confirmada pela avaliação dos níveis de ATP intracelular do parasita incubado na presença de Gln como única fonte de energia. O resultado obtido demonstrou que Gln é capaz de manter os níveis de ATP de forma similar a Pro, aminoácido já descrito como importante para o metabolismo energético do parasita (Paes, Suarez Mantilla et al., 2013).

Os sistemas de transporte de aminoácidos em *T. cruzi* apresentam diferentes especificidades, portanto nos interessou avaliar a especificidade do sistema de transporte de Gln. A incorporação de Gln não foi inibida pela presença de diferentes análogos estruturais da Gln, sugerindo que há diversos aspectos estruturais da molécula que podem ser importantes para a interação transportador-substrato. Vários aminoácidos também foram avaliados como

possíveis inibidores do transporte de Gln: o Glu, a forma deaminada da Gln; o Asp e a Asn, dois aminoácidos que apresentam função similar ao par Glu/Gln; Ala, outro aminoácido que também pode ser utilizado na detoxificação de amônia pela célula; Arg e His, que são metabolicamente relacionados com a Gln. Além dessa relação entre os aminoácidos selecionados e a Gln, eles também são representativos de diferentes grupos bioquímicos: aminoácidos neutros (Ala), básicos (Asn, Arg e His) e ácidos (Glu e Asp). Os dados obtidos demonstram que o transporte de Gln não foi inibido em nenhuma das condições avaliadas, sugerindo que Gln é transportada por um sistema altamente específico. Dentre os sistemas de transporte de aminoácidos já caracterizados em *T. cruzi*, nos quais a Gln foi avaliada como possível inibidor, apenas o transporte de Glu foi inibido (~75%) na presença de um excesso de Gln (Silber, Rojas et al., 2006). Considerando esse dado, pode-se inferir que Gln também pode ser incorporada pelo mesmo transportador do Glu, no entanto o parasita apresenta um transportador específico para Gln.

O *T. cruzi*, como já mencionado anteriormente, é submetido a várias mudanças ambientais ao longo do seu ciclo de vida, e necessita se adaptar a diferentes condições de estresse, como nutricional e oxidativo. Para sobreviver nestas condições o parasita modifica o seu metabolismo, respondendo eficientemente as condições de disponibilidade de nutrientes. Por exemplo, o transporte de Glc apresenta uma atividade máxima (quando comparado aos outros estágios no hospedeiro mamífero) nas formas tripomastigotas presentes na corrente sanguínea dos hospedeiros mamíferos, ambiente rico em Glc (Silber, Tonelli et al., 2009). Por sua vez, o transporte de Pro é aumentado no estágio epimastigota intracelular, que está presente em um ambiente pobre em Glc, e com Pro disponível (Tonelli, Silber et al., 2004; Silber, Tonelli et al., 2009). A síntese de Gln também pode ser interpretada dentro desse contexto, e é outro exemplo da adaptação do metabolismo do *T. cruzi* durante o seu ciclo de vida. Recentemente foi demonstrado pelo nosso grupo, que o parasita possui a enzima *Tc*GS ativa, e da mesma forma que ocorre com o transporte de Gln, também ela é regulada ao longo do ciclo de vida do parasita (Crispim et al[*].). A *Tc*GS converte Glu em Gln, utilizando ATP e NH_4^+ como co-substratos. Esta atividade participa da detoxificação de NH_4^+, que é produzida pela degradação dos aminoácidos (Crispim et al[*].). *T. cruzi* não possui o ciclo da ureia funcional (Yoshida,Camargo, 1978), o que leva a hipotetizar a relevância de sistemas alternativos para a detoxificação do NH_4^+, como seria o caso da *Tc*GS, principalmente para as

[*] Crispim, M.; Damasceno, F.S.; Hernández, A.; Barisón, M.J.; Sauter, I.P.; Pavani, R.S.; Moura, A.S.; Pral, E.M.F.; Cortez, M.; Elias, M.C.; Silber, A.M.; The glutamine synthetase of *Trypanosoma cruzi* is requerid for its resistance to ammonium accumulation and evasion of the parasitophorous vacuole during host-cell infection. Submitted.

formas que utilizam a degradação dos aminoácidos como principal (senão única) fonte de energia. A enzima *Tc*GS apresenta o máximo de expressão e atividade nas formas amastigotas (Crispim et al*.), as quais baseiam seu metabolismo energético dentre outros, no consumo de aminoácidos (Silber, Tonelli et al., 2009). Esses dados sugerem que especialmente nesse estágio do parasita, a enzima *Tc*GS apresenta duas funções: detoxificar amônia e suprir a necessidade de Gln da célula, visto que o tansporte de Gln em amastigotas é ineficiente, ou propositalmente diminuído.

Quando comparadas as atividades do sistema de transporte de Gln e da enzima *Tc*GS, verifica-se que os dois processos ocorrem de forma compensatória durante o ciclo de vida do parasita, tanto no hospedeiro mamífero quanto no inseto vetor (Figura 52 A). A análise do perfil apresentado para o transporte e a síntese de Gln nas formas encontradas no hospedeiro mamífero, demonstra que em formas tripomastigotas, tanto a síntese como o transporte da Gln encontran-se diminuídas, enquanto que na forma amastigota, a atividade da enzima *Tc*GS está aumentada e a do transporte está diminuída. Já as formas epimastigotas intracelulares, que também apresentam capacidade replicativa, o transporte de Gln está aumentado e a atividade da *Tc*GS diminuída.

A comparação entre o metabolismo de aminoácidos e o transporte de Glc, nos estágios de *T. cruzi* presentes no hospedeiro mamífero, demonstra que a compensação entre o transporte de Gln e a atividade da enzima *Tc*GS, também pode ser relacionado com o transporte e a concentração intracelular de outros metabólitos (Figura 52 B). As formas amastigotas não transportam Glc e apresentam altos níveis de Pro intracelular (Silber, Tonelli et al., 2009), como também um aumento da atividade da enzima *Tc*GS, ao mesmo tempo que os transportes de Gln e Pro estão diminuídos. Já as formas epimastigotas intracelulares, apresentam uma concentração intracelular de Pro reduzida, que é compensada pelo o aumento do seu transporte a partir do meio externo (neste caso o citoplasma da célula hospedeira, ver em (Silber, Tonelli et al., 2009)). Há registro também de uma atividade inicial de transporte de Glc, provavelmente consenquência do processo de remodelação celular que dará origem aos novos tripomastigotas. Nesse estágio a atividade da enzima *Tc*GS está diminuída mas o parasita é capaz de transportar Gln a partir do meio extracelular para o suprimento das necessidades da célula. As formas tripomastigotas apresentam níveis reduzidos de Pro intracelular, um metabolismo energético baseado no consumo de Glc e o transporte de Gln e

* Crispim, M.; Damasceno, F.S.; Hernández, A.; Barisón, M.J.; Sauter, I.P.; Pavani, R.S.; Moura, A.S.; Pral, E.M.F.; Cortez, M.; Elias, M.C.; Silber, A.M.; The glutamine synthetase of *Trypanosoma cruzi* is requerid for its resistance to ammonium accumulation and evasion of the parasitophorous vacuole during host-cell infection. Submitted

Pro ocorrem de forma diminuída. Esses dados sustentam a ideia de uma adaptação do parasita à disponibilidade de nutrientes encontrada nos ambientes pelos quais o parasita transita.

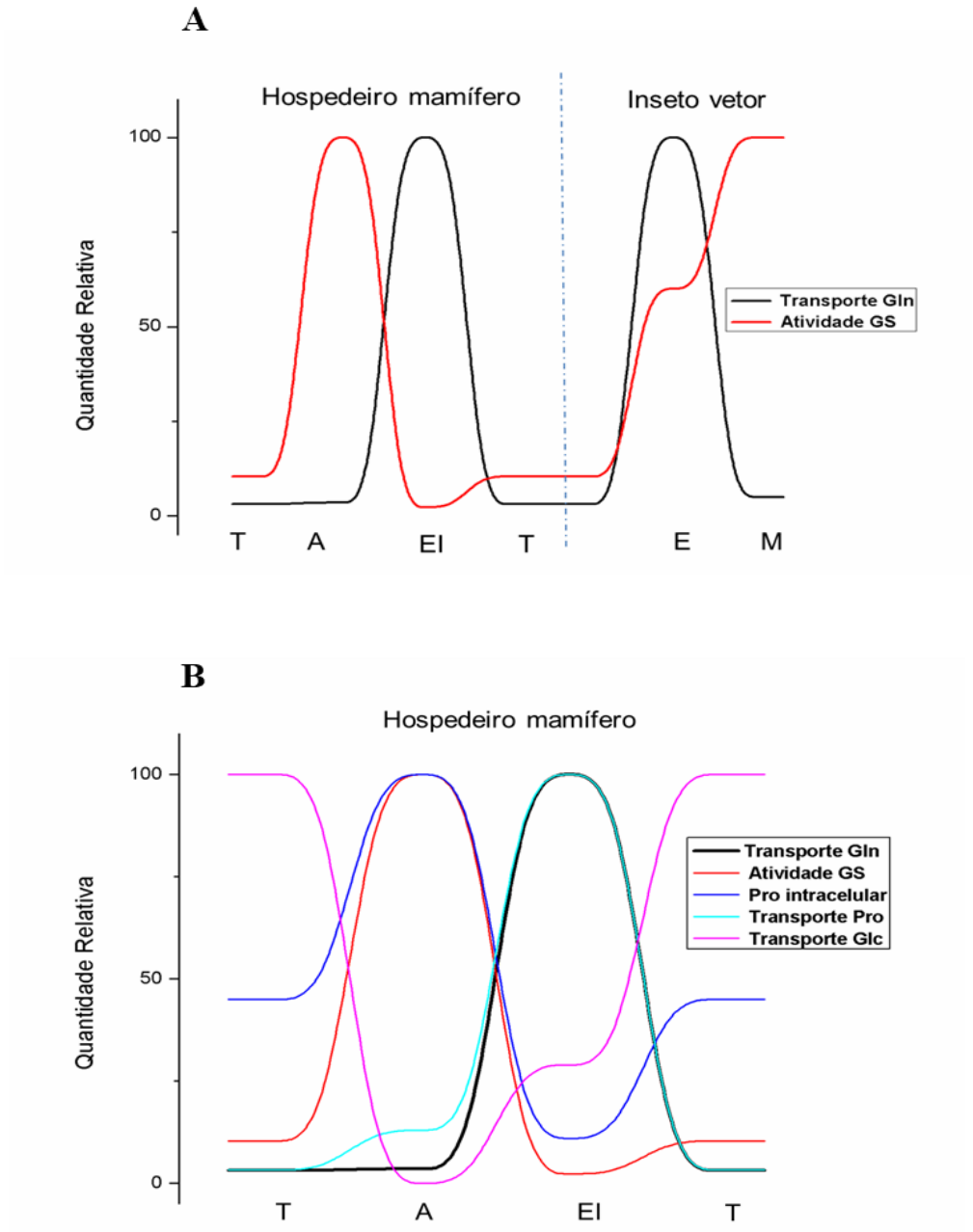

Figura 52 - Comparação relativa entre os transportes de Gln, Pro e Glc, atividade da GS e concentração intracelular de Pro nos diferentes estágios do *T. cruzi*. A maior valor de transporte, atividade enzimática ou concentração intracelular, dentre os estágios do parasita presentes em cada hospedeiro foi considerado como sendo o 100% e os valores obtidos para os demais estágios foram analisados em relação aos mesmos. (**A**) Comparação entre o transporte de Gln e a atividade da GS nos estágios presentes no hospedeiro mamífero e no inseto vetor. (**B**) Comparação entre os transportes de Gln, Pro e Glc, atividade da GS e concentração de Pro intracelular nos estágios presentes no hospedeiro mamífero. **T**: tripomastigota derivado de cultura; **A**: amastigota; **EI**: epimastigota intracelular; **E**: epimastigotas; **TM**: tripomastigota metacíclico. Dados referentes a atividade da *Tc*GS foram descritos por Crispim et al*.; dados referentes ao transporte de Glc e a concentração intracelular de Pro foram descritos por (Silber, Tonelli et al., 2009), já os dados referentes ao transporte de Pro foram obtidos por (Silber, Tonelli et al., 2002).

Já em relação ao transporte de Gln e a atividade da *TcGS* nos estágios encontrados no inseto vetor (Figura 52 A), observa-se que a forma epimastigota apresenta tanto a capacidade de transportar Gln quanto a atividade da enzima *Tc*GS. Esses dados sugerem que o parasita tenta suprir a necessidade deste metabólito, em função da disponibilidade da Gln ou dos substratos para a sua biossíntese. Provavelmente não há grande disponibilidade de Gln no trato digestivo do inseto vetor, visto que este aminoácido não é excretado pelo inseto, apenas produtos do seu metabolismo são detectados (Antunes, Han et al., 2013). Isto sugere que o parasita só tem acesso a Gln livre quando o inseto vetor se alimenta de sangue, uma vez que Gln é o aminoácido mais abundante no plasma humano, sendo encontrada em uma concentração de 400 a 600 µmol/L (Vinnars, Bergstom et al., 1975) revisado por (Soeters,Grecu, 2012). Deve ser ressaltado também que a enzima *Tc*GS participa da detoxificação de NH_4^+ nesse estágio do parasita. Foi demonstrado que formas epimastigotas tratadas com MS, inibidor da enzima GS, são mais suceptíveis a presença de amônia extracelular (Crispim et al[*]). Em relação as formas metacíclicas, estas apresentam uma atividade da enzima *Tc*GS maior que em formas epimastigotas, no entanto o transporte está significativamente diminuído. Esse fato, provavelmente é devido à baixa disponibilidade de Gln na porção final do intestino do inseto vetor, como já foi mencionado, o mesmo não excreta Gln (Barrett,Friend, 1975), e existem relatos na literatura mostrando que Gln está presente na hemolinfa do inseto vetor, mas em pequena quantidade (Harington, 1961).

Após a comparação do transporte de Gln com a atividade da enzima *Tc*GS, em todas as formas do ciclo de vida do parasita, foi observado que todos os estágios utilizam Gln em maior ou menor quantidade, exceto as formas tripomastigotas oriundas de cultivo celular. O papel da Gln em processos biológicos importantes para o *T. cruzi*, tais como: viabilidade, proliferação, diferenciação e infectividade também foi avaliado. Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que Gln deve ser incluída dentre os aminoácidos capazes de manter a viabilidade de formas epimastigotas quando submetidas a estresse metabólico severo. Parasitas mantidos apenas na presença de Gln como fonte de energia e carbono permaneceram mais viáveis do que parasitas mantidos em Glu (metabólito capaz de estender a viabilidade de parasitas nessas condições) ou PBS. Também foi demonstrado que parasitas incubados na presença de Gln apresentaram o mesmo nível de ATP dos parasitas incubados na presença de Pro, aminoácido este já descrito como importante para o metabolismo

[*] Crispim, M.; Damasceno, F.S.; Hernández, A.; Barisón, M.J.; Sauter, I.P.; Pavani, R.S.; Moura, A.S.; Pral, E.M.F.; Cortez, M.; Elias, M.C.; Silber, A.M.; The glutamine synthetase of *Trypanosoma cruzi* is requerid for its resistance to ammonium accumulation and evasion of the parasitophorous vacuole during host-cell infection. Submitted:

energético. Esses resultados sugerem que Gln teria um papel protetor para o parasita em condições de estresse nutricional. A importância da Gln na manutenção da viabilidade de outros parasitas já foi descrita. Por exemplo, Gln e Glc são importantes para a manutenção e prolifereção do *Plasmodium falciparum*, que pode ser promovida independentemente pela Gln, mas não pelo Glu (Elford,Pinches, 1992).Também já foi descrito que em eritrócitos infectados com *P. falciparum*, ocorre uma mudança na incorporação de moléculas através da membrana, incluindo o aumento da incorporação de Gln (Cabantchik, 1990).

Outro aspecto da relevância da Gln na biologia de *T. cruzi* explorado neste trabalho foi a sua participação na infectividade de formas tripomastigotas. Parasitas submetidos a estresse nutricional e posteriormente recuperados na presença de Gln infectaram tanto quanto parasitas que foram mantidos em meio rico (RPMI, condição normal de cultivo) e infectaram mais células do que parasitas que foram incubados na presença de Glu. No entanto, o número de formas tripomastigotas que eclodiram das células infectadas foi menor do que o número de parasitas que eclodiram das células infectadas com parasitas controle, e maior do que o número de parasitas que eclodiram de células infectadas com parasitas que foram mantidos em Glu ou PBS, sugerindo que a Gln é um metabólito importante para a infectividade das formas tripomastigotas. Este fenômeno já foi descrito para Pro, e um intermediário do seu metabolismo, o P5C (Martins, Covarrubias et al., 2009; Mantilla, Paes et al., 2015).

Dentre as funções relevantes de vários aminoácidos na biologia do *T. cruzi*, tem destaque a sua capacidade de sustentar a metaciclogênese. Nós mostramos neste trabalho que Gln promove esse processo de diferenciação. Parasitas que foram diferenciados em meio contendo apenas Gln diferenciaram da mesma forma que parasitas mantidos no meio padrão de diferenciação TAU3AAG, que contém Glu, Asp, Pro e Glc. As formas metacíclicas apresentaram uma incorporação de Gln menor do que as formas epimastigotas em fase exponencial ou estacionária, no entanto apresentam uma atividade da enzima *Tc*GS maior do que as formas epimastigotas (Crispim et al[*].). Esses dados sugerem que as formas epimastigotas, nas fases exponencial e estacionária de proliferação, incorporam a quantidade de Gln requerida para promover a metaciclogênese, ou que durante a fase inicial do processo de diferenciação, os parasitas mantêm a capacidade de incorporar Gln.

Finalmente, observamos que, além de promover a metaciclogênese, a Gln também é importante para a invasão das células hospedeiras pelo parasita. Metacíclicos diferenciados

[*] Crispim, M.; Damasceno, F.S.; Hernández, A.; Barisón, M.J.; Sauter, I.P.; Pavani, R.S.; Moura, A.S.; Pral, E.M.F.; Cortez, M.; Elias, M.C.; Silber, A.M.; The glutamine synthetase of *Trypanosoma cruzi* is requerid for its resistance to ammonium accumulation and evasion of the parasitophorous vacuole during host-cell infection. Submitted.

em meio TAU, contendo Gln como único metabólito disponível, foram capazes de invadir as células hospedeiras tanto quanto os parasitas utilizados como controle (diferenciados em meio TAU3AAG). Surpreendentemente, a quantidade de formas tripomastigotas que eclodiram das células hospedeiras infectadas, com os parasitas diferenciados em meio TAUGln, foi maior que no controle e na condição com parasitas diferenciados em TAUGlu. Também foi observado que os parasitas começaram a eclodir previamente às outras condições. Esses dados sugerem que a diferenciação na presença de Gln superestimularia processos relacionados a replicação e diferenciação no ciclo intracelular do parasita.

4.1.2 Enzimas que participam do metabolismo de Gln em T. cruzi

A Gln não é considerada um aminoácido essencial para muitos organismos, visto que pode ser sintetizada pelas células. Em praticamente todos os seres vivos, Gln é relevante para o metabolismo de nitrogênio, participando da síntese de nucleotídeos, proteínas, aminoáçucares e também do metabolismo energético das células (Soberon,Gonzalez, 1987; DeBerardinis,Cheng, 2010). Em *T. cruzi*, foi demonstrado recentemente pelo nosso grupo, que Gln pode ser sintetizada pela enzima *Tc*GS (Crispim et al[*].). Dados apresentados neste trabalho demonstram que Gln também pode ser incorporada pelo *T. cruzi* a partir do meio extracelular. Análises *in silico* demonstram que em *T. cruzi*, várias reações metabólicas podem utilizar Gln como substrato (Figura 53).

[*] Crispim, M.; Damasceno, F.S.; Hernández, A.; Barisón, M.J.; Sauter, I.P.; Pavani, R.S.; Moura, A.S.; Pral, E.M.F.; Cortez, M.; Elias, M.C.; Silber, A.M.; The glutamine synthetase of *Trypanosoma cruzi* is requerid for its resistance to ammonium accumulation and evasion of the parasitophorous vacuole during host-cell infection. Submitted

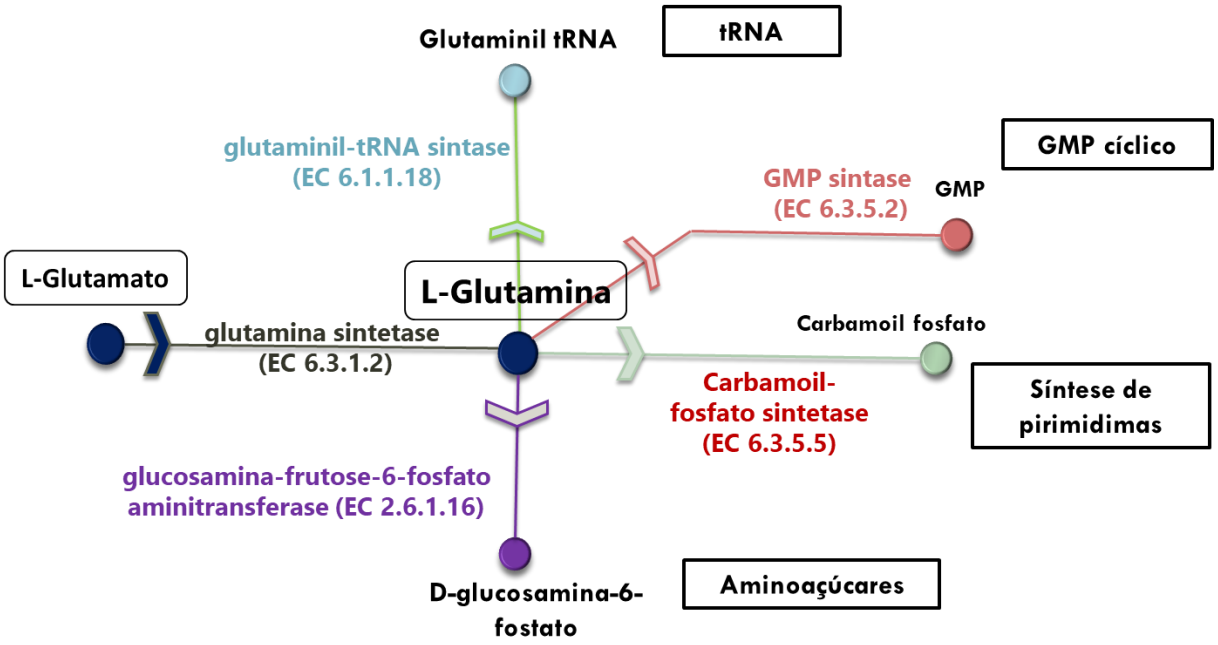

Figura 53 – Reações metabólicas que utilizariam Gln como substrato. Sequências putativas encontradas nos bancos de dados genômicos. Fonte: www.tritrypsdb.org.; www.genome.jp/kegg/pathway.

Essa análise *in silico* demonstra que Gln poderia participar como substrato para a enzima Guanosina-5'-monofosfato sintase, que cataliza a conversão de xantosina-5'-monofosfato (XMP) em GMP, usando Gln e ATP como substratos. Sabe-se também que Gln é substrato para a reação catalizada pela enzima carbomoil fosfato sintase (CPS), a primeira enzima da via de síntese *de novo* de pirimidinas. CPS converte Gln e carbonato de hidrogênio em carbomoil fosfato e Glu usando ATP. Em *T. cruzi* já foi demonstrado que *Tc*CPS é relevante para a proliferação de formas intracelulares, sendo considerada um potencial alvo terapêutico (Hashimoto, Morales et al., 2012). Além do mais já foi demonstrado em *T. cruzi* a interação intermolecular entre as três primeiras enzimas da via de biossíntese de pirimidinas, carbomoil fosfato sintase II (CPSII), aspartato transcarbamoilase (ATC) e dihidioorotase (DHO) (Nara, Hashimoto et al., 2012). A enzima glucosamina: fructose-6-fosfato aminotransferase (GF6PA) também utiliza Gln como substrato. Esta enzima é importante para a via de hexosaminas, visto que é responsável pela transferência do grupo amina da Gln para a frutose-6-fosfato formando glucosamina-6-fostato.

Neste trabalho foi demonstrado que há atividade da enzima GF6PA em extrato de epimastigotas. Também foi mostrado que análogos estruturais de Gln inibem essa atividade. Os análogos AZA, ACV e DPA não inibiram o tansporte de Gln, como também não inibiram a atividade da enzima *Tc*GS, no entanto inibiram a atividade da enzima GF6PA, sendo que o análogo AZA inibiu completamente a atividade da enzima no extrato. A avaliação do efeito dos análogos em processos biológios relevantes para o parasita, tais como: proliferação, diferenciação, infectividade e viabiliade demonstrou que a presença dos análogos interfere nesses processos nos diferentes estágios do *T. cruzi*.

O análogo ACV é um produto da fermentação de *Streptomyces sciveus* que inibe enzimas como a citidina trifosfato (CTP) sintetase, responsável pela formação de CTP a partir de UTP, ATP e Gln. Esse análogo, recentemente foi descrito como um pontente inibidor da CTP sintetase de *T. brucei*, sendo proposto como um composto líder para síntese de compostos com atividade anti-*T. brucei* (Oliveira de Souza, Dawson et al., 2017). ACV também já foi descrito como inibidor da GMP sintase de *T. brucei*, outra enzima que também utiliza Gln como substrato (Li, Leija et al., 2015). Resultados apresentados neste trabalho demonstram que o tratamento de formas epimastigotas com ACV diminuiu a proliferação dos parasitas de forma dose-dependente (IC_{50} 6,2 µM). ACV também apresentou um feito no ciclo intracelular, diminuindo a eclosão de formas tripomastigotas de forma dose-dependente em concentrações nanomolares (IC_{50} 152,9 nM). Estes dados sugerem que o análogo ACV também poderia ser utilizado como um composto líder para o desenvolvimento de compostos anti-*T. cruzi*, assim como foi proposto para *T. brucei.*

Em relação ao análogo AZA, que inibiu completamente a atividade da enzima *Tc*GF6PA em extratos de epimastigotas, também apresentou um efeito inibitório da proliferação de formas epimastigotas (IC_{50} 6,1 µM), na diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos e na eclosão de formas tripomastigotas de células CHO-K_1 infectadas. Esses resultados demonstram que a via metabólica, da qual a enzima GF6PA participa, é importante para todos os estágios do parasita e participa de processos biológicos importantes para a progressão do ciclo de vida do *T. cruzi*. O análogo DPA, também inibiu a proliferação de epimastigotas (IC_{50} 6,2 µM) e a eclosão de formas tipomastigotas, de forma dose-dependente (IC_{50} 53,3 µM).

O efeito dos análogos de Gln em todos os estágios do ciclo de vida do *T. cruzi* demonstra que as vias metabólicas que utilizam Gln como substrato são importantes para o parasita e apresentam potencial para serem exploradas como possíveis alvos para o desenvolvimento de fármacos. Outro fato relevante do metabolismo de Gln em *T. cruzi*, é que

não foi encontrado, nos bancos de dados genômicos, um gene putativo para a enzima glutaminase, a qual catalisa a hidrólise de Gln em Glu e NH_4^+. Esse dado sugere que Gln é um aminoácido que é metabolizado pelo parasita sem a produção de NH_4^+, visto que nas reações, das quais a Gln participa, o nitrogênio é doado diretamente para outras vias metabólicas.

4.1.3 Morte celular em tripanossomatídeos

De maneira geral, as células dos diferentes organismos podem apresentar diferentes mescanismos de morte celular. Os principais tipos de morte celular em eucariotos, definidos pelo comitê de Nomeclatura de Morte Celular (*Nomenclature Comittee on Cell Death* – NCCD), com base em características morfológicas e bioquímicas são: (i) autofagia, (ii) apoptose e (iii) necrose (Kroemer, Galluzzi et al., 2009).

(i) A autofagia, embora caracterizada como um processo de morte celular, é um mecanismo extremo de sobrevivência que normalmente mantém a célula viável em períodos de escassez de nutrientes, e que em situações extremas pode resultar em morte celular (Duszenko, Ginger et al., 2011). O processo de autofagia é lento e pode durar vários dias. As principais características são a formação de novos compartimentos intracelulares, formação de vesículas autofágicas com dupla membrana e formção de vacúolos. Essas alterações são mediadas pela família de proteínas ATG (Kroemer, Galluzzi et al., 2009).

(ii) Apoptose é caracterizada pela retração de pseudópodes, redução do volume celular com arredondamento da célula, ativação de caspases, condensação da cromatina, fragmentação do DNA, ativação de vias pró-apoptóticas como a família de proteínas Bcl-2 que resulta na ativação de caspases. Outra característica de apoptose é a manutenção da integridade da membrana celular até os últimos estágios do processo (Kroemer, Galluzzi et al., 2009).

(iii) Necrose é caracterizada pela ruptura da membrana plasmática da célula e uma condensação moderada da cromatina. Este processo e bioquimicamente caracterizado pela ativação de calpainas e catepsinas, diminuição dos níveis de ATP e liberação de moléculas pró-inflamatórias (Kroemer, Galluzzi et al., 2009).

Os tripanossomatídeos também apresentam morte celular por necrose, autofagia e têm sido descrito morte celular programada por um mecanismo símil-apoptose já que não paricipariam algumas moléculas clássicas como caspases ou proteínas da família Bcl2, (os tipanossomatídeos não expressam essas moléculas). Em tripanossomatídeos, o processo de

morte celular programada é caracterizado pela exposição de fosfatidilserina na parte externa da membrana citoplasmática, fragmentação do DNA, diminuição dos níveis de ATP intracelular, arredondamento da célula e danos mitocondriais como liberação do citocromo C e aumento dos níveis de cálcio (Duszenko, Figarella et al., 2006; van Zandbergen, Luder et al., 2010; Smirlis,Soteriadou, 2011; Damasceno, Barison et al., 2014). Já o processo autofágico é mediado por proteínas da familia ATG e parece ser um mecanismo importante para a sobrevivência do parasita durante períodos de escassez de nutrientes, como também para o processo de diferenciação (Alvarez, Kosec et al., 2008).

Neste trabalho foi demonstrado que a Gln pode estar envolvida na proteção da morte celular em epimastigotas de *T. cruzi*. O tratamento dos parasitas com análogos estruturais de Gln desencadeou mecanismos de morte celular com características de apoptose e necrose. O tratamento com ACV não diminuiu a viabilidade dos parasitas durante as primeiras 48 h de tratamento, quando foram cultivados na presença de Gln ou Glu como única fonte de carbono e energia ou mesmo quando cultivados em LIT. No entanto, quando os parasitas foram cultivados em LIT e tratados com ACV, aumentaram a exposição de fosfatidilserina na parte externa da membrana citoplasmática, indicando que os parasitas, possivelmente, estariam entrando em processo de apoptose. Após a remoção do tratamento e o cultivo dos parasitas em LIT novamente, proliferaram normalmente independentemente do prévio tratamento, como também o processo de exposição de fosfatidilserina foi revertido completamente. Já foi descrito que ACV pode induzir apoptose em células V79 (fibrobalstos de *hamster*) pela inibição da enzima γ-glutamiltranspeptidase (GGT) e outras enzimas dependentes de Gln, visto que ACV é um antagonista de Gln (Aberkane, Frank et al., 2001).

Já o tratamento com AZA durante 48 h na presença de Gln ou Glu, como única fonte de carbono e energia, diminuiu a viabilidade dos parasitas. Após a remoção do tratamento e a transferência dos paraistas para o LIT, apenas os parasitas que foram tratados na presença de LIT foram capazes de manter a sua proliferação normalmente, inclusive revertendo a exposição de fostatidilserina. No entanto, os parasitas que foram tratados na presença de Gln, Glu ou PBS, não foram capazes de retomar a capacidade proliferativa, além do mais apresentaram positividade para exposição de fosfatidilserina e ruptura de membrana plasmática, visualizada pela dupla marcação com PI e anexina, ou apenas marcados com PI ou anexina. Esses resultados sugerem que os parasitas entraram em processo de morte celular programada de forma irreversível. Também já foi descrita a indução de apoptose pelo tratamento com AZA, em células de linfomas (Pham, Bryant et al., 2016). Outro fato que pode ser observado, é que os parasitas que foram tratados na presença de Glu apresentam uma

leve recuperação da proliferação após o 8° dia do cultivo em LIT, o que não ocorreu com os parasitas que foram tratados na presença de Gln ou PBS, o que sugere que AZA atua de forma irreversível nas vias que dependem de Gln.

Em relação ao análogo DPA, a descrição do seu mecanismo de ação não foi encontrada na literatura, nem mesmo nos dados fornecidos pelo fabricante, sendo apenas descrito como análogo de Gln. Os dados apresentados neste trabalho demonstram que DPA também inibiu a enzima GF6PA em extratos de epimastigotas, como também inibiu a proliferação dos parasitas de forma dose-dependente. No entanto, não diminuiu a viabilidade quando os parasitas foram tratados na presença de Gln, Glu ou LIT por 48 h, diminuindo apenas quando os mesmos foram tratados na ausência de nutrientes, ou seja, em PBS. Após a remoção do tratamento e o cultivo dos parasitas em LIT, observou-se que os parasitas que foram mantidos em PBS+DPA apresentaram um atraso na recuperação da proliferação e apresentaram um maior número de células positivas para necrose. Também foi observado que os parasitas que foram mantidos em Gln+DPA não retomaram o perfil de proliferação normal e apresentaram um aumento do número de células positivas para PI e anexina. Estes resultados demonstram que Gln participa da manutenção da viabilidade de *T. cruzi*, como também a importância de vias que utilizam Gln como substrato para a sobrevivência do parasita. A interrupção dessas vias pela presença dos análogos de Gln desencadeiam nos parasitas mecanismos de morte celular com características de necrose e apoptose.

Em síntese, observa-se que a Gln é incorporada e metabolizada pelo *T. cruzi*, participando de vias metabólicas importantes para a manutenção do parasita. O efeito dos análogos em vias que dependem de Gln, reforçam a relevância deste metabólito em todos os estágios do ciclo de vida do parasita, sendo mais evidente a importância da Gln nos estágios replicativos: amastigota e epimastigota, como também na diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos. Em conjunto, todos os dados aqui apresentados reforçam a hipótese de que as vias metabólicas que utilizam Gln como substrato apresentam pontencial para serem exploradas como alvo para o desenvolvimento de novos fármacos.

4.2 *T. brucei*

4.2.1 A Gln e o ciclo celular em T. brucei

Formas sanguícolas de *T. brucei* têm o seu metabolismo energético baseado principalmente no consumo de Glc, que é abundante no sangue do hospedeiro mamífero. A Glc é convertida a piruvato em uma organela chamada glicossomo, e o piruvato é secretado pelo parasita (Besteiro, Barrett et al., 2005). Não foram encontrados relatos da participação dos aminoácidos no metabolismo energético das formas sanguícolas, indicando que provavelmente os aminoácidos não são relevantes para produção de energia nessas formas. Não há evidências de um papel relevante da mitocôndria das formas sanguícolas no metabolismo energético, uma vez que o ciclo de Krebs está incompleto e aparentemente não acontece o processo de fosforilação oxidativa (Bienen, Hammadi et al., 1981). A importância da Gln tem sido descrita para vários tipos de células, como já mencionado neste trabalho, incluindo organismos multicelulares e unicelulares, com participação em vários processos biológicos, tais como: metabolismo energético, síntese de aminoaçúcares, resposta imune, síntese de nucleotídeos dentre outros (DeBerardinis,Cheng, 2010; MacRae, Dixon et al., 2013; Lee, Evans et al., 2014; Zhang, Pavlova et al., 2017).

Resultados apresentados neste trabalho demonstraram que a Gln pode ser incorporada por formas sanguícolas de *T. brucei* a partir do meio extracelular, também foi demonstrado que a enzima *Tb*GS é ativa nestes parasitas. No entanto, apesar da enzima *Tb*GS ter atividade em formas sanguícolas, a diminuição dos níveis de atividade *Tb*GS não afetou a proliferação dos parasitas quando estes foram cultivados em meio com Gln. Já os parasitas com níveis normais da enzima *Tb*GS, cultivados em meio sem Gln, não foram capazes de proliferar. Esses dados sugerem que a atividade *Tb*GS não é suficiente para suprir a quantidade de Gln requerida pelo parasita, e que as formas sanguícolas são completamente dependentes da concentração de Gln no meio extracelular. Esses dados indicam que a Gln tem uma participação relevante na proliferação das formas sanguícolas.

A participação da Gln como substrato das enzimas participantes das vias de síntese de aminoaçúcares e síntese de nucleotídeos já estão bem descritas na literatura para outros organismos. Também já foi descrita para *T. brucei* a importância da enzima GMP sintase, que utiliza Gln como um dos substratos e participa da via de síntese de nucleotídeos. Parasitas *knockout* para essa enzima não são capazes de sobreviver (Li, Leija et al., 2015). Além do mais, assim como em *T. cruzi*, há predições nos bancos de dados genômicos para sequências

putativas das enzimas que vinculam Gln com a síntese de aminoaçúcares, síntese de pirimidinas e a síntese proteica em *T. brucei* (KEGG, NCBI, TriTrypDB, UniProt, Pfam e BRENDA enzymes).

Dados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho também demonstraram que a Gln tem um papel relevante na correta progressão do ciclo celular das formas sanguícolas. O ciclo celular de células eucarióticas, normalmente consiste em quatro fases: G0/G1, S, G2 e M. Durante a fase G0/G1, a célula se prepara para entrar em nova divisão. Na fase S ocorre a replicação do DNA, e o ciclo celular segue para a fase G2/M onde ocorre a segregação do conteúdo genético e a célula passa pelo processo de citocinese (Hammarton, 2007). Interessantemente, o ciclo celular em *T. brucei*, ocorre de forma similar as demais células eucarióticas, no entanto, algumas particularidades são encontradas: (i) moléculas reguladoras clássicas estão ausentes, (ii) os parasitas apresentam algumas moléculas reguladoras específicas para tripanossomatídeos e (iii) apresentam uma única cópia de algumas organelas e estruturas como a mitocôndria, o cinetoplasto, o corpo basal, o complexo de Golgi e o flagelo, que precisam ser duplicadas corretamente antes da divisão celular (revisado por (Li, 2012)). Durante o ciclo celular do *T. brucei*, a primeira estrutura a ser duplicada é o corpo basal. Na fase G1 apenas um corpo basal é encontrado, durante a fase S essa organela é duplicada mas continua associada à anterior. Na fase G2 e fases subsequentes do ciclo celular, o corpo basal é separado, levando a segregação do cinetoplasto já duplicado (Zhou, Hu et al., 2014). A replicação do cinetoplasto ocorre antes da replicação do núcleo e parece ocorrer durante o posicionamento do novo corpo basal (Gluenz, Povelones et al., 2011).

Neste trabalho foi mostrado que os parasitas cultivados em meio com a concentração de Gln reduzida, apresentaram um aumento do número de células na fase G2/M do ciclo celular, como também do número de parasitas com mais de dois núcleos, ou seja, poliploides. Também foi demonstrado que após a sincronização do ciclo celular dos parasitas em fase G1, os mesmos foram capazes de passar pela fase S e G2, mas não completaram a divisão celular, tornando-se células poliploides. No entanto, a adição de Gln no meio de cultivo novamente, fez com que os parasitas recuperassem a normalidade do ciclo celular e retomassem o perfil de proliferação normal, demonstrando assim a relevância da Gln para o processo de citocinese.

Os mecanismos exatos que regulam o ciclo celular em tripanossomas, ainda não são conhecidos, como também não se sabe como os pontos de checagem funcionam. De fato, as formas sanguícolas de *T. brucei* parecem não ter um ponto de checagem para controlar o ciclo celular entre a citocinese e a nova fase G1. Os parasitas podem iniciar um novo ciclo celular

mesmo na ausência da citocinese após o ciclo anterior, o que resulta em parasitas gigantes com DNA poliplóide que são incapazes de segregação (Hammarton, Clark et al., 2003) revisado por (Zhou, Hu et al., 2014). Ainda não é claro como occore o início da citocinese em *T. brucei*, mas sabe-se que a diminuição de proteínas requeridas para a aderência do flagelo, a duplicação do corpo basal e a biogênese das proteínas de membranas GPI podem inibir a citocinese, no entanto não se sabe como essas proteínas estão diretamente envolvidas, revisado por (Hammarton, 2007).

Também foi demonstrado neste trabalho, que a recuperação do perfil de proliferação e progressão do ciclo celular dos parasitas, após a incubação dos mesmos em meio sem Gln, é dependente da concentração deste aminoácido no meio de cultivo, nas primeiras 24 h de recuperação. Esse resultado sugere que algumas vias metabólicas importantes para os processos de replicação e ciclo celular são especificamente dependentes de Gln, visto que todos os outros aminoácidos e os diferentes metabólitos, que também são importantes para o parasita, estavam presentes no meio de cultivo, inclusive o Glu que é precursor da síntese de Gln.

4.2.2 Modificações pós-traducionais

Modificações pós-traducionais são modificações que ocorrem em proteínas após a sua tradução, pela adição de grupos químicos à resíduos de aminoácidos. Essas modificações são reversíveis e podem ocorrer de forma isolada, ou em diferentes combinações, de maneira temporal e dependente da sinalização celular. Dentre as funções dessas modificações estão a determinação da estrutura terciária e quaternária, como também a regulação da atividade e função da proteína (Seo,Lee, 2004).

As proteínas actina e tubulina são os componentes principais do citoesqueleto de células eucarióticas. O citoesqueleto é reponsável pela organização interna, forma e motilidade das células, e é composto de filamentos de actina, filamentos intermediários e microtúbulos (Janke,Bulinski, 2011). Diferente de outros tipos de células, o citoesqueleto de tripanossomatídeos é composto apenas por microtúbulos. Esses microtúbulos são encontrados principalmente em duas organizações: (i) formando uma camada abaixo da membrana plasmática, conhecida como microtúbulos sub-peliculares e (ii) no axonema flagelar (de Souza, 1988; Zhou, Hu et al., 2014). As αβ-tubulinas são as unidades estruturais dos microtúbulos e são alvos de um grande número de modificações pós-traducionais. A acetilação, a detirosinação, a glicilação e a glutamilação estão entre as modificações que

podem ocorrer nas αβ-tubulinas (revisado por (Wloga,Gaertig, 2010)). O processo de glutamilação da tubulina foi descrito por Eddé e colaboradores, quando os mesmos incubaram células neuronais com glutamato marcado e após análise detectaram uma adição sucessiva de unidades glutamil no resíduo 445 de Glu (Glu445) da α-tubulina na parte carboxiterminal. Esses autores demonstraram também que essa modificação, localizada na α-tubulina, é importante para as interações da mesma com proteínas associadas ao microtúbulo, como também sugeriram que essa modificação pode regular a dinâmica dos microtúbulos (Edde, Rossier et al., 1990). Já foi demonstrado que o *T. brucei* é um tipo de célula com mecanismos de modificações pós-traducionais de tubulina extremamente ativos (Sasse,Gull, 1988) e que os microtúbulos de *T. brucei* são intensivamente glutamilados (Casanova, de Monbrison et al., 2015). Interessantemente, foi descrito que em formas procíclicas de *T. brucei*, tanto a α como a β-tubulina podem ser glutamiladas, sendo que na α-tubulina a glutamilação ocorre no resíduo Glu445 (mesmo resíduo descrito para neurônios) e na β-tubulina ocorre no resíduo 435 (Schneider, Plessmann et al., 1997). Resultados apresentados neste trabalho demonstraram que a Gln está envolvida no processo de glutamilação da tubulina. Parasitas que foram cultivados em meio sem Gln apresentaram um nível menor de tubulina glutamilada quando comparado com o controle (parasitas cultivados em meio com a concentração padrão de Gln) e foram capazes de recuperar o nível normal de glutamilação após a adição de Gln no meio de cultivo. Interessantemente, não foi encontrada na literatura descrição da participação da Gln no processo de glutamilação de tubulina.

Os trabalhos, encontrados na literatura, descrevem a participação do Glu no processo de glutamilação. Eddé e colaboradores incubaram neurônios com Glu radioativamente marcado e depois encontraram o resíduo glutamil marcado na cadeia lateral que se formou no resíduo Glu445 da tubulina (Edde, Rossier et al., 1990). Também em *T. brucei* foi descrito que parasitas incubados com Glu radioativamente marcado apresentaram a tubulina glutamilada com resíduos glutamil marcado (Schneider, Plessmann et al., 1997). Ainda não se sabe exatamente como ocorre o processo de adição de resíduos de Glu na tubulina, acredita-se que um complexo contendo a proteína tubulina tirosina ligase-like (TTLL1) é responsável por esta reação, visto que essas enzimas são capazes de catalizar a ligação de diversos aminoácidos e outros substratos à tubulina (Janke, Rogowski et al., 2005). Além do mais, várias enzimas pertencentes a família TTLL estão envolvidas nos processos de modificações pós-traducionais (Schneider, Plessmann et al., 1997; Wloga,Gaertig, 2010; Garnham, Yu et al., 2017), no entanto as características bioquímicas desta reação ainda não são conhecidas (Garnham, Yu et al., 2017). Em *T. brucei* foi demonstrado que o *knockdown* de duas enzimas

preditas como glutamilases (*Tb*TTLL6B e *Tb*TTLL4A) não afetou a proliferação dos parasitas, mas dimimuiu a marcação das células com o anticorpo GT335 e aumentou o número de células com mais de dois núcleos, demonstrando que a poliglutamilação pode ser importante para a mitose/citocinese dos parasitas (Casanova, de Monbrison et al., 2015).

Os fatos de que: (i) a Gln não foi descrita como substrato dessa reação, e (ii) os resultados aqui apresentados demonstrarem que em *T. brucei* a Gln está envolvida com essa modificação, podem ser explicados pela própria reação de biossíntese da Gln pelas células. Como já mencionado, essa reação utiliza Glu como um dos substratos. Possivelmente, o observado por Eddé e colaboradores, como também por Scheneider e colaboradores, quando células incubadas com Glu marcado apresentaram resíduos glutamil marcados na tubulina, pode ter sido consequência da biossíntese da Gln a partir do Glu marcado, a qual participaria como substrato da reação de glutamilação.

A participação do processo de glutamilação no correto posicionamento de microtúbulos e na intereção dos mesmos com outras proteínas já está bem descrito em outros organismos (Edde, Rossier et al., 1990; Wloga,Gaertig, 2010; Garnham,Roll-Mecak, 2012). Estudos realizados em *Tetrahymena thermophila*, um organismo ciliado, mostrou que a glutamilação é importante para o correto arranjo das estruturas do microtúbulo na célula (Wloga, Rogowski et al., 2008). Em *T. brucei* o flagelo tem funções importantes no ciclo de vida do parasita e também no ciclo celular, tais como: diferenciação, motilidade, aderência e divisão celular (Gluenz, Povelones et al.; Hoog, Lacomble et al., 2014). Os dados apresentados neste trabalho sugerem que a participação da Gln no processo de poliglutamilação da tubulina é importante para a citocinese, visto que parasitas cultivados em meio sem Gln, aprensentaram níveis reduzidos de glutamilação e não completaram a divisão celular.

Os nossos resultados sobre o papel da Gln em *T. brucei* mostram que, assim como em *T. cruzi*, a Gln também está envolvida de forma específica em processos biológicos fundamentais, como a citocinese, para a manutenção da viabilidade de formas sanguícolas de *T. brucei*.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES

Considerando todos os resultados apresentados neste trabalho, pode-se concluir que:

- A incorporação de Gln pelo *T. cruzi*, desde o meio extracelular, é realizada por um sistema de transporte único, saturável, dependente de ATP e do gradiente de prótons da membrana do parasita, sendo mais ativo nas formas epimastigotas presentes tanto do hospedeiro mamífero, quanto no hospedeiro invertebrado.
- O transporte de Gln é compensatório da atividade da enzima *Tb*GS, sendo necessários os dois processos para fornecer ao parasita a quantidade de Gln requerida ao longo do ciclo de vida do *T. cruzi*, dependendo da disponibilidade da Gln no meio extracelular e/ou das necessidades metabólicas da célula.
- Gln participa do metabolismo energético do *T. cruzi*, sendo capaz de manter os níveis de ATP intracelular e a viabilidade celular.
- A Gln é capaz de promover o processo de diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos, resultando em parasitas viáveis capazes de estabelecer a infecção nas células do hospedeiro mamífero e completarem o ciclo intracelular.
- O tratamento de formas epimastigotas com análogos estruturais da Gln (ACV, AZA e DPA) inibe a proliferação de forma dose-depedente e induz a morte dos parasitas com características de necrose e apoptose.
- Os análogos estruturais de Gln também interferem no ciclo intracelular do parasita, demonstrando que a Gln tem uma participação relevante neste processo.
- A enzima GF6PA de *T. cruzi* foi inibida completamente pelo análogo AZA e de forma parcial pelos análogos ACV e DPA, demonstrando que Gln efetivamente participa desta via no parasita.
- *T. brucei* apresenta a capacidade de incorporar Gln a partir do meio externo.
- A enzima *Tb*GS é ativa em formas sanguícolas de *T. brucei*, mas não é capaz de suprir a quantidade de Gln requerida pelo parasita.
- Gln é um metabólito fundamental para a proliferação das formas sanguícolas de *T. brucei*.
- Gln participa do processo de poliglutamilação da tubulina de *T. brucei*.

- Mecanismos envolvidos no processo de citocinese das formas sanguícolas de *T. brucei* são dependes da concentração de Gln no meio extracelular.

Gln é um aminoácido extremamente importante para os tripanossomatídeos *T. cruzi* e *T. brucei*, principalmente para processos relacionados à proliferação dos parasitas. Resultados apresentados neste trabalho sugerem que as vias metabólicas dependentes de Gln apresentam potencial para serem exploradas como possíveis alvos terapêuticos.

REFERÊNCIAS*

Aberkane H, Frank P, Galteau MM,Wellman M. Acivicin induces apoptosis independently of gamma-glutamyltranspeptidase activity. Biochem Biophys Res Commun. 2001;285(5):1162-7.

Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukes J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, Mcmanus H, Mitchell EA, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A,Spiegel FW. The revised classification of eukaryotes. J Eukaryot Microbiol. 2012;59(5):429-93.

Almeida-De-Faria M, Freymuller E, Colli W,Alves MJ. *Trypanosoma cruzi:* characterization of an intracellular epimastigote-like form. Exp. Parasitol. 1999;92(4):263-74.

Alvarez VE, Kosec G, Sant'anna C, Turk V, Cazzulo JJ,Turk B. Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem. 2008;283(6):3454-64.

Ames TD,Breaker RR. Bacterial aptamers that selectively bind glutamine. RNA Biol. 2011;8(1).

Anoopkumar-Dukie S, Carey JB, Conere T, O'sullivan E, Van Pelt FN,Allshire A. Resazurin assay of radiation response in cultured cells. Br J Radiol. 2005;78(934):945-7.

Antunes LC, Han J, Pan J, Moreira CJ, Azambuja P, Borchers CH,Carels N. Metabolic signatures of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* unveiled by metabolomics. PLoS One. 2013;8(10):e77283.

Barison MJ, Damasceno FS, Mantilla BS,Silber AM. The active transport of histidine and its role in ATP production in *Trypanosoma cruzi*. J Bioenerg Biomembr. 2016;48(4):437-49.

Barison MJ, Rapado LN, Merino EF, Furusho Pral EM, Mantilla BS, Marchese L, Nowicki C, Silber AM,Cassera MB. Metabolomic profiling reveals a finely tuned, starvation-induced metabolic switch in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. J Biol Chem. 2017;292(21):8964-77.

Barrett FM,Friend WG. Differences in the concentration of free amino acids in the haemolymph of adult male and female *Rhodnius prolixus*. Comp Biochem Physiol B. 1975;52(3):427-31.

Bern C. Chagas' Disease. N Engl J Med. 2015;373(5):456-66.

---

* 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.

Bern C, Verastegui M, Gilman RH, Lafuente C, Galdos-Cardenas G, Calderon M, Pacori J, Del Carmen Abastoflor M, Aparicio H, Brady MF, Ferrufino L, Angulo N, Marcus S, Sterling C,Maguire JH. Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolivia. Clin Infect Dis. 2009;49(11):1667-74.

Besteiro S, Barrett MP, Riviere L,Bringaud F. Energy generation in insect stages of *Trypanosoma brucei:* metabolism in flux. Trends Parasitol. 2005;21(4):185-91.

Bienen EJ, Hammadi E,Hill GC. *Trypanosoma brucei*: biochemical and morphological changes during in vitro transformation of bloodstream- to procyclic-trypomastigotes. Exp Parasitol. 1981;51(3):408-17.

Boscardin SB, Torrecilhas AC, Manarin R, Revelli S, Rey EG, Tonelli RR,Silber AM. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. J Cell Mol Med. 2010;14(6B):1373-84.

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;72:248-54.

Brener Z,Chiari E. Aspects of early growth of different *Trypanosoma cruzi* strains in culture medium. J Parasitol. 1965;51(6):922-6.

Bringaud F, Barrett MP,Zilberstein D. Multiple roles of proline transport and metabolism in trypanosomatids. Front Biosci (Landmark Ed). 2012;17:349-74.

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

Buguet A, Bourdon L, Bouteille B, Cespuglio R, Vincendeau P, Radomski MW,Dumas M. The duality of sleeping sickness: focusing on sleep. Sleep Med Rev. 2001;5(2):139-53.

Buscher P, Cecchi G, Jamonneau V,Priotto G. Human African trypanosomiasis. Lancet. 2017.

Cabantchik ZI. Properties of permeation pathways induced in the human red cell membrane by malaria parasites. Blood Cells. 1990;16(2-3):421-32.

Caldas RA, Araujo EF, Felix CR,Roitman I. Incorporation of ammonium in amino acids by *Trypanosoma cruzi*. J Parasitol. 1980;66(2):213-6.

Camargo EP. Growth and Differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 1964;12:93-100.

Canepa GE, Bouvier LA, Miranda MR, Uttaro AD,Pereira CA. Characterization of *Trypanosoma cruzi* L-cysteine transport mechanisms and their adaptive regulation. FEMS Microbiol Lett. 2009;292(1):27-32.

Canepa GE, Bouvier LA, Urias U, Miranda MR, Colli W, Alves MJ,Pereira CA. Aspartate transport and metabolism in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol Lett. 2005;247(1):65-71.

Canepa GE, Silber AM, Bouvier LA,Pereira CA. Biochemical characterization of a low-affinity arginine permease from the parasite *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol Lett. 2004;236(1):79-84.

Casanova M, De Monbrison F, Van Dijk J, Janke C, Pages M,Bastien P. Characterisation of polyglutamylases in trypanosomatids. Int J Parasitol. 2015;45(2-3):121-32.

Cazzulo JJ. Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. J Bioenerg Biomembr. 1994;26(2):157-65.

Cazzulo JJ. Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. J. Bioenerg. Biomembr. 1994;26(2):157-65.

Chagas C. Neue Trypanosomen. Vorläufige Mitteilung Arc. Schiff. Tropenhyg. 1909;13:120-22.

Chatelain E. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? Comput Struct Biotechnol J. 2017;15:98-103.

Chaudhary K,Roos DS. Protozoan genomics for drug discovery. Nat Biotechnol. 2005;23(9):1089-91.

Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM,Goldenberg S. In vitro differentiation of Trypanosoma cruzi under chemically defined conditions. Mol Biochem Parasitol. 1985;16(3):315-27.

Coura JR. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108(8):962-7.

Cross GA, Klein RA,Linstead DJ. Utilization of amino acids by *Trypanosoma brucei* in culture: L-threonine as a precursor for acetate. Parasitology. 1975;71(2):311-26.

Damasceno FS, Barison MJ, Pral EM, Paes LS,Silber AM. Memantine, an antagonist of the NMDA glutamate receptor, affects cell proliferation, differentiation and the intracellular cycle and induces apoptosis in *Trypanosoma cruzi*. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(2):e2717.

De Souza W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Curr Pharm Des. 2002;8(4):269-85.

De Souza W. The cytoskeleton of trypanosomatids. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1988;83 Suppl 1:546-60.

Deberardinis RJ,Cheng T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. Oncogene. 2010;29(3):313-24.

Docampo R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. Curr. Pharm. Des. 2001;7(12):1157-64.

Duschak VG,Cazzulo JJ. Subcellular localization of glutamate dehydrogenases and alanine aminotransferase in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol. Lett. 1991;67(2):131-5.

Duszenko M, Figarella K, Macleod ET,Welburn SC. Death of a trypanosome: a selfish altruism. Trends Parasitol. 2006;22(11):536-42.

Duszenko M, Ginger ML, Brennand A, Gualdron-Lopez M, Colombo MI, Coombs GH, Coppens I, Jayabalasingham B, Langsley G, De Castro SL, Menna-Barreto R, Mottram JC, Navarro M, Rigden DJ, Romano PS, Stoka V, Turk B,Michels PA. Autophagy in protists. Autophagy. 2011;7(2):127-58.

Edde B, Rossier J, Le Caer JP, Desbruyeres E, Gros F,Denoulet P. Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin. Science. 1990;247(4938):83-5.

Elford BC,Pinches RA. Inducible transport systems in the regulation of parasite growth in malaria-infected red blood cells. Biochem Soc Trans. 1992;20(4):790-6.

Filigheddu MT, Gorgolas M,Ramos JM. Orally-transmitted Chagas disease. Med Clin (Barc). 2017;148(3):125-31.

Forsythe GR, Mcculloch R,Hammarton TC. Hydroxyurea-induced synchronisation of bloodstream stage *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol. 2009;164(2):131-6.

Galvez Rojas RL, Ahn IY, Suarez Mantilla B, Sant'anna C, Pral EM,Silber AM. The Uptake of GABA in Trypanosoma cruzi. J Eukaryot Microbiol. 2015;62(5):629-36.

Garnham CP,Roll-Mecak A. The chemical complexity of cellular microtubules: tubulin post-translational modification enzymes and their roles in tuning microtubule functions. Cytoskeleton (Hoboken). 2012;69(7):442-63.

Garnham CP, Yu I, Li Y,Roll-Mecak A. Crystal structure of tubulin tyrosine ligase-like 3 reveals essential architectural elements unique to tubulin monoglycylases. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(25):6545-50.

Gascon J, Bern C,Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. Acta Trop. 2010;115(1-2):22-7.

Gluenz E, Povelones ML, Englund PT,Gull K. The Kinetoplast Duplication Cycle in *Trypanosoma brucei* Is Orchestrated by Cytoskeleton-Mediated Cell Morphogenesis. Mol Cell Biol. 31(5):1012-21.

Goldberg B, Rattendi D, Lloyd D, Yarlett N,Bacchi CJ. Kinetics of methionine transport and metabolism by *Trypanosoma brucei brucei* and *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Arch Biochem Biophys. 2000;377(1):49-57.

Goodsell DS. Glutamine Synthetase. 2002.

Hammarton TC. Cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol. 2007;153(1):1-8.

Hammarton TC, Clark J, Douglas F, Boshart M,Mottram JC. Stage-specific differences in cell cycle control in *Trypanosoma brucei* revealed by RNA interference of a mitotic cyclin. J Biol Chem. 2003;278(25):22877-86.

Hannaert V,Michels PA. Structure, function, and biogenesis of glycosomes in kinetoplastida. J Bioenerg Biomembr. 1994;26(2):205-12.

Harington JS. Studies of the amino acids of *Rhodnius prolixus* I. Analysis of the haemolymph. Parasitology. 1961;51:309-18.

Hart Y, Madar D, Yuan J, Bren A, Mayo AE, Rabinowitz JD,Alon U. Robust control of nitrogen assimilation by a bifunctional enzyme in *E. coli*. Mol Cell. 2011;41(1):117-27.

Hashimoto M, Morales J, Fukai Y, Suzuki S, Takamiya S, Tsubouchi A, Inoue S, Inoue M, Kita K, Harada S, Tanaka A, Aoki T,Nara T. Critical importance of the de novo pyrimidine biosynthesis pathway for *Trypanosoma cruzi* growth in the mammalian host cell cytoplasm. Biochem Biophys Res Commun. 2012;417(3):1002-6.

Homsy JJ, Granger B,Krassner SM. Some factors inducing formation of metacyclic stages of *Trypanosoma cruzi*. J Protozool. 1989;36(2):150-3.

Hoog JL, Lacomble S, O'toole ET, Hoenger A, Mcintosh JR,Gull K. Modes of flagellar assembly in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Trypanosoma brucei*. Elife. 2014;3:e01479.

Inbar E, Canepa GE, Carrillo C, Glaser F, Suter Grotemeyer M, Rentsch D, Zilberstein D,Pereira CA. Lysine transporters in human trypanosomatid pathogens. Amino Acids. 2012;42(1):347-60.

Janke C,Bulinski JC. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. Nat Rev Mol Cell Biol. 2011;12(12):773-86.

Janke C, Rogowski K,Van Dijk J. Polyglutamylation: a fine-regulator of protein function? 'Protein Modifications: beyond the usual suspects' review series. EMBO Rep. 2008;9(7):636-41.

Janke C, Rogowski K, Wloga D, Regnard C, Kajava AV, Strub JM, Temurak N, Van Dijk J, Boucher D, Van Dorsselaer A, Suryavanshi S, Gaertig J,Edde B. Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain protein family. Science. 2005;308(5729):1758-62.

Kribs-Zaleta C. Estimating contact process saturation in sylvatic transmission of *Trypanosoma cruzi* in the United States. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(4):e656.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nunez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G,Nomenclature Committee on Cell D. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death Differ. 2009;16(1):3-11.

L'hostis C, Geindre M,Deshusses J. Active transport of L-proline in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei brucei*. Biochem. J. 1993;291 (Pt 1):297-301.

Lamour N, Riviere L, Coustou V, Coombs GH, Barrett MP,Bringaud F. Proline metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei* is down-regulated in the presence of glucose. J. Biol. Chem. 2005;280(12):11902-10.

Lee IP, Evans AK, Yang C, Works MG, Kumar V, De Miguel Z, Manley NC,Sapolsky RM. *Toxoplasma gondii* is dependent on glutamine and alters migratory profile of infected host bone marrow derived immune cells through SNAT2 and CXCR4 pathways. PLoS One. 2014;9(10):e109803.

Li Q, Leija C, Rijo-Ferreira F, Chen J, Cestari I, Stuart K, Tu BP,Phillips MA. GMP synthase is essential for viability and infectivity of *Trypanosoma brucei* despite a redundant purine salvage pathway. Mol Microbiol. 2015;97(5):1006-20.

Li Z. Regulation of the cell division cycle in Trypanosoma brucei. Eukaryot Cell. 2012;11(10):1180-90.

Llopis J, Mccaffery JM, Miyawaki A, Farquhar MG,Tsien RY. Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(12):6803-8.

Loh E,Kufe DW. Synergistic effects with inhibitors of de novo pyrimidine synthesis, acivicin, and N-(phosphonacetyl)-L-aspartic acid. Cancer Res. 1981;41(9 Pt 1):3419-23.

Macrae JI, Dixon MW, Dearnley MK, Chua HH, Chambers JM, Kenny S, Bottova I, Tilley L,Mcconville MJ. Mitochondrial metabolism of sexual and asexual blood stages of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. BMC Biol. 2013;11:67.

Maeda K, Nakajima Y, Motoyama T, Kitou Y, Kosaki T, Saito T, Nishiuchi T, Kanamaru K, Osada H, Kobayashi T,Kimura M. Effects of acivicin on growth, mycotoxin production and virulence of phytopathogenic fungi. Lett Appl Microbiol. 2014;59(4):377-83.

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.

Manchola NC, Rapado LN, Barison MJ,Silber AM. Biochemical Characterization of Branched Chain Amino Acids Uptake in *Trypanosoma cruzi*. J Eukaryot Microbiol. 2015.

Manchola NC, Rapado LN, Barison MJ,Silber AM. Biochemical Characterization of Branched Chain Amino Acids Uptake in *Trypanosoma cruzi*. J Eukaryot Microbiol. 2016;63(3):299-308.

Mantilla BS, Marchese L, Casas-Sanchez A, Dyer NA, Ejeh N, Biran M, Bringaud F, Lehane MJ, Acosta-Serrano A,Silber AM. Proline Metabolism is Essential for *Trypanosoma brucei brucei* Survival in the Tsetse Vector. PLoS Pathog. 2017;13(1):e1006158.

Mantilla BS, Paes LS, Pral EM, Martil DE, Thiemann OH, Fernandez-Silva P, Bastos EL,Silber AM. Role of Delta1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase supports mitochondrial metabolism and host-cell invasion of *Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem. 2015;290(12):7767-90.

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;77(7):3023-32.

Mates JM, Segura JA, Campos-Sandoval JA, Lobo C, Alonso L, Alonso FJ,Marquez J. Glutamine homeostasis and mitochondrial dynamics. Int J Biochem Cell Biol. 2009;41(10):2051-61.

Mathieu C, Macedo JP, Hurlimann D, Wirdnam C, Haindrich AC, Suter Grotemeyer M, Gonzalez-Salgado A, Schmidt RS, Inbar E, Maser P, Butikofer P, Zilberstein D,Rentsch D. Arginine and Lysine Transporters Are Essential for *Trypanosoma brucei*. PLoS One. 2017;12(1):e0168775.

Mazet M, Morand P, Biran M, Bouyssou G, Courtois P, Daulouede S, Millerioux Y, Franconi JM, Vincendeau P, Moreau P,Bringaud F. Revisiting the central metabolism of the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*: production of acetate in the mitochondrion is essential for parasite viability. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(12):e2587.

Michels PA,Hannaert V. The evolution of kinetoplastid glycosomes. J Bioenerg Biomembr. 1994;26(2):213-9.

Mogk S, Bosselmann CM, Mudogo CN, Stein J, Wolburg H,Duszenko M. African trypanosomes and brain infection - the unsolved question. Biol Rev Camb Philos Soc. 2017;92(3):1675-87.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983;65(1-2):55-63.

Nara T, Hashimoto M, Hirawake H, Liao CW, Fukai Y, Suzuki S, Tsubouchi A, Morales J, Takamiya S, Fujimura T, Taka H, Mineki R, Fan CK, Inaoka DK, Inoue M, Tanaka A, Harada S, Kita K,Aoki T. Molecular interaction of the first 3 enzymes of the de novo pyrimidine biosynthetic pathway of *Trypanosoma cruzi*. Biochem Biophys Res Commun. 2012;418(1):140-3.

Newsholme P, Lima MMR, Procopio J, Pithon-Curi TC, Doi SQ, Bazotte RB,Curi R. Glutamine and glutamate as vital metabolites. Braz J Med Biol Res. 2003;36(2).

Njamnshi AK, Seke Etet PF, Perrig S, Acho A, Funsah JY, Mumba D, Muyembe JJ, Kristensson K,Bentivoglio M. Actigraphy in human African trypanosomiasis as a tool for objective clinical evaluation and monitoring: a pilot study. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(2):e1525.

Oliveira De Souza J, Dawson A,Hunter WN. An Improved Model of the Trypanosoma brucei CTP Synthetase Glutaminase Domain-Acivicin Complex. ChemMedChem. 2017;12(8):577-79.

Paes LS, Mantilla BS, Barison MJ, Wrenger C,Silber AM. The uniqueness of the *Trypanosoma cruzi* mitochondrion: opportunities to identify new drug target for the treatment of Chagas disease. Curr Pharm Des. 2011;17(20):2074-99.

Paes LS, Suarez Mantilla B, Zimbres FM, Pral EM, Diogo De Melo P, Tahara EB, Kowaltowski AJ, Elias MC,Silber AM. Proline dehydrogenase regulates redox state and respiratory metabolism in *Trypanosoma cruzi*. PLoS One. 2013;8(7):e69419.

Paho PaHO. General information - Cagas Disease. 2017.

Pereira CA, Alonso GD, Ivaldi S, Silber A, Alves MJ, Bouvier LA, Flawia MM,Torres HN. Arginine metabolism in Trypanosoma cruzi is coupled to parasite stage and replication. FEBS Lett. 2002;526(1-3):111-4.

Pereira CA, Alonso GD, Ivaldi S, Silber AM, Alves MJ, Torres HN,Flawia MM. Arginine kinase overexpression improves *Trypanosoma cruzi* survival capability. FEBS Lett. 2003;554(1-2):201-5.

Pereira CA, Alonso GD, Paveto MC, Flawia MM,Torres HN. L-arginine uptake and L-phosphoarginine synthesis in *Trypanosoma cruzi*. J Eukaryot Microbiol. 1999;46(6):566-70.

Pereira CA, Alonso GD, Paveto MC, Iribarren A, Cabanas ML, Torres HN,Flawia MM. Trypanosoma cruzi arginine kinase characterization and cloning. A novel energetic pathway in protozoan parasites. J Biol Chem. 2000;275(2):1495-501.

Perez-Molina JA,Molina I. Chagas disease 2017.

Pham LV, Bryant JL, Mendez R, Chen J, Tamayo AT, Xu-Monette ZY, Young KH, Manyam GC, Yang D, Medeiros LJ,Ford RJ. Targeting the hexosamine biosynthetic pathway and O-linked N-acetylglucosamine cycling for therapeutic and imaging capabilities in diffuse large B-cell lymphoma. Oncotarget. 2016;7(49):80599-611.

Rajapakse AG, Ming XF, Carvas JM,Yang Z. The hexosamine biosynthesis inhibitor azaserine prevents endothelial inflammation and dysfunction under hyperglycemic condition through antioxidant effects. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009;296(3):H815-22.

Rassi A, Jr., Marin JaN,Rassi A. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2017;112(3):224-35.

Rassi A, Jr., Rassi A,Marcondes De Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). Infect Dis Clin North Am. 2012;26(2):275-91.

Rassi A,Marin-Neto. Chagas disease. The Lancet. 2010;375(9723):1388-402.

Rohloff P, Montalvetti A,Docampo R. Acidocalcisomes and the contractile vacuole complex are involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. J. Biol. Chem. 2004;279(50):52270-81.

Rohloff P, Rodrigues CO,Docampo R. Regulatory volume decrease in *Trypanosoma cruzi* involves amino acid efflux and changes in intracellular calcium. Mol. Biochem. Parasitol. 2003;126(2):219-30.

Ryley JF. Studies on the metabolism of the protozoa. 9. Comparative metabolism of blood-stream and culture forms of *Trypanosoma rhodesiense*. Biochem J. 1962;85:211-23.

Sasse R,Gull K. Tubulin post-translational modifications and the construction of microtubular organelles in *Trypanosoma brucei*. J Cell Sci. 1988;90 (Pt 4):577-89.

Saye M, Miranda MR, Di Girolamo F, De Los Milagros Camara M,Pereira CA. Proline modulates the Trypanosoma cruzi resistance to reactive oxygen species and drugs through a novel D, L-proline transporter. PLoS One. 2014;9(3):e92028.

Scalise M, Pochini L, Galluccio M,Indiveri C. Glutamine transport. From energy supply to sensing and beyond. Biochim Biophys Acta. 2016;1857(8):1147-57.

Schneider A, Plessmann U,Weber K. Subpellicular and flagellar microtubules of *Trypanosoma brucei* are extensively glutamylated. J Cell Sci. 1997;110 (Pt 4):431-7.

Seo J,Lee KJ. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. J Biochem Mol Biol. 2004;37(1):35-44.

Silber A, Tonelli R, Martinelli M, Colli W,Alves M. Active transport of L-proline in *Trypanosoma cruzi*. J. Eukaryot. Microbiol. 2002;49(6):441-6.

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;5(1):53-64.

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

Silber AM, Tonelli RR, Lopes CG, Cunha-E-Silva N, Torrecilhas AC, Schumacher RI, Colli W,Alves MJ. Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 2009;168(1):102-8.

Silber AM, Tonelli RR, Martinelli M, Colli W,Alves MJ. Active transport of L-proline in *Trypanosoma cruzi*. J Eukaryot Microbiol. 2002;49(6):441-6.

Smirlis D,Soteriadou K. Trypanosomatid apoptosis: 'Apoptosis' without the canonical regulators. Virulence. 2011;2(3):253-6.

Soberon M,Gonzalez A. Glutamine degradation through the omega-amidase pathway in Saccharomyces cerevisiae. J Gen Microbiol. 1987;133(1):9-14.

Soeters PB,Grecu I. Have we enough glutamine and how does it work? A clinician's view. Ann Nutr Metab. 2012;60(1):17-26.

Suarez I, Bodega G,Fernandez B. Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. Neurochem Int. 2002;41(2-3):123-42.

Suryavanshi S, Edde B, Fox LA, Guerrero S, Hard R, Hennessey T, Kabi A, Malison D, Pennock D, Sale WS, Wloga D,Gaertig J. Tubulin glutamylation regulates ciliary motility by altering inner dynein arm activity. Curr Biol. 2010;20(5):435-40.

Sylvester D,Krassner SM. Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Comp. Biochem. Physiol. B. 1976;55(3B):443-7.

Szeliga M,Obara-Michlewska M. Glutamine in neoplastic cells: focus on the expression and roles of glutaminases. Neurochem Int. 2009;55(1-3):71-5.

Tamborini L, Pinto A, Smith TK, Major LL, Iannuzzi MC, Cosconati S, Marinelli L, Novellino E, Lo Presti L, Wong PE, Barrett MP, De Micheli C,Conti P. Synthesis and biological evaluation of CTP synthetase inhibitors as potential agents for the treatment of African trypanosomiasis. ChemMedChem. 2012;7(9):1623-34.

Tanowitz HB, Scherer PE, Mota MM,Figueiredo LM. Adipose Tissue: A Safe Haven for Parasites? Trends Parasitol. 2017;33(4):276-84.

Teixeira MM,Yoshida N. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. Mol Biochem Parasitol. 1986;18(3):271-82.

Tetaud E, Bringaud F, Chabas S, Barrett MP,Baltz T. Characterization of glucose transport and cloning of a hexose transporter gene in *Trypanosoma cruzi*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1994;91(17):8278-82.

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;6(8):733-41.

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.

Urbina JA. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. Acta Trop. 2010;115(1-2):55-68.

Van Zandbergen G, Luder CG, Heussler V,Duszenko M. Programmed cell death in unicellular parasites: a prerequisite for sustained infection? Trends Parasitol. 2010;26(10):477-83.

Vinnars E, Bergstom J,Furst P. Influence of the postoperative state on the intracellular free amino acids in human muscle tissue. Ann Surg. 1975;182(6):665-71.

Weisz OA. Organelle acidification and disease. Traffic. 2003;4(2):57-64.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2017.

WHO. Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness). 2017.

Wise DR,Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. Trends Biochem Sci. 2010;35(8):427-33.

Wloga D,Gaertig J. Post-translational modifications of microtubules. J Cell Sci. 2010;123(Pt 20):3447-55.

Wloga D, Rogowski K, Sharma N, Van Dijk J, Janke C, Edde B, Bre MH, Levilliers N, Redeker V, Duan J, Gorovsky MA, Jerka-Dziadosz M,Gaertig J. Glutamylation on alpha-tubulin is not essential but affects the assembly and functions of a subset of microtubules in *Tetrahymena thermophila*. Eukaryot Cell. 2008;7(8):1362-72.

Xi P, Jiang Z, Zheng C, Lin Y,Wu G. Regulation of protein metabolism by glutamine: implications for nutrition and health. Front Biosci. 2011;16:578-97.

Yoshida N,Camargo EP. Ureotelism and ammonotelism in trypanosomatids. J Bacteriol. 1978;136(3):1184-6.

Yoshida N, Tyler KM,Llewellyn MS. Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. Trends Parasitol. 2011;27(10):459-66.

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;79(2):225-8.

Zhang J, Pavlova NN,Thompson CB. Cancer cell metabolism: the essential role of the nonessential amino acid, glutamine. EMBO J. 2017;36(10):1302-15.

Zhou Q, Hu H,Li Z. New insights into the molecular mechanisms of mitosis and cytokinesis in trypanosomes. Int Rev Cell Mol Biol. 2014;308:127-66.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG,Sturm NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol. 2012;12(2):240-53.