

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ANISSA DALIRY

Caracterização bioquímica e molecular de possíveis alvos
terapêuticos do metabolismo de aminoácidos em Tripanossomatídeos

Dissertação apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Marcel Ivan Ramirez Araya

Co-orientador : Dr. Ariel Mariano Silber

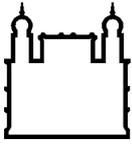
RIO DE JANEIRO

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ANISSA DALIRY

Caracterização bioquímica e molecular de possíveis alvos terapêuticos do metabolismo de aminoácidos em Tripanossomatídeos

ORIENTADOR: Dr. Marcel Ivan Ramírez Araya

CO-ORIENTADOR: Dr. Ariel Mariano Silber

Aprovada em: 13 /12 /2006

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Carlos Roberto Alves – Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dra. Ana Paula Cabral de Araújo Lima – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Hector Barrabin – Universidade Federal do Rio de Janeiro

RIO DE JANEIRO

2006

Agradecimentos

Às pessoas que me passam o amor pela ciência diariamente: Marcel Ramirez, Ingrid Evans-Osses, Igor Cestari e Patrícia Fampa. Em especial ao meu orientador, com sua sempre entusiasmante presença, por quem tenho grande respeito e admiração.

Ao co-orientador Ariel Silber pela sempre pronta ajuda e colaboração e por estar presente no dia da defesa da tese.

Aos meus queridos e amados pais Sima K. Ardestani Daliry e Sina Daliry pelo apoio e amor incondicionais e por me darem subsídios espirituais, psicológicos e materiais para a minha educação e formação profissional.

Ao meu irmão que sempre admirou o campo da biologia e as dificuldades relacionadas à área. Sou sempre feliz por ser conhecida como a irmã do Sobhan Daliry.

Aos amigos com quem compartilho a beleza da vida: Bianca N. Bello, Shorea Ardestani, Vahid Sherafat, Tahereh Sherafat, Karla Cristine, Lisi Dámaris, Aimeé Dubois, Ana Gabriela e André Kano. Cada etapa da vida na presença dessas pessoas me fez ter um pouco de cada um deles dentro de mim.

Ao Bruno Cosentino, por fazer parte de todos os aspectos da minha vida. Pela ternura e amor que me dedica e por aumentar a felicidade dos momentos alegres e diminuir a dificuldade dos momentos difíceis.

À Dr. Yara Traub-Cseko e seu grupo pelo convívio diário, em especial Erich Telleria, Amanda Lobo, Ana Bahia e Vicente Beteille.

À Dr. Cristina Henriques pela revisão da tese.

Aos colegas que sempre estiveram dispostos a ajudar: Silvana Santos e Herbert Guedes.

Todos esses agradecimentos são direcionados a Deus, por permitir a presença dessas pessoas em minha vida.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

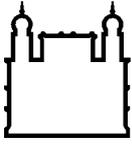
Caracterização bioquímica e molecular de possíveis alvos terapêuticos do metabolismo de aminoácidos em Tripanossomatídeos

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Anissa Daliry

Trypanosoma cruzi e *Leishmania* spp. são parasitas de grande relevância médica nas Américas e em países da Europa e Ásia. Esses organismos apresentam um ciclo de vida heteroxeno infectando hospedeiros vertebrados e invertebrados e, portanto, precisam se adaptar às diferentes condições ambientais. Dessa forma, diversas enzimas metabólicas, proteínas e transportadores participam no ajuste do metabolismo às condições ambientais e flutuações na disponibilidade de nutrientes do meio. Nesse aspecto, os aminoácidos são de importância vital para o metabolismo de tripanossomatídeos, porém pouco se sabe da dinâmica do transporte desses nutrientes para dentro da célula e existem algumas lacunas no estudo de algumas enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos. Portanto, um dos objetivos desse trabalho foi caracterizar bioquimicamente o transporte de L- glutamato, um aminoácido importante para o ciclo de vida desses organismos e as formas presentes no inseto de diversos tripanossomatídeos utilizam L-glutamato no metabolismo energético. A incorporação de glutamato ao longo do tempo foi estudada em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, foi possível observar que a incorporação é saturável e apresenta uma faixa de linearidade durante os primeiros 120 segundos de incubação com aminoácido radioativamente marcado, atingindo um platô após 15 minutos. Baseados nos dados de incorporação de L-glutamato em função da concentração de substrato foi encontrada uma $V_{\text{máx}}$ de 0.123 ± 0.003 nmoles \times min⁻¹ por 20×10^6 células e uma K_M de 0.59 ± 0.04 mM. A atividade do transportador de L-glutamato é dependente da temperatura, com uma atividade basal a 10° C, que aumentou em torno de 8 vezes, a 40° C. Além disso mostramos que o transporte é dependente do pH extracelular, com uma atividade máxima em torno do pH 6, esses dados sugerem um possível simporte entre H⁺ e L-glutamato. Na presença do inibidor valinomicina, o transporte foi inibido em 50%, indicando que há uma dependência de K⁺ para o sistema de transporte de L-glutamato em *L. amazonensis*, o que diferencia esse sistema de outros já caracterizados. Os tripanossomatídeos são capazes de metabolizar L-glutamato para produção de energia, o fato de *L. amazonensis* incorporar L-glutamato com eficiência é um indicativo da relevância desse aminoácido no metabolismo desses parasitas. O outro objetivo do trabalho, se relaciona com a busca de alvos terapêuticos em potencial no metabolismo de aminoácidos em *Trypanosoma cruzi*. A asparagina é de importância vital para a síntese correta de proteínas e para processos de modificações pós-traducionais como N-glicosilação. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos cinéticos de enzimas envolvidas no metabolismo de asparagina em tripanossomatídeos. No presente trabalho, identificamos no genoma de *T. cruzi*, uma enzima capaz de sintetizar asparagina a partir de aspartato, a Asparagina Sintetase (AS), já descrita em outros organismos. Além disso, também identificamos uma sequência codificante correspondente a enzima L-Asparaginase (L-Asp), que cataliza a reação de hidólise de asparagina, liberando aspartato e amônio. Foi observado que as enzimas são conservadas em tripanossomatídeos, porém possuem baixa homologia com as enzimas de outros organismos. Enquanto a AS está presente tanto em *Leishmania* spp, *T. cruzi* como em espécies de *T. brucei*, L-Asp está ausente apenas em parasitas do complexo *T. brucei*. Interessantemente, tanto a AS quanto a L-Asp apresentam entre 4% e 21% de similaridade com as mesmas enzimas em humanos, o que as torna alvos promissores para o desenho de fármacos. Essas enzimas foram expressas em bactérias para produção da proteína recombinante, e a L-Asp também está sendo expressa em *T. cruzi* para análise do fenótipo dos protozoários transgênicos. Através de Southern Blot foi observado que L-Asp de *T. cruzi* é um gene de cópia única, o que facilita abordagem de geração de mutantes nulos para sua caracterização funcional. Observamos também que é um gene que está presente tanto em parasitas do grupo *T. cruzi* I como *T. cruzi* II, apontando evidências de um gene importante para o metabolismo de ambos os grupos genotípicos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Biochemical and molecular characterization of possible therapeutic targets against Trypanosomatids in the amino acid metabolism

ABSTRACT

Anissa Daliry

Trypanosoma cruzi and *Leishmania* spp. are parasites of public health importance in Latin America, Europe and Asia countries. These organisms have heteroxenic life cycle, which involves several developmental stages in vertebrate and invertebrate hosts. Therefore, they have to adjust and respond to nutrient availability in the environment and several metabolic enzymes, transporters and regulatory proteins should be expressed, to tune the metabolism to nutrient fluctuations. In this respect, their metabolism is largely based on amino acid consumption, but little is known about its dynamic of transport and some enzymes involved in amino acid metabolic pathways need investigation. Thus, one goal of this study was perform the biochemical characterization of L-glutamate transport in promastigotes of *Leishmania amazonensis*, the insect form, capable to metabolize L-glutamate as energy source. Time course curve of radiolabeled L-glutamate incorporation demonstrated that L-glutamate uptake is linear for 120 seconds and achieve a plateau after 15 minutes. Substrate saturation curves were performed and a V_{max} of 0.123 ± 0.003 nmoles \times min⁻¹ per 20×10^6 cells and a $K_m = 0.59 \pm 0.04$ mM were estimated. L-glutamate transport is temperature dependent, displaying basal activity at 10° C, increasing around 8 times at 40° C. Besides, L-glutamate transport is pH dependent, demonstrating optimum activity around pH 6, which point to a symport between H⁺ and L-glutamate. The uptake was inhibited by 50% in the presence of valinomicine, indicating that L-glutamate transport system in *L. amazonensis* is K⁺ dependent, which distinguish this L-glutamate transport system from others. In Trypanosomatids L-glutamate in associated with energetic metabolism, and the fact that *L. amazonensis* incorporates L-glutamate efficiently, can be an indicative of the relevance of such amino acid for parasite metabolism.

Another focus of the present work was the search for enzymes in *Trypanosoma cruzi* amino acid metabolism, as potential target for future therapy. Asparagine has a vital importance for correct protein synthesis and for post-translational modification processes such as N-glycosylation in trypanosomatids. However, there no information about the kinetic mechanism of enzymes involved asparagine metabolism. In the present work, we identified and cloned the enzyme asparagine synthetase (AS) that synthesize asparagine from aspartate and already described in other organisms. Besides, we identified an open reading frame (ORF) that correspond to L-Asparaginase (L-Asp), which catalyzes asparagine hydrolysis reaction, releasing aspartate and ammonium. It was observed that these enzymes are conserved in trypanosomatids, however they are highly divergent when compared to other organisms. Nevertheless, while AS is present in *Leishmania* spp., *T. cruzi* and also in *T. brucei*, L-Asp is absent from *T. brucei* complex parasites. Interestingly, Asparagine Synthetase and L-Asparaginase display around 4-21 % of similarity with the same enzymes in humans, which make them promising targets for drugs design. These enzymes were expressed into bacteria to produce recombinant enzyme, and L-Asp was also expressed in *T. cruzi* to evaluate the transgenic phenotype. Southern-blot analysis was performed and it was observed that *T. cruzi* L-Asp is a single copy gene, to allow null mutant strategies for functional characterization. We also observed that the gene is present in *T. cruzi* TcI as well as *T. cruzi* TcII groups, which points to its importance for the metabolism of both genotype groups.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Introdução aos tripanossomatídeos

Os tripanossomatídeos compreendem um vasto grupo de protozoários parasitas da ordem Kinetoplastida, alguns dos quais causam importantes doenças em humanos (W.H.O. 2006). Dentro da família Trypanosomatidae, os parasitas de importância médica nas Américas são: o *Trypanosoma cruzi* (agente causador da Doença de Chagas) e as espécies de *Leishmania* spp. (causadores das Leishmanioses cutâneas e viscerais). Estes parasitas apresentam um ciclo de vida digenético, passando por diferentes estágios celulares, alterando entre um hospedeiro invertebrado e um hospedeiro vertebrado (Fig. 1.1).

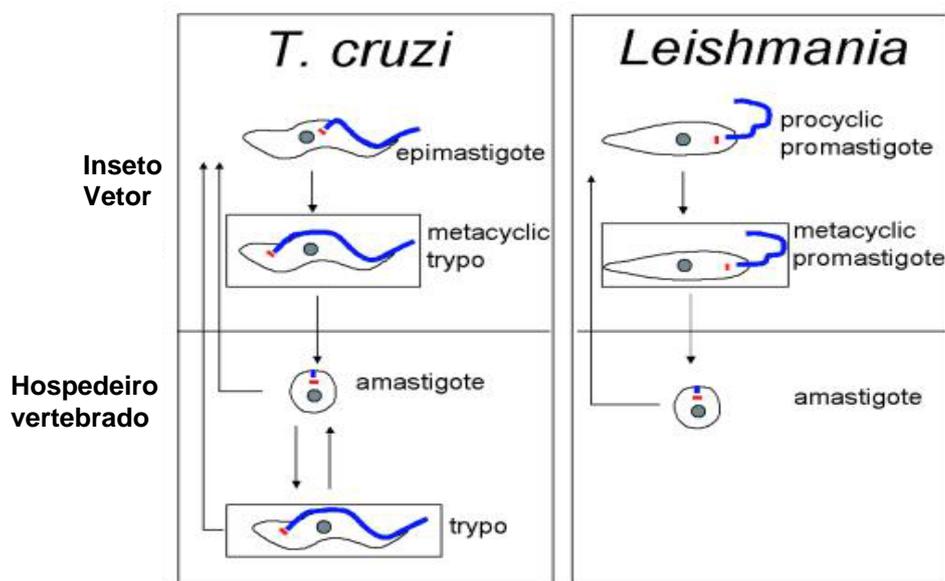


Figura 1.1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* sp. O inseto vetor de *T. cruzi* e *Leishmania* são: o inseto reduvídeo (*Triatoma*) e os insetos do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, respectivamente. A maioria das formas de *T. cruzi* presentes no hospedeiro mamífero reside dentro do citoplasma de um número variado de células enquanto que as formas amastigotas de *Leishmania* permanecem no fagolisossomo de macrófagos. As formas proliferativas e não proliferativas (em caixa) e as respectivas localizações do flagelo (azul) e do cinetoplasto (vermelho) relativas ao núcleo (cinza) estão indicadas. Trypo, tripomastigota. Fonte: *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002 Mar;66(1):122-54.

Todos são transmitidos no momento do repasto sanguíneo de insetos vetores e são capazes de invadir as células do tecido do hospedeiro mamífero. A sobrevivência desses parasitas nesses diferentes ambientes requer um eficaz funcionamento de transportadores de nutrientes e de outras macromoléculas para seu sucesso metabólico (Mc Conville MJ 2002). Como os parasitas representam um grupo eucariótico altamente divergente, o estudo da maquinaria molecular e seu

funcionamento bioquímico, provê um entendimento sobre a conservação de processos e moléculas entre diferentes organismos durante a evolução dos eucariotos.

1.1.1. *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas nas Américas

Atualmente, a Doença de Chagas é endêmica em 18 países das Américas (Fig. 1.2) (W.H.O. 2006). Cerca de 18 milhões de pessoas estão infectadas e mais de 100 milhões estão sob risco de contrair a infecção (W.H.O. 2006).

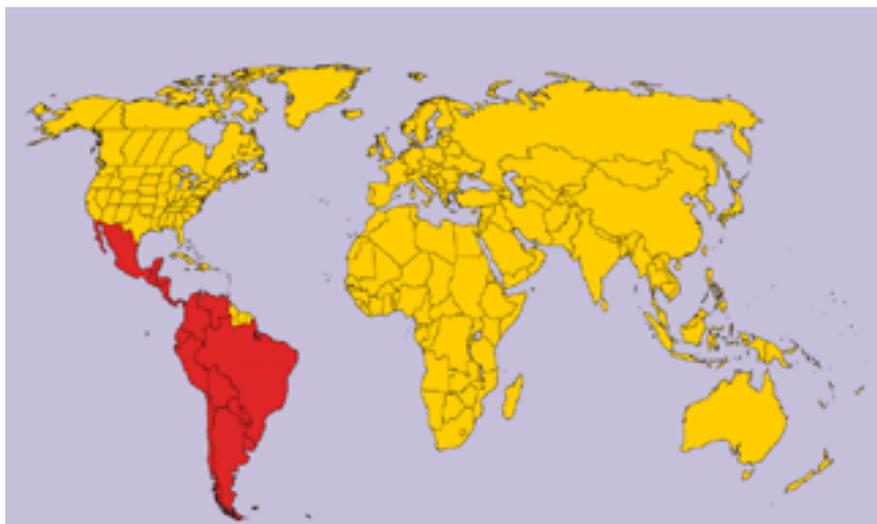


Figura 1.2. Distribuição geográfica da Doença de Chagas. Os países endêmicos estão indicados em vermelho. Fonte: www.who.int/tdr.

As características bioquímicas (isoenzimas), moleculares (polimorfismo de DNA, variabilidade das seqüências de RNA ribossomal e mini-exons) e epidemiológicas (tipo de transmissão) têm sido utilizadas para dividir *T. cruzi* em dois grupos: *T. cruzi* II, associado a um ciclo de vida doméstico, onde infecta, principalmente, hospedeiros vertebrados mamíferos placentários, e *T. cruzi* I, associado a um ciclo predominantemente selvagem, embora este parasita infecte tanto hospedeiros mamíferos quanto marsupiais (Fernandes O e col 1998, Zingales B e col 1998, Buscaglia C e Di Noia JM 2003).

O conhecimento acerca das características dos grupos de *T. cruzi* com relação à patogenicidade, resistência ao sistema imunológico do hospedeiro, diversidade de hospedeiros e ciclo de vida é fundamental para definir estratégias para o controle da transmissão da Doença de Chagas (Buscaglia C e Di Noia JM 2003).

A doença de Chagas é caracterizada principalmente pela presença de uma fase aguda e uma fase crônica, porém em alguns casos o paciente apresenta a chamada forma indeterminada (Girones N e col 2005). A fase aguda tem duração de dois meses e é caracterizada pela presença de sintomas clínicos não específicos como hepatoesplenomegalia, febre e dores musculares. Entretanto, alguns pacientes apresentam sinais característicos como o "chagoma" ou o sinal de "Romaña", como produto de reações inflamatórias no tecido conjuntivo ocular e na pele, respectivamente. A fase crônica é caracterizada por um processo inflamatório que compromete o tecido cardíaco, podendo levar a morte por infarto. A fase indeterminada da doença é definida pela ausência de manifestações clínicas, radiológicas e eletrocardiográficas de acometimento cardíaco ou digestivo (Girones N e col 2005).

Não existem quimioterápicos eficazes contra a Doença de Chagas nas fases indeterminadas e crônicas. A droga de primeira escolha é o Benzonidazol na fase aguda, porém, esta droga provoca efeitos colaterais incluindo náusea, vômito e reações alérgicas (Pinto Dias JC 2006). O mecanismo de ação do benzonidazol é baseado na inibição da transcrição e síntese protéica nas formas tripomastigotas metacíclicas e amastigotas (Cançado JR 2002).

1.1.2. *Leishmania* spp. e as Leishmanioses no Mundo

O gênero *Leishmania* pertence à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. Das 20 espécies de *Leishmania*, até o momento identificadas, 15 causam doenças em humanos (W.H.O. 2006). Atualmente, 66 países do Velho Mundo e 22 do Novo Mundo são endêmicos para leishmanioses humanas (Fig. 1.3), com uma incidência anual de 1 a 1.5 milhões de casos de Leishmanioses cutâneas e 500 mil casos de Leishmaniose visceral (Desjeux P 2004).

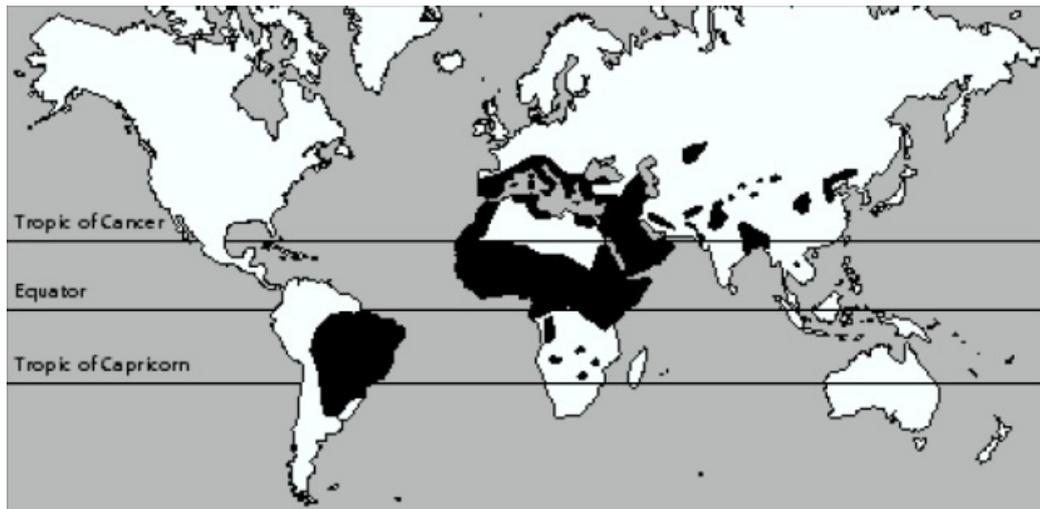


Figura 1.3. Distribuição de Leishmanioses no Mundo. Em preto, estão representadas as áreas endêmicas. Fonte: <http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/>

As leishmanioses humanas apresentam diversas manifestações clínicas. A Leishmaniose visceral, causada por *Leishmania donovani* no Novo Mundo e por *Leishmania infantum* tanto no Novo como no Velho Mundo, é a forma mais severa, que se não tratada pode levar à morte.

A Leishmaniose cutânea no Velho Mundo é causada por *Leishmania major* e *L. infantum* e no Novo Mundo por *Leishmania brasiliensis*, *L. guyanensis*, *Leishmania naiffi*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. lainsoni*, *L. infantum* e *L. amazonensis*, entre outras (Gramiccia M e Gradoni L 2005).

A *Leishmania amazonensis*, originalmente descrita na região Amazônica, apresenta uma ampla distribuição geográfica em diferentes estados do Brasil e outros países da América Latina. Os reservatórios primários são roedores silvestres, que apresentam infecção subpatente. Os hospedeiros secundários são os marsupiais e o principal vetor é a *Lutzomyia flaviscutellata*. As principais manifestações clínicas são as úlceras cutâneas difusas ou localizadas (Costa e col 2005).

O tratamento de Leishmanioses apesar de todos os esforços ainda é ineficaz e as drogas existentes apresentam diversos efeitos colaterais e alguns pacientes desenvolvem resistência ao tratamento.

As drogas de primeira escolha para o tratamento são os antimoniais, seguidos da Anfotericina B, Pentamidina, Miltefosina e azóis de uso oral (W.H.O 2004).

1.2. Metabolismo intermediário em *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania*

spp.

1.2.1. Metabolismo de glicose e aminoácidos

Trypanosoma cruzi e *Leishmania* spp. são capazes de utilizar carboidratos e aminoácidos como fonte de carbono e energia. Preferencialmente, catabolizam glicose, e após a exaustão de carboidratos, ocorre uma mudança para o metabolismo de aminoácido, cujo produto principal é a amônia (Cazzulo JJ 1994).

Sabe-se que estes parasitas não apresentam reservas intracelulares de glicose, portanto a glicose precisa ser importada do ambiente extracelular, através de sistemas de transporte. As proteínas, por sua vez, podem ser incorporadas através de endocitose (Soares MJ e De Souza WJ 1988) e armazenadas em reservossomos (Sant'Anna C e col 2004). Um esquema resumido do metabolismo intermediário está representado na Figura 1.4.

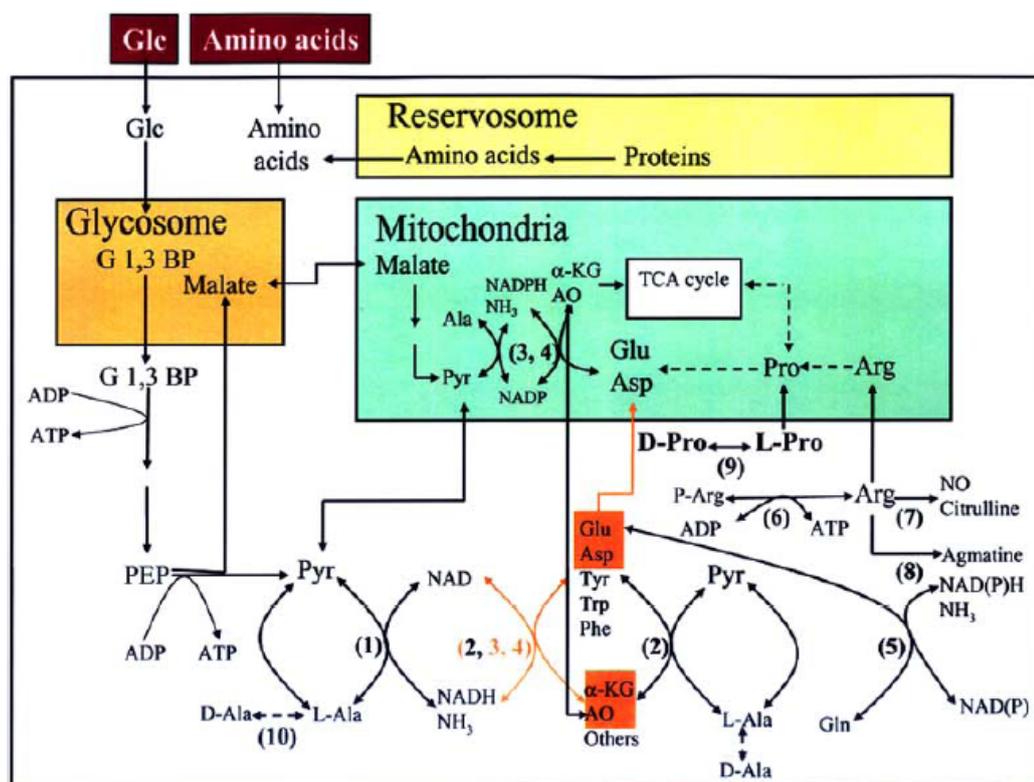


Figura 1.4. Representação esquemática de metabolismo (intermediário) em *Trypanosoma cruzi*. As linhas preenchidas representam as vias metabólicas ou reações bioquímicas caracterizadas experimentalmente. As linhas pontilhadas representam reações sugeridas baseadas no genoma de *Trypanosoma cruzi*. G 1,3 BP: Gliceraldeído 1,3 Bifosfato, PEP: Fosfoenol piruvato, α -KG: α -cetoglutarato, OA: ácido oxaloacético, TCA cycle: ciclo do ácido cítrico, 1: alanina aminotransferase (ALAT), 2: tirosina aminotransferase (TAT), 3: glutamato desidrogenase, 4: aspartato aminotransferase, 5: glutamina sintetase, 6: arginina kinase, 7: óxido nítrico sintetase, 8: arginina descarboxilase, 9: prolina recemase, 10: alanina racemase. Fonte: *Current Drug Targets – Infectious Disorders* 2005, 5, 53-64.

Uma característica única da ordem Kinetoplastida é a compartimentalização de algumas enzimas da glicólise em uma organela denominada glicosomo (Oppenheimer FR e Borst P 1977). A glicose é captada através de transportadores de hexose, que estão presentes em quantidade variável de acordo com a espécie. Até o momento, um único transportador de hexose foi descrito para *T. cruzi*, enquanto que para *Leishmania* spp. foram encontrados três (Barrett MP e col 1998 e Piper RC e col 1995). Uma vez dentro do citoplasma a glicose é transportada ao glicosomo para ser oxidada. Porém a cinética, os mecanismos e as proteínas envolvidas nessa etapa de transporte ainda não foram elucidados (Silber AM e col 2005).

Uma vez dentro do glicosomo, cada molécula de glicose é convertida em duas moléculas de gliceraldeído - 1,3 - bifosfato, por enzimas glicolíticas. O G 1,3 BP é transportado para o citoplasma, por um mecanismo também desconhecido, e convertido a fosfoenol piruvato, que por sua vez pode:

- a) ser convertido a piruvato ou
- b) ser transportado de volta ao glicosomo, sendo convertido à oxaloacetato, pela fosfoenol piruvato carboxi quinase e posteriormente a malato, pela malato desidrogenase.

O piruvato pode ser translocado para dentro da mitocôndria e entrar no Ciclo de Krebs ou ser transaminado no citoplasma e ser convertido a alanina (Cazzulo JJ 1992, Cazzulo JJ 1994). O malato deixa o glicosomo e pode entrar na mitocôndria, sendo convertido a piruvato, ou pode voltar ao citoplasma e também ser convertido a piruvato. O piruvato formado na mitocôndria será metabolizado pelo ciclo de Krebs ou será transaminado gerando alanina. O piruvato citoplasmático também pode ser transaminado e gerar alanina (Urbina JA 1994).

Trypanosoma cruzi e *Leishmania* spp. apresentam uma dependência essencial do metabolismo de aminoácidos para diferentes funções celulares (Cazzulo JJ 1994). Os trabalhos iniciais de Zeledón R (1960) e Sylvester D e Krassner SM (1976) demonstraram que as formas epimastigotas de *T. cruzi* são capazes de oxidar diversos aminoácidos. Foi demonstrado também que a adição de três aminoácidos, prolina, glutamato e aspartato, a um meio definido promove a diferenciação de formas epimastigotas para formas tripomastigotas metacíclicas (metaciclogêneses) (Contreras VT e col 1985).

Os aminoácidos podem ser obtidos por três diferentes vias: biossíntese a partir de precursores metabólicos, transporte ativo a partir do meio extracelular ou

degradação de proteínas intracelulares ou do hospedeiro.

Uma das maiores famílias de transportadores conhecida é a AAAP (aminoacid/auxin permease: TC 2.A.18) (Bouvier LA e col 2004). Uma família que é conhecida por utilizar o potencial eletroquímico para realizar o transporte de metabólitos, e inclui centenas de proteínas encontradas em fungos, plantas e animais (Reizer J e col 1993, Reizer J e col 1994, Young G e col 1999). Esses transportadores são capazes de transportar um único ou em alguns casos um amplo espectro de mais de 20 aminoácidos, incluindo D-isômeros. Todos os membros da família AAAP encontrados em eucariotos possuem um tamanho entre 400 a 500 aminoácidos e têm 12 alfa-hélices transmembranas (Reizer J e col 1993, Reizer J e col 1994, Young G e col 1999).

Bouvier LA e col (2004) encontraram, utilizando uma estratégia de bioinformática mais de 60 genes codificadores para possíveis membros da família AAAP em *T. cruzi*. A presença de RNAm de alguns desses possíveis transportadores já foi demonstrada, tanto na fase epimastigota como tripomastigota (Bouvier LA e col 2004).

Sabe-se que *Leishmania* spp. apresenta um pool intracelular de aminoácidos de aproximadamente 300mM (Vieira LL e Cabantchik ZI 1995). Sendo os principais responsáveis por esse pool a alanina (50 a 70mM), a prolina (3mM), a ornitina (34mM), o glutamato (14mM) e a Glicina (14mM). Esse acúmulo pode ser utilizado como reserva de intermediários para a síntese protéica, como fonte de energia, e para a osmorregulação (Sánchez Olea R e col 1991, Kirk K e Kirk J 1993, Darling T 1990). Recentemente, Akerman M e col (2004) clonaram 8 genes de aminoácido permeases de *Leishmania major* e demonstraram que existem motivos específicos nos transportadores do gênero *Leishmania* (L motifs), e um motivo que é comum entre os transportadores da família Trypanosomatidea e os mamíferos (N motifs) (Slotboom DJ e col 1999).

O primeiro gene que codifica para uma putativa aminoácido permease caracterizado molecularmente em *Leishmania* foi o gene *La-PAT1*, de *Leishmania amazonensis* (Geraldo MV e col 2004). Esse gene é conservado nas regiões transmembranares em várias espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma*, porém apresenta divergências na região N-terminal. *La-PAT1* é um gene de cópia única e é mais expresso na forma amastigota. Porém não se sabe que metabólitos esse membro da família AAAP é capaz de transportar.

Alguns estudos de transportadores de aminoácidos têm sido feitos nas últimas décadas, explorando os aspectos bioquímicos desses sistemas de transporte em

diversos estágios de vida de *T. cruzi* e *Leishmania* sp. De acordo com esses estudos, abaixo estão descritos os mecanismos envolvidos no metabolismo de aminoácidos em *T. cruzi* e *Leishmania* sp..

1.2.2. Metabolismo de aminoácidos em *Leishmania* sp.

a) Metabolismo de L-prolina

A hemolinfa da maioria dos insetos contém uma grande quantidade de prolina e arginina (Brusell E 1970, Cunningham I e Slater JS 1974). Os insetos utilizam a prolina como uma das principais fontes de energia para diversas atividades, como contração muscular (Brusell E 1970). Promastigotas de *Leishmania* sp. Adaptaram-se a esse ambiente e são capazes de utilizar a prolina como sua maior fonte de energia (Mukkada AJ e col 1974, Ter Kuile BH e Opperdoes FR 1992).

Os parâmetros bioquímicos dos transportadores de prolina em *Leishmania donovani* foram recentemente caracterizados (Mazareb e col S 1999). Existem três sistemas de transporte de prolina que apresentam propriedades bioquímicas diferentes, denominado Sistema A e B (promastigotas) e Sistema C (amastigotas). Enquanto os sistemas A e B apresentam atividade maior em pH 7.0 e o transporte ocorre em maiores taxas, o sistema C apresenta atividade maior em pH 5.5 e o transporte é menor. Esse fato sugere que o Sistema A e B seja específico para as formas promastigotas enquanto que o Sistema C é específico para amastigotas. A diferença entre o sistema A e B de formas promastigotas é que apenas o sistema A apresenta dependência de cátions para seu funcionamento. Diferentes aminoácidos inibem a atividade de transporte de L-prolina, porém o nível de inibição não está relacionado com o grupo de aminoácido (neutro, ácido ou básico) (Mazareb e col S 1999).

Em *Leishmania major*, a incorporação de L-prolina é bastante reduzida na fase estacionária quando comparada à fase *log* de crescimento (Vieira LL e Cabantchik ZI 1995). O transporte não é afetado pelo íon Na^+ , porém com o desacoplamento do gradiente de H^+ , a incorporação e o acúmulo de L-prolina são consideravelmente afetados. A variação de pH não afeta o sistema de transporte, portanto em promastigotas de *Leishmania major* o fator determinante do transporte de L-prolina é o potencial de membrana gerado pela bomba de prótons. Espécies de *Leishmania* possuem uma vigorosa bomba de H^+ que hiperpolariza a membrana plasmática e

contribui para a homeostase da célula (Vieira LL e col 1995). A maior parte de L-prolina incorporada por esses parasitas é convertida a glutamato (19%), enquanto que 7% são convertidos à alanina (Vieira LL e Cabantchik ZI 1995).

b) Metabolismo de L-arginina

A L-arginina é um aminoácido essencial, e um dos principais aminoácidos utilizados por promastigotas de *Leishmania* sp. em suas funções metabólicas (Blum JJ 1992). Sabe-se que sua incorporação causa um consumo de oxigênio em níveis similares ao da D-glicose (Bera T 1987).

Em *Leishmania donovani*, o gene *LdAAP3* codifica para uma proteína de membrana de 480 aminoácidos, com 11 domínios transmembranares preditos por ferramentas de bioinformática, e pertence à família AAP (Shaked-Mishan P e col 2006). A proteína codificada pela *LdAAP3* é um transportador de alta especificidade pela L-arginina. Esse gene apresenta alta similaridade com AAP's de *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. major*, *L. infantum* e *L. amazonensis* e em *L. donovani* está presente em duas cópias. O transporte é influenciado pelo pH apresentando um pH ótimo em torno de pH 5.5. A K_M encontrada foi de 1.9 mM e a $V_{máx}$ de 16.9 pmoles x min⁻¹ por 10⁶ células.

O transporte de L-arginina em promastigotas de *L. donovani* é ativo e apresenta dependência de Na⁺ (Kandpal M e col 1995). A temperatura ótima de atividade do transportador está entre 25 e 30° C, declinando em temperaturas acima de 37°C. A K_M é de 14.28µM e a $V_{máx}$ é 1.66 pmoles x min⁻¹ por 10⁶ células. Em pH 7.5 o transporte ocorre em maiores taxas. Apenas 20% da L-arginina está associada à formação de proteínas, enquanto que 80% permanecem na fração solúvel, que pode conter aminoácidos intactos, assim como outros produtos do metabolismo/catabolismo do parasita, como poliaminas. A pentamidina, uma diamidina aromática, é capaz de inibir o transporte de arginina em promastigotas de maneira dose dependente, apresentando uma IC₅₀ de 40µM. De acordo com as descrições feitas do transportador de arginina em *L. donovani*, o sistema é bastante específico, pois a captação de L-arginina não foi inibida na presença de outros aminoácidos testados (Kandpal M e col 1995).

A arginina, em promastigotas de *Leishmania* sp., é um precursor de ornitina, que por sua vez é um precursor da síntese de poliaminas. Poliaminas são cátions orgânicos encontrados em virtualmente toda célula eucariótica e são essenciais em processos celulares como crescimento, diferenciação e biossíntese de macromoléculas

(Tabor CW e Tabor H 1984, Pegg AE 2006).

Em *L. mexicana* foi mostrado que mutantes arginase nulos são comprometidos na sua viabilidade e que a letalidade desses mutantes pode ser diminuída pela adição de putrescina, ornitina ou spermidina, ou complementarização epissomal do gene de arginase (Roberts SC e col 2004). A arginase de *L. mexicana* está localizada no glicossomo, e o direcionamento pra essa organela é mediada por um sinal de direcionamento do tipo peroxissomal (PTS-1) (Roberts SC e col 2004).

Mais recentemente, Kropf P e col (2005) demonstraram que a arginase da célula do hospedeiro é capaz de regular o crescimento de *Leishmania major* pois afeta diretamente a síntese de poliaminas em macrófagos, que são utilizados pelo parasita dentro da célula.

c) Metabolismo de Leucina

L. mexicana utiliza a leucina como principal fonte de carbono para a biossíntese de esteróis tanto na fase amastigota como na fase promastigota (Ginger ML e col 1999) enquanto que alguns aminoácidos cetogênicos junto com a glicose, podem prover a acetil-CoA necessária para a síntese de ácidos graxos. Os esteróis são requeridos para a regulação da fluidez de membrana em células eucarióticas (Bloch KE 1983) e na organização de algumas proteínas de membrana localizadas na face externa da membrana plasmática (Varma R e Mayor S 1998, Friedrichson T e Kurzchalia TV 1998). Em eucariotos inferiores também há evidências de que os esteróis estão envolvidos com o controle do ciclo celular (Pinto WJ e Nes WR 1983).

A razão pela qual *L. mexicana* é capaz de incorporar leucina diretamente na rota biossintética de esteróis, ao invés de convertê-la primeiro a acetil-CoA, ainda não é conhecida, porém pode ser uma considerável vantagem na economia de energia.

d) Metabolismo de Glutamato

Pouco se sabe sobre o metabolismo de glutamato em *Leishmania* sp. Sabe-se que promastigotas de *L. major* são capazes de oxidar esse aminoácido, e que essa reação não é afetada pela presença de Ca^{++} , nem pelo tratamento com Antimicina A, um inibidor da cadeia respiratória (Blum JJ 1996).

Um estudo mostrou que parasitas resistentes à droga Gibenclamida apresentam um aumento no consumo de aminoácidos como fonte de energia e um aumento na

expressão de enzimas como a glutamato desidrogenase (Uzcategui NL e col 2005). Um outro grupo demonstrou a atividade de uma aminotransferase de amplo espectro capaz de usar o aspartato e o glutamato como substrato (Vernal J e col 1998). Em *Leishmania tarentolae*, uma glutamato desidrogenase mitocondrial foi identificada, capaz de interagir com RNA guias (Bringaud F e col 1997).

e) Canais de aminoácidos e Aminoácidos Permeases.

Uma importante característica de promastigotas de *Leishmania* sp. é a habilidade de se adaptar a flutuações durante o seu desenvolvimento no trato digestivo do inseto vetor. Os parasitas mantêm sua composição interna estável e controlam o volume celular através do funcionamento de sistemas de transportes que estão sendo elucidados (Burrows C e Blum JJ 1991).

Quando promastigotas de *Leishmania* sp. são expostos a um decréscimo da osmolalidade, elas iniciam um processo de compensação através de um encolhimento por uma redução de volume regulada (Vieira LL e col 1996). Esse mecanismo está regulado por canais de aminoácidos aniônicos ativados pela hipotonicidade do meio através dos quais aminoácidos neutros e ácidos podem ser liberados da célula para o ambiente extracelular (Vieira LL e col 1997). O funcionamento desses canais é dependente de temperatura, apresentando uma temperatura ótima em torno de 15 - 30° C (Vieira LL e col 1996). O sistema opera de forma análoga a canais ativados pelo volume celular que controlam o efluxo de pequenos osmolitos orgânicos em células de mamíferos (Jackson PS e Strange K 1996). Os aminoácidos que são preferencialmente liberados são o glutamato (29%), a glicina (34%), a alanina (42%), o aspartato 43%, a treonina (60%) e a prolina (60%) (Vieira LL e col 1996). Sendo a alanina o aminoácido mais abundante na célula, ela deve ser o maior responsável pela regulação do volume celular.

1.2.3. Metabolismo de Aminoácidos em *Trypanosoma cruzi*

a) Metabolismo de L-prolina

A L-prolina é um relevante metabólito em tripanossomatídeos, desde que é utilizado como principal fonte de energia e de carbono na forma epimastigota (Cazzulo JJ 1994). Sylvester D e Krassner SM (1976) demonstraram que L-prolina é oxidada

principalmente após a exaustão de glicose e é metabolizada através do Ciclo de Krebs. Estudos na forma epimastigota de *T. cruzi* mostraram que a prolina pode ser convertida em 5 intermediários do ciclo de Krebs (citrato, isocitrato, malato, succinato e oxaloacetato), além de poder ser convertida a piruvato, glutamato e aspartato, que são rapidamente metabolizados pelo parasita (Sylvester D e Krassner SM 1976). Também é sugerido que haja uma relação entre a prolina e a biossíntese de cisteína e lisina (Sylvester D e Krassner SM 1976).

Particularmente importante é o envolvimento da L-prolina na metacicloogêneses (Contreras VT e col 1985). A L-prolina está presente em altas concentrações na urina do inseto vetor (Kollien AH e Schaub GA 2000), que é o ambiente onde ocorre a metacicloogêneses. Ainda não está claro se a L-prolina funcionaria como um sinalizador celular ou se o seu papel seria apenas como fonte de carbono e energia para o remodelamento celular que ocorre durante a metacicloogêneses (Silber AM e col 2002).

O transporte de L-prolina foi recentemente caracterizado em formas epimastigotas de *T. cruzi* por Silber AM e col, 2002. Foi demonstrado que existem dois sistemas de transporte, chamados de Sistema A e Sistema B, com K_M de 0.31mM e 1.36mM, respectivamente. O sistema A apresenta um pequeno aumento na taxa de transporte de acordo com o aumento da temperatura (20 - 40°C), e o sistema B não apresenta diferença entre 20 - 32.5°C, porém apresenta um aumento da atividade em altas temperaturas, sendo o pico de atividade a 40°C. Nenhum dos sistemas de transporte de L-prolina foi influenciado pela presença de Na^+ e K^+ no meio extracelular. O sistema A é influenciado pela variação do pH, apresentando atividade ótima entre pH 4.5 e 5, enquanto que o sistema B não é influenciado pelo pH. Ambos os sistemas são sensíveis a inibidores da cadeia respiratória e de fosforilação oxidativa, sugerindo que sejam transportadores ativos (Silber AM e col 2002).

Recentemente, uma forma intermediária entre as formas amastigotas e tripomastigotas foi descoberta. Essa forma epimastigota-like apresenta características das formas epimastigotas e das formas amastigotas, porém com morfologia típica de epimastigotas (Almeida-de-Faria M e col 1999, Tyler KM e Engman DM 2001). Tonelli RR e col (2004) demonstraram que a L-prolina influencia a liberação de tripomastigotas de cultura, apresentando uma visível dose-dependência. Junto com outros resultados os autores postularam a necessidade de L-prolina na etapa de diferenciação de amastigotas a tripomastigotas sanguíneos.

A importância do metabolismo de prolina foi reforçada com a recente descoberta da prolina racemase em *T. cruzi* (Reina-San Martin B e col 2000), levantando a

possibilidade da existência de metabolismo de D-aminoácidos em *T. cruzi*. Em *T. cruzi* a enzima é encontrada em todas as fases de crescimento do parasita (Chamond N e col 2003). Foi sugerido que a prolina racemase tivesse um papel na compartimentalização química de prolina intracelular, que é a principal reserva energética para a diferenciação intracelular (Chamond N e col 2003). Além disso, a prolina racemase foi descrita como um importante mitógeno contra células B, sendo secretada pelas formas metacíclicas no momento da infecção, contribuindo para a evasão do sistema imune e persistência da doença pela ativação de linfócitos policlonais não específicos (Reina-San Martin B e col 2000). De acordo com os autores existem duas isoformas da enzima, que apresentam características bioquímicas diferentes, e são ambas independentes de co-fatores para sua atividade (Reina-San Martin B e col 2000).

b) Metabolismo de L-arginina

A L-arginina é um aminoácido dibásico e um substrato essencial para diversas rotas metabólicas e é importante para a liberação do excesso de nitrogênio celular. A L-arginina é um substrato em uma via alternativa de biossíntese de prolina, via ornitina e L-glutamato 5-semialdeído (Tabor CW e Tabor H 1984).

A L-arginina é essencial para o crescimento *in vitro* de epimastigotas (Dusanic DG 1992), sendo o transporte desse aminoácido mais intenso na fase *log* de crescimento, onde poderia ter um papel na replicação celular (Dusanic DG 1992).

T. cruzi é incapaz de sintetizar arginina, portanto o aminoácido deve ser obtido a partir do hospedeiro (Pereira CA e col 1999). Atualmente se sabe que *T. cruzi* transporta L-arginina através de dois sistemas principais, um de alta e um de baixa afinidade.

O sistema de baixa afinidade é regulado ao longo das fases de crescimento do parasita, apresentando um aumento de aproximadamente 3 vezes no nível de transporte em tripomastigotas, quando comparado com epimastigotas. A temperatura ótima é de 40° C e o transporte não é afetado pela presença de cátions monovalentes no meio extracelular (Canepa GE e col 2004). O sistema é dependente de um gradiente de H⁺ e independente de ATP, funcionando provavelmente com um mecanismo de simporte H⁺/arginina.

O sistema de alta afinidade apresenta uma K_M de 4.2µM, e sua atividade é bastante específica, sendo fracamente inibida na presença de L-homoarginina, D-

arginina, L-canavanina, L-ornitina e L-citrulina (Pereira e col 1999).

A L-arginina também está envolvida na produção de um série de intermediários bioativos tanto na célula hospedeira como no parasita, incluindo as poliaminas e o óxido nítrico (Peluffo G e col 2004). As poliaminas (agmatina, putrecina, espermidina e espermina) são aminas alifáticas de baixo peso molecular que estão amplamente distribuídas entre as espécies e têm papel na proliferação, diferenciação e síntese de macromoléculas. A L-arginina é oxidada pela óxido-nítrico sintetase, gerando o óxido nítrico e a citrulina (Peluffo G e col 2004).

A arginina quinase, um membro de uma família conservada de fosfotransferases, cataliza a transferência reversível do grupo fosforil do ATP para um acceptor guanidino, que pode ser tanto um aminoácido (ex. arginina) como uma carboxilato (ex. creatina). No caso do acceptor ser a arginina, o composto formado passa a ser chamado de fosfoarginina, que é a principal reserva de compostos fosforilados que podem ser utilizados em situações de stress nutricional (Pereira CA – stress oxidativo), em uma variedade de organismos invertebrados. Pereira CA e col (2000) demonstraram a presença de um gene de cópia única de arginina quinase em *T. cruzi*. A atividade da enzima é dependente de ATP e de um cátion divalente como Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Ca^{2+} . A atividade da enzima também foi detectada em *Trypanosoma rangeli*, *Herpetomonas muscarum*, e *Leptomonas samueli*, porém não foi detectada em *Crithidia fasciculata* e *Leishmania chagasi*.

Alonso GD e col (2001) descreveram a relação entre a regulação da arginina quinase e a mudança na composição do meio de cultura durante as fases de crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi*. De acordo com esse grupo a atividade da enzima aumenta 3 vezes entre o 3º e o 6º dia de crescimento, porém diminui na fase estacionária. A diminuição da glicose no meio de cultura coincide com o começo da liberação de amônio no meio, ao 6º dia de crescimento, sugerindo que nesse ponto há uma mudança de uma fonte de carbono de glicose para aminoácidos. Há também uma diminuição do pH do meio entre o 3º e 6º dia, que pode ser explicado pela liberação de succinato, lactato e acetato, produtos da fermentação aeróbica de glicose em tripanossomatídeos. A partir do 6º dia, há um aumento linear do pH do meio de cultura, indicando o ponto de início do metabolismo oxidativo de aminoácidos (Alonso GD e col 2001).

A expressão em sistema homólogo de arginina quinase de *T. cruzi*, aumenta a capacidade dos mutantes de crescerem e resistirem ao stress nutricional e a mudança de pH (Pereira CA e col 2003). A arginina quinase poderia ter um papel como um fator

de resistência quando expressa em organismos que não possuem a enzima, como bactérias e leveduras.

Um específico e eficaz inibidor de arginina quinase ainda não foi encontrado. A atividade de arginina quinase de *T. cruzi* foi inibida em apenas 50% na presença de catequinas de *Camellia sinensis* (chá verde) como demonstrado por Paveto C e col (2004). A atividade da arginina quinase também é fracamente inibida por análogos de arginina como agmatina, canavanina, nitroarginina e homoarginina (Pereira CA e col 2003).

Quando epimastigotas de *T. cruzi* são cultivados em meio contendo peróxido de hidrogênio apresentam um aumento em torno de 10 vezes na expressão da arginina quinase, demonstrando o papel dessa enzima na defesa contra o estresse oxidativo (Miranda MR e col 2006).

c) Metabolismo de Metionina e Serina

A serina e a metionina não estimulam o consumo de oxigênio por epimastigotas de *T. cruzi* (Sylvester D e Krassner SM 1976). Portanto, não há evidências do papel desses aminoácidos no metabolismo energético destes parasitas. É possível que a metionina esteja envolvida no metabolismo de poliaminas, mais especificamente na síntese de espermidina, porém ainda é necessário se provar bioquimicamente a existência dessa via.

Pouco se sabe do metabolismo de serina. Uma serina hidroximetiltransferase citosólica foi caracterizada, sendo capaz de converter serina e tetrahidrofolatos em glicina e 5,10 – metileno tetra-hidrofolato (Nosei C e Avila JL 1985). A serina também pode ser convertida a cisteína (Nozaki T e col 2001). Duas ORF's foram encontradas no genoma de *T. cruzi* que codificam para enoil-CoA hidratase, que cataliza a conversão de serina a piruvato (Silber AM e col 2005). Até o momento acredita-se que a serina seja parcialmente oxidada através do ciclo de Krebs (Hampton JR 1971).

d) Metabolismo de Alanina e Aspartato

O aspartato é metabolizado por *T. cruzi* (Zeledon R 1960, Sylvester D e Krassner SM 1976). Acredita-se que o aspartato seja convertido a glutamato, dentro ou fora da mitocôndria, e posteriormente seja processado pelo Ciclo de Krebs. Essa reação de transaminação é catalizada pela enzima aspartato aminotransferase, que

transfere o grupo -NH_2 do aspartato para o α -cetoácido, originando glutamato e oxaloacetato (Cazullo JJ e col 1977). Essa enzima apresenta características bioquímicas semelhantes à enzima encontrada em mamíferos.

A alanina alimenta o Ciclo de Krebs através de seu intermediário, glutamato. Através da atividade da alanina aminotransferase (ALAT) o grupo -NH_2 da alanina é transferido para o alfa-cetoácido formando piruvato e glutamato. Outra enzima capaz de catalizar essa mesma reação é a tirosina aminotransferase (TAT), que além dessa atividade é capaz de converter piruvato a alanina, alfa-cetoglutarato a glutamato e oxaloacetato a aspartato (Montemartini M e col 1995, Frydman B e col 1990).

A caracterização bioquímica do transportador de aspartato foi reportada em formas epimastigotas de *T. cruzi* (Canepa GE e col 2005). O transporte aumenta 6.7 vezes entre a fase *log* e estacionária. A forma tripomastigota apresenta baixa velocidade de transporte, semelhante aos parasitas do final da fase *log* e o sistema apresenta K_M de 32mM.

e) Metabolismo de Glutamato

O glutamato é um aminoácido de grande importância no metabolismo de *T. cruzi*. É o intermediário entre o metabolismo de prolina e o Ciclo de Krebs. O glutamato está diretamente envolvido com a alimentação do Ciclo de Krebs (Silber AM e col 2002) e no processo de metaciclogeneses (Contreras VT e col 1985).

O sistema de transporte de glutamato em *T. cruzi* é saturável e apresenta uma $V_{\text{máx}}$ de 98.34 pmoles $\times \text{min}^{-1}$ por 20×10^6 células e K_M de 0.30mM em formas epimastigotas (Silber AM e col 2006). O transporte ocorre em menor taxa em formas tripomastigotas (20 pmoles $\times \text{min}^{-1}$ por 20×10^6 células). Apenas 39% do glutamato é incorporado em macromoléculas e os 61% restantes permanecem como metabólitos solúveis. Não há transporte de glutamato em temperaturas abaixo de 10° C, porém aumenta linearmente entre 15° C e 40° C, apresentando atividade ótima a 40° C. A 45° C não se observa mudança na taxa de transporte. Vários metabólitos são capazes de inibir mais do que 50% do transporte de glutamato, entre eles: aspartato (aminoácido ácido), glutamina e asparagina (aminoácidos básicos), alanina e metionina (aminoácidos neutros), alfacetoglutarato e oxaloacetato (intermediários do Ciclo de Krebs). Esse fato sugere que o glutamato pode estar sendo transportado por diferentes sistemas de baixa especificidade. O sistema não é afetado por Na^+ e K^+ , porém é bastante sensível a variação de pH, apresentando atividade ótima em pH 5.0. Na

presença de oligomicina, um inibidor de F_1F_0 H^+ /ATPase, não há alteração do sistema de transporte, mostrando que o transporte não é dependente de ATP. O transporte de glutamato foi significativamente reduzido com a distorção do gradiente de H^+ pelo tratamento com FCCP, sendo, portanto, a força próton motriz responsável pelo transporte.

f) Metabolismo de Asparagina

A asparagina sintetase cataliza biossíntese de L-asparagina a partir de L-aspartato em uma reação dependente de ATP, na qual a glutamina é a fonte de nitrogênio, em condições fisiológicas (Richards NGJ e Schuster SM 1998) (Fig. 1.5). Em contrapartida a enzima L-asparaginase hidroliza L-asparagina originando aspartato e amônio (Richards NGJ e Kilberg MS 2006).

Essa enzima já foi encontrada em diversos organismos como bactérias, leveduras, plantas, algas e humanos. Porém até o momento não há estudos bioquímicos dessas enzimas em *T. cruzi* (Silber AM e col 2006).

A L-asparaginase isolada de *Escherichia coli* (E.C.3.5.1.1), apresenta duas isoformas, a L-AspI que é citoplasmática e a L-AspII que está localizada na região periplasmática. Elas diferem na seqüência de aminoácidos e na sua conformação (Richards NGJ e Kilberg MS 2006).

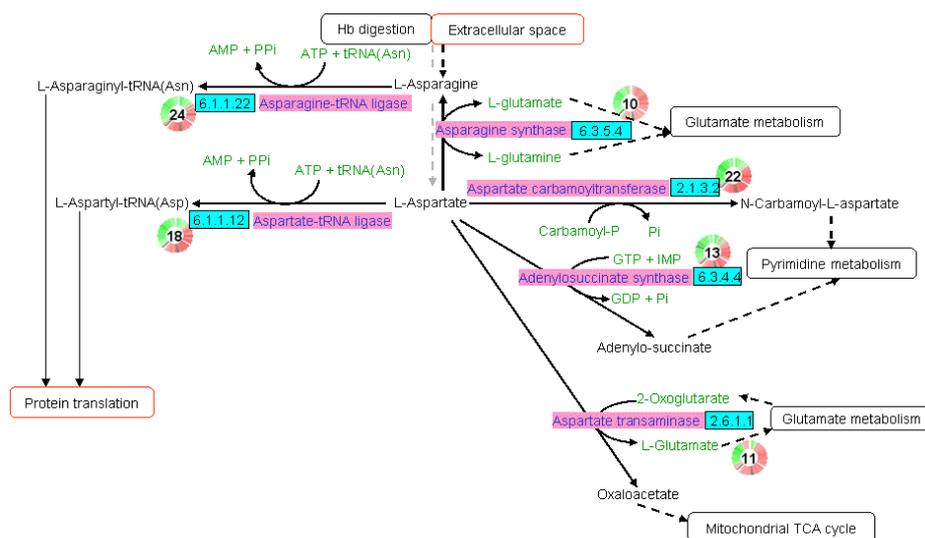


Figura 1.5. Metabolismo de Asparagina, representando a reação catalizada pela Asparagina Sintetase (6.3.5.4) e pela L-Asparaginase (3.5.1.1.). Retirado do KEGG Pathway Database baseado no metabolismo de *E. coli*.

A L-AspII tem sido utilizada durante muitos anos como terapia contra leucemias linfoblásticas e contra outros tipos de câncer humanos (Asselin BL e col 1989). A droga não penetra na célula, porém depleta a L-asparagina extracelular, e essa deprivação causa a morte de células neoplásicas, que apresentam uma baixa atividade de asparagina sintetase (Asselin BL e col 1989). Sabe-se também que a L-asparaginase de *E. coli* apresenta atividade de glutaminase (Capizzi RL 1993). Células de pacientes humanos tratadas com L-asparaginase apresentaram morte por apoptose, de acordo como descrito por Bussolati O e col (1995).

Apesar de a enzima ter sido encontrada em diversos outros organismos, em poucos casos apresentou atividade antitumoral. E em alguns casos, pacientes tratados com L-asparaginase de *E. coli* apresentam hipersensibilidade a droga, levando à reações alérgicas (Keating MJ e col 1993).

Através de um estudo *in silico* com 12 diferentes eucariotos, pode-se observar que existem poucas rotas do metabolismo de aminoácidos que são universalmente conservadas, dentre elas está a rota de síntese de asparagina, evidenciando a importância dessa via em diferentes organismos (Payne SH e col 2006) (Tabela 1.1).

Tabela 1.1. Rotas biossintéticas de aminoácidos não essenciais em 12 eucariotos. A presença de vias metabólicas foi determinada *in silico* de acordo com a presença das enzimas da rota. Fonte: *Eukaryot Cell*. 2006 Feb;5(2):272-6.

Amino acid	Vertebrates		Chordate Cá.	Invertebrates			Unicellular organisms		Plant A.t.	Intracellular parasites		
	H.s.	T.u.		D.m.	Ag.	C.e.	S.c.	D.d.		L.m.	P.f.	Ch.
Alanine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Asparagine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+ ^b	+	+ ^b
Aspartate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Arginine	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Cysteine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Glutamate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Glutamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Proline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Serine	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Tyrosine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Apesar da ausência de estudos bioquímicos das enzimas envolvidas no metabolismo de asparagina em *T. cruzi* em um trabalho recente Canepa GE e col (2005) detectaram a presença de RNAm das enzimas aspartato amônia ligase (DB: NP991407) e um enzima similar a L-asparaginase de *Dictyostelium discoideum* (DB: AAO52247). É possível que a asparagina seja oxidada através da via do aspartato (Silber AM e col 2005).

A enzima Asparagina Sintetase está presente no genoma de *T. cruzi* e apresenta ortólogos tanto em *Leishmania* sp. como em *T. brucei* (dados do genoma).

Porém não há estudos sobre aspectos moleculares e funcionais da enzima em nenhum destes organismos. Por se tratar de uma enzima que sintetiza um aminoácido que é essencial para a síntese protéica seria de grande importância caracterizar esse gene e sua função no metabolismo intermediário de *T. cruzi*. A síntese de asparagina também tem papel importante na modificação pós-traducional de diversas proteínas em tripanossomatídeos, pois a asparagina é essencial para o processo de N-glicosilação de proteínas (Mc Conville MJ e col 2002).

O gene que codifica para a L-Asparaginase está presente no genoma de *T. cruzi* e apresenta ortólogos em *Leishmania* sp., porém está ausente em parasitas do complexo *T. brucei* (dados do genoma). A quebra de asparagina para formação de aspartato pode ser de grande importância para o parasita que infecta células, pois o ambiente pode apresentar uma deprivação de aminoácidos, ao contrário do que ocorrem em parasitas que permanecem na corrente sanguínea, como é o caso de parasitas do complexo *T. brucei*. Por conta disso a presença da L-asparaginase pode ser uma importante etapa metabólica para a disponibilização de aspartato, uma enzima cuja importância na metaciclogeneses já foi comprovada. A caracterização dessa enzima e de seu papel funcional no metabolismo intermediário de *T. cruzi* pode abrir novos campos para a proposição de novas estratégias quimioterápicas contra a Doença de Chagas.

1.3. O metabolismo de aminoácido como alvo de novas terapêuticas

O estudo do metabolismo de aminoácidos pode gerar informações importantes sobre a biologia de diferentes espécies e mais do que isso pode servir de base para o desenho de novos alvos terapêuticos. A busca de alvos no metabolismo de aminoácidos pode ser baseada em três principais frentes:

1.3.1. Vias metabólicas diferenciadas

a) Algumas reações são únicas do metabolismo parasitário e não ocorrem em mamíferos, sendo portanto óbvios alvos para drogas. Uma dessas etapas é a fosforilação de arginina pela arginina quinase, como descrito em *T. cruzi* (Pereira CA e col 2000).

b) A existência de uma prolina racemase no metabolismo de *T. cruzi*, pode ser

um interessante alvo, para interromper o metabolismo de prolina. Uma alanina racemase também foi encontrada no genoma de *T. cruzi*, e está ausente em mamíferos (Silber AM e col 2005).

c) Outro exemplo é a fosfoenolpiruvato mutase, uma enzima que não está presente em mamíferos e foi apontada como um potencial alvo terapêutico (Sarkar M e col 2003). Porém, a validação dessa enzima como alvo precisa ser feita experimentalmente (Silber AM e col 2005).

1.3.2. Vias metabólicas homólogas catalizadas por enzimas diferentes

Algumas vias metabólicas são essenciais e conservadas entre os organismos, porém as enzimas e o mecanismo de ação das mesmas podem apresentar diferenças que podem ser exploradas no desenho de alvos. A seqüência nucleotídica é um importante diferencial, podendo ser usada como um critério inicial. Por exemplo, a ALAT é uma enzima que também está presente em mamíferos, mas a identidade é de apenas 55% e as enzimas diferem na especificidade ao substrato, nas propriedades catalíticas e no papel funcional, podendo ser um indicativo de um bom alvo (Montemartini M e col 1993). A cistationina B-sintetase, envolvida no metabolismo de cisteína, apresenta 50% de identidade com a mesma enzima em mamíferos, e apresenta diferenças físico-químicas, como a ausência de um grupamento heme, e a não ativação na presença de S-adenosilmetionina (Nozaki T e col 2001).

As enzimas asparagina sintetase e L-asparaginase de *T. cruzi* são proteínas bastante divergentes das encontradas em humanos (21% e 4% de similaridade, respectivamente), podendo ser um promissor alvo quimioterápico.

1.3.3. Transportadores de aminoácidos

Os transportadores de aminoácidos são relevantes para terapia, pois transportam as drogas para o ambiente intracelular do parasita e podem eles mesmos serem usados como alvo, impedindo a entrada de metabólitos importantes para o metabolismo parasitário. A inibição do transporte de arginina por dibromopropamidina e pentamidina em formas promastigotas de *L. donovani*, está relacionada com a inibição do crescimento celular (Kandpal e col 1996). Em décadas passadas, cristais de violeta foram usados para tratamento de amostras de banco de sangue contra *T. cruzi*, pois os cristais inibem o transporte de metionina e prolina, e conseqüentemente a síntese

protéica (Nussensweig e col 1953, Hoffman ME e col 1995), sendo a primeira droga desenhada para afetar o transporte de aminoácidos. Como mencionado, os transportadores são pouco conhecidos a nível molecular. Apenas uma única família de genes foi identificada até o momento, a AAAP (Bouvier LA e col 2004). Essa família poderia ser validada com alvo terapêutico, após estudos mais aprofundados.

Alguns nutrientes, além de seu papel essencial no metabolismo, têm a capacidade de regular outras funções celulares (Hyde R e col 2003). Em eucariotos e procariotos, complexas vias de controle têm sido elucidadas através das quais um determinado nutriente pode regular a aquisição, síntese e utilização dele mesmo ou de outros nutrientes, além de modular diferentes processos metabólicos dentro da célula (Forsberg H e Ljungdahl PO 2001). Uma molécula bem estudada em diferentes organismos eucarióticos é a TOR (Target of Rapamycin), envolvida na maquinaria de sinalização celular desencadeando uma resposta a disponibilidade de nutrientes (van Sluijters AD e col 2000). Diversas evidências apontam para a importância dos transportadores de nutrientes, uma vez que estes seriam as primeiras estruturas a entrarem em contato com o meio extracelular, podendo ser os primeiros a detectar e enviar estímulos intracelulares (Hyde S e col 2003). O estudo desses mecanismos pode ter grande importância terapêutica, uma vez que a disfunção da disponibilidade de nutrientes pode ser fatal para as células.

As células de um modo geral desenvolveram um discreto mecanismo quimio-sensível a uma variedade de nutrientes. Esses mecanismos podem envolver tanto a ligação de um nutriente (ou um metabólito) a um receptor específico, ou a detecção de sinais fisiológicos gerados como resultado do transporte de um nutriente através da membrana (ex. mudança de volume celular, variação de pH). Esses sensores de nutrientes atuam regulando cascatas de transdução, podendo por fim causar uma mudança de expressão ou atividade de outras proteínas celulares, porém um fator complicante do estudo de sensores celulares para nutrientes é a ocorrência de diferentes receptores para um único nutriente na mesma célula (Vaulont S e col 2000).

Em *Saccharomyces cerevisiae* foi identificada uma proteína Ssy1p, que é homóloga a uma permease e pertence à família APC (Amino-acid polyamine/choline, i.e. Aminoácido Poliamina/Colina). Essa proteína é responsável por detectar a disponibilidade de aminoácidos no meio extracelular e desencadear um processo de transdução de sinal (Kanai Y e Endou H 2001). Entretanto não é necessário que um aminoácido atravesse o sistema de transporte para que uma célula inicie a sinalização, a própria ligação do substrato ao seu transportador pode induzir significativas

mudanças na estrutura terciária do transportador e essa mudança física leva a interação com outras proteínas que por sua vez continuam a via de transdução de sinal (Kanai Y e Endou H 2001).

No presente trabalho pretende-se caracterizar o transporte de glutamato de *Leishmania amazonensis* que fornecerá subsídios para trabalhos posteriores de desenho de fármacos, baseados em inibidores específicos. Além disso, pretendemos caracterizar enzimas do metabolismo de asparagina em *T. cruzi* que participam de vias conservadas em diversas espécies, porém catalizadas por enzimas diferentes. A asparagina sintetase e a L-asparaginase são bastante divergentes das mesmas enzimas presentes em humanos, e isso poderia ser explorado para uma abordagem terapêutica posterior específica, não afetando as células do hospedeiro infectado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar bioquimicamente o sistema de transporte de glutamato e identificar novos alvos quimioterápicos no metabolismo de aminoácidos em tripanossomatídeos.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Caracterizar bioquimicamente o transporte de L-glutamato em *Leishmania amazonensis*.

- a) Medir a incorporação de L-glutamato radioativamente marcado ao longo do tempo.
- b) Determinar a K_M e $V_{máx}$ do sistema de transporte de L-glutamato.
- c) Determinar a variação do transporte de L-glutamato em função da variação de temperatura e pH do meio extracelular.
- d) Determinar o papel de íons extracelulares no transporte de L-glutamato
- e) Quantificar a incorporação de cadeias de carbono de L-glutamato em proteínas.
- f) Verificar se o transporte de L-glutamato é um sistema de transporte dependente de ATP.

2.2.2. Caracterizar molecularmente o gene de Asparagina Sintetase e L-Asparaginase de *Trypanosoma cruzi*.

- a) Identificar os genes envolvidos no metabolismo de asparagina.
- b) Caracterizar através de bioinformática motivos e domínios de Asparagina Sintetase e L-Asparaginase.
- c) Comparar os genes de Asparagina Sintetase e L-Asparaginase entre tripanossomatídeos e com outros organismos.
- e) Realizar o mapeamento gênico de L-Asparaginase *T. cruzi* através de Southern Blot.
- e) Clonar e expressar o gene de Asparagina Sintetase e L-Asparaginase de *Trypanosoma cruzi* em parasitas e bactérias.
- f) Determinar a função do gene L-Asparaginase de *T. cruzi* através de sobreexpressão em parasitas transgênicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultivo de parasitas

Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa CL-Brener (CT-IOC-005) foram gentilmente cedidas pela Dra. Maria Auxiliadora de Souza (Curadora da Coleção de Tripanossomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Brasil). Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram mantidas em fase exponencial de crescimento, em Meio 199 (Gibco BRL, NY, USA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FCS; Cultilab, Brasil) e mantidas a 27° C.

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidas em meio LIT (5 g/L de Infusão de fígado bovino; 5 g/L de triptose; 4 g/L de NaCl; 0.4 g/L de KCl; 8 g/L de Na₂PO₄; 2 g/L de Glicose; pH 7.2) suplementando com 10 mg/L de hemina e 10% de Soro Fetal Bovino a 27°C.

3.2. Bactérias e meios

Em todos os experimentos foi utilizada a linhagem de *Escherichia coli* DH5 α de genótipo: F-, f80dlacZ Δ M15, Δ -(lacZYA-arg F) U169, end A1, rec A1, hsd R17 (rK-mK+), deo R, thi-1, sup E44, λ -gyrA96, rel A1. Para o cultivo das bactérias foram utilizados os seguintes meios de cultura:

1) LB (Luria Bertani): bactotripton 10g/L, extrato de levedura 5g/L e NaCl 5g/L (pH 7.3).

2) LB sólido: LB contendo 1,5% de ágar bacteriológico.

Para expressão de proteína recombinante foi utilizada a bactéria BL21(DE3) de genótipo: F-, *ompT*, *hsdS* β (r β -m β -), *dcm*, *gal*, (DE3) tonA ou sublinhagens da mesma.

3.3. Bioquímica do transporte de aminoácido

3.3.1. Ensaio de Transporte de Aminoácido em *Leishmania amazonensis*

O ensaio de transporte foi realizado de acordo como previamente descrito por Silber AM e col (2002). Parasitas em fase exponencial de crescimento foram lavados 3 vezes em PBS e ressuspensos em uma concentração final de 200 x 10⁶ células/mL e distribuídas em alíquotas de 100 μ L (20 X 10⁶ células cada). O ensaio de transporte foi iniciado adicionando aos tubos 100 μ L da diluição desejada de L-glutamato em

PBS na presença de 0.1 μCi of L-[3, 4- ^3H]-ácido glutâmico. A não ser que seja indicado, a V_0 foi medida a 28 °C após 30 s através da incorporação de L-glutamato radioativamente marcado. O transporte foi parado com a adição de 800 μL de solução gelada contendo 50 mM glutamato em PBS pH 7.4, seguida de duas rápidas lavagens com PBS, a 10,000 X g por 2 min. A solução foi finalmente ressuspensa em 100 μL de PBS.

3.3.2. O efeito dos íons Na^+ , K^+ e do pH extracelular no transporte de L-glutamato

O efeito de Na^+ , K^+ foi determinado realizando ensaios de transporte na ausência dos cátions e na presença de inibidores de bombas de Na^+ e K^+ . Para verificar o efeito do gradiente de H^+ através da membrana plasmática o transporte foi medido variando o pH extracelular. Para verificar o efeito do gradiente de H^+ , foram feitos experimentos com a adição de 0.5 μM Carbonil Cianido p-Trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) na presença ou ausência de 5 mg/mL de oligomicina, um inibidor de ATPases. Para experimentos envolvendo a cadeia respiratória os parasites foram tratados com 200 mM de rotenona e 0.5 mM antimicina A em PBS. Para verificar o efeito do stress nutricional no transporte, os parasitas foram pré-incubados em PBS por diferentes tempos (0 a 3 horas) e em seguida o transporte foi medido.

3.3.3. Incorporação de L-glutamato em proteínas

A extração de proteínas foi feita com o método de extração por TCA (Ácido tricloroacético), como previamente descrito por Silber AM e col (2002). As células foram então incubadas durante 30 min com 50 μCi de 3 mM L-[3, 4- ^3H]-ácido glutâmico em PBS, lavado duas vezes por centrifugação e ressuspensos em PBS. Após ajustar o volume final para 50 mL com PBS, as células foram tratadas com 1 vol. de TCA a 10%, e incubadas durante 1 h a temperatura ambiente. Após centrifugação a 20,000 g durante 30 min a radioatividade foi medida no sobrenadante, correspondendo ao L-glutamato livre. O pellet foi ressuspenso em 0.1% de SDS em Tris HCl 0.015 M pH 7.4 e a radioatividade medida, sendo correspondente a fração de L-glutamato que foi incorporada em proteína.

3.4. Biologia Molecular de enzimas do metabolismo de asparagina em *Trypanosoma cruzi*.

3.4.1. Plasmídeos

No presente trabalho foram utilizados os seguintes plasmídeos: pTEX (Kelly JM e col 1992), pGEM-T easy (PROMEGA), pCDNA3 (Invitrogen, USA), pET28a(+) (Novagem, USA) (Mapas em anexo).

3.4.2. Preparação de células competentes e transformação de bactérias

As bactérias competentes *E. coli* DH5 α foram preparadas utilizando-se o método de Cloreto de Cálcio. Uma colônia bacteriana foi inoculada em 3 mL de LB líquido, e incubada durante 16 horas a 37° C com agitação, a 150rpm. No dia seguinte, 2 mL dessa cultura foram inoculados em um Erlenmayer contendo 200 mL de meio LB. A cultura foi incubada a 37° C com agitação até atingir a densidade óptica de $A_{600nm} = 0.4$ (entre 0.3 e 0.5). Em seguida a cultura foi transferida para um novo tubo e centrifugada a 8.000 x g por 5 minutos à 4° C. As células foram ressuspensas em 40 mL de CaCl₂ 50 mM gelado e incubadas por 30 minutos no gelo. Foram centrifugadas à 5.000 rpm por 5 minutos à 4° C e finalmente ressuspensas em 8 mL de CaCl₂ 50 mM gelado com 15% de glicerol e estocadas a -70° C em alíquotas de 0.5mL até o uso.

Para a transformação 100 μ L das células competentes foram distribuídas em tubos Eppendorf de 1.8 mL contendo 50 ng do plasmídeo de interesse. A suspensão foi incubada por 30 minutos no gelo. O choque térmico foi gerado incubando o tubo com as células por 1 minuto à 42° C e imediatamente colocado no gelo durante 5 minutos. Após o choque térmico foi adicionado 900 μ L de meio LB e a suspensão celular foi incubada durante 1h à 37° C. As células transformadas foram semeadas em placa de Petri contendo meio LB-ágar com o antibiótico de seleção específico do plasmídeo (100 μ g/mL de ampicilina; 50 μ g/mL de Kanamicina).

3.4.3. Extração de DNA plasmidial em larga escala (método de lise alcalina e bandeamento de DNA por gradiente de Cloreto de Césio)

As bactérias foram cultivadas em 250 mL de meio LB contendo o antibiótico de seleção específico durante 12-16 horas a 37° C com agitação constante. Foram coletadas por centrifugação a 5.000 rpm por 10 minutos e as bactérias ressuspensas em 10 mL de solução 1 (50 mM de glicose, 25 mM de Tris pH=8.0, 10 mM EDTA) com 5 mg/mL de lisozima. Foram adicionados 20 mL da solução 2 (0.2 N NaOH, 1% SDS) e homogenizado por inversão. Adicionados 15 mL da solução 3 (60 mL de acetato de potássio 5M, 11,5 mL de ácido acético glacial, 28,5 mL de água) e novamente homogenizado por inversão, seguido de incubação por 10 minutos no gelo. Todo o volume foi centrifugado à 15.000 rpm por 20 minutos à 4° C (rotor SS-34, centrífuga RC-5B, Sorvall). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e filtrado (para retirar o resto de lisado celular que não precipitou) e ao volume filtrado foi adicionado 0.6 volume de isopropanol sendo incubado por 15 minutos à temperatura ambiente. O volume foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante descartado, e o DNA lavado com etanol 70%. O DNA foi ressuspensão em 3 mL de TE e adicionado 1g de CsCl para cada mL de DNA em TE, e 0.8 mL de uma solução de brometo de etídeo (estoque a 10mg/mL) para cada 10 mL de solução de CsCl (a difração final deve ser $\eta=1,3860=1,55\text{g/mL}$). A amostra foi colocada com pipeta pasteur em tubo selável e centrifugada a 45.000 rpm por 36 horas a 20° C (rotor Ti 50 - ângulo fixo/Beckman). Após a centrifugação a banda referente ao DNA circular foi coletada com uma seringa de 3 mL. O brometo de etídeo foi removido da amostra com adição de álcool isoamílico saturado com água e misturado vigorosamente por inversão, em seguida centrifugado a 14.000 rpm por 3 minutos, sendo repetido o procedimento três vezes. O DNA foi finalmente dialisado com 2 litros de TE sob agitação, sendo renovado três vezes a cada 6-8 horas. A quantidade de DNA na amostra e a sua integridade foram estimadas através de eletroforese em gel de agarose e leitura em espectrofotômetro a 260 nm ($1,0 \text{ DO } A_{260 \text{ nm}} = 50 \mu\text{g/mL}$ de DNA).

3.4.4. Extração de DNA genômico parasitário

A extração de DNA genômico de *T. cruzi* e *Leishmania*, foi feita segundo Medina-Acosta E e Cross GA (1993). Alíquotas de 1.0×10^8 parasitas foram transferidos para um tubo Eppendorf, centrifugadas por 5 minutos a 7000 rpm, lavadas com PBS e depois ressuspensas em 150 μl de tampão de lise TELT (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, EDTA 62.5 mM, pH 9.0, LiCl 2.5 mM, Triton-X-100 4%). O tubo foi invertido várias vezes, seguindo-se de incubação à temperatura ambiente por 5

minutos. Foram adicionados 150 µl de fenol:clorofórmio (1:1,v/v) e a suspensão homogenizada por repetidas inversões do tubo durante 5 minutos. A fase orgânica foi separada por centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos, e em seguida o DNA precipitado por centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos com etanol 2.5 vezes o volume da amostra, e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70% gelado. O DNA genômico foi ressuspensão em 100 µL de água contendo 100 µg/mL de RNase A e incubado por 1 hora a 37° C. A quantidade de DNA na amostra e a sua integridade foram estimadas através de eletroforese em gel de agarose.

3.4.5. Amplificação por PCR

As reações de PCR foram processadas em tubos Eppendorf de 0.5 mL contendo volume final de 50 µL de reação, com os seguintes componentes: 100 ng de DNA molde contendo a seqüência a ser amplificada, 2 mM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), tampão de reação 1X (Tris HCl 20 mM, pH 8.5, KCl 5 mM), 2 mM de MgCl₂ (ou conforme indicado), 0.4µM de cada oligonucleotídeo e 2.5 unidades de Taq polimerase (Fermentas). Os ciclos de amplificação (30 ciclos) para os genes foram: 94° C por 1 minuto, 48° C por 30 segundos, 72° C por 30 segundos.

Para ambos os genes o DNA foi desnaturado incubando-se o tubo da reação a 94° C durante 4 minutos e ao final da reação as fitas foram extendidas à 72° C, durante 10 minutos. Os produtos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 0.8%/TBE corado com brometo de etídeo.

3.4.6. Clonagem e Seqüenciamento de Genes

A partir do DNA genômico de *T. cruzi* cepa CL-Brener foi amplificado por PCR um fragmento de DNA utilizando os oligonucleotídeos Sense 5' - CCCAAGCTTATGACATCGGGAGATCCTGCG - 3' e Antisense 5' - CCCCTCGAGTCACAGCAAGGGATAATTCTG - 3', construídos com base na seqüência do gene da Asparagina Sintetase de *Trypanosoma cruzi* (GeneDB número de acesso Tc00.1047053503625.10). No primer sense o sítio para *HindIII* foi inserido e no primer antisense o sítio para *XhoI*. Para Asparaginase os seguintes oligonucleotídeos foram desenhados: Sense 5' - CCCGGATCCATGGCCCTCTGTGTT - 3' e Antisense 5' - CCCAAGCTTTTACAGGTTGGCTTC - 3'. Sendo incluídos sítios

para *BamHI* e *HindIII*, no oligonucleotídeo sense e antisense, respectivamente.

Os produtos de PCR foram subclonados no plasmídeo pGEM-T easy (Promega) seguindo as instruções do fabricante. Os produtos de PCR obtidos foram purificados do gel de agarose 0.8%/TBE usando o Kit de purificação de DNA GeneClean (Promega) de acordo com as instruções do fabricante e quando necessário seqüenciados em um sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems) com os mesmos oligonucleotídeos utilizados para amplificar os genes.

3.4.7. Clonagem de em vetores de expressão em bactéria e célula eucariótica.

Para expressão da proteína recombinante em bactéria os genes correspondentes foram amplificados por PCR a partir de DNA genômico de *T. cruzi* cepa CI-Brener com os oligonucleotídeos específicos acima descritos. Os fragmentos amplificados por PCR foram purificados utilizando o Kit de purificação de DNA GeneClean (Promega) de acordo com instruções do fabricante e foram então clonados no vetor pET28a(+) (mapa em anexo), utilizando os sítios específicos de cada gene.

3.4.8. Eletroforese de DNA em gel de agarose

As moléculas de DNA íntegras ou digeridas por enzimas de restrição foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (concentração de 0.8 a 1%) em tampão TBE 1X (Tris-borato 50 mM, EDTA 1mM, pH=8.0) com 0,1 µg/mL de brometo de etídeo. Foram utilizados como referência o marcador λ *HindIII*, que contém fragmentos do bacteriófago λ digerido com *HindIII*, cujos tamanhos variam entre 23 kb a 0.5 kb. As amostras de DNA foram aplicadas no gel após a adição de tampão de amostra (TBE 1X, xileno-cianol 0,83 mg, azul de bromofenol 0,83 mg, glicerol 6%) em diluição final de 1X. A corrida eletroforética foi feita em voltagem constante de 100 V. Os géis foram analisados e fotografados contra luz ultravioleta.

3.4.9. Southern Blotting

a) Transferência de DNA para membranas de nylon

O DNA foi separado através de eletroforese em gel de agarose 1% em TBE1X.

Em seguida o gel foi depurinado com solução 0.25 M de HCl por 15 minutos e desnaturado com 0.5 M NaOH e 1 M NaCl por 20 minutos, seguido de renaturação com solução 1 M Tris-base e 0.5 M NaCl por 20 minutos. O DNA foi transferido para membrana de Nylon (Hybond-N⁺/Amersham) por capilaridade através da montagem de um sanduíche em tampão SSC 10X (NaCl 3 M, Citrato de sódio 0.3 M; pH=7.0) durante 16 horas. Após a transferência a membrana foi colocada sobre um papel de filtro umedecido em SSC 5X e levado ao aparelho "GS Gene LinkerTM UV chamber" (Bio Rad) e submetidas à irradiação com luz ultravioleta (120 Joules) com 2 descargas para fixação do DNA na membrana. A membrana foi então incubada durante 1h, à 42°C, sob leve rotação em 30mL de solução de pré-hidridização (50% de formamida, SSC 5X, denhardt's 5X, 0.1mg/ml de DNA de esperma de salmão, SDS 0.1%). As soluções estoques utilizadas foram SSC 20X (NaCl 3 M, Citrato de sódio 0.3 M; pH 7.0) e Solução Denhardt's (Ficol 1%/ Polivinil-pirrolidona 1%/BSA 1%).

b) Marcação dos fragmentos de DNA por incorporação de fósforo radioativo (preparação de sondas radioativas)

As sondas foram preparadas com o DNA do gene desejado marcado pelo método de "random-primer" descrita por Feinberg e Vogelstein (1983). Oligonucleotídeos contendo seqüências randômicas foram utilizados como "primers" para a síntese de DNA na presença de nucleotídeos marcados com fósforo radioativo adicionados à reação. Inicialmente, 25 - 50 ng de DNA foi desnaturado a 100° C por 5 minutos, e incubado com os componentes do "Random primer labelling system" (Life Technologies) que consiste em desoxirribonucleotídeos (2µl de dATP, 2µl de dGTP, 2µl de dTTP), 1µl (3 U) de Klenow, 15 µl de random primer buffer mixture. Foi adicionado 5 µl (0.05 µCi) de α -[³²P]-dCTP e incubado por 1 hora a 25° C. Após a marcação a solução contendo a sonda radioativamente marcada foi desnaturada durante 5 minutos à 100° C e adicionada ao tubo contendo a membrana e a solução de pré-hibridação.

c) Hibridação da membrana contendo DNA com as sondas radioativas

Em seguida a solução foi substituída por nova solução de hibridação contendo a sonda radioativa desnaturada. Após a hibridação a 42° C por 18-24 horas, a membrana foi submetida a duas lavagens sucessivas de 15 minutos com SSC 5X e 1%SDS a 55° C, e mais duas lavagens com SSC 0.1X e 0.5% SDS. A membrana foi secada

num papel filtro, envolvida com plástico e exposto com filmes de raios-X (X-Omat K, Kodak, USA) em cassetes a -70°C por 24-48 horas. Os filmes foram revelados em câmara escura expondo 5 minutos na solução de revelação, lavados com água e colocados em solução de fixação por 5 minutos.

3.4.10. Expressão de proteína recombinante

O plasmídeo Pet28a(+)*AspB* foi transformado em bactérias competentes BL21(DE3). Após transformação as bactérias transformadas foram plaqueadas em placas com antibiótico de seleção (Kanamicina $50\mu\text{g}/\text{mL}$). As placas foram encubadas overnight a 37°C .

No dia seguinte, colônias foram isoladas e crescidas overnight à 37°C , em 3mL de LB com os antibióticos de seleção. Após esse período $50\mu\text{L}$ da cultura foi inoculada em 10mL de Meio LB (contendo os antibióticos específicos) e incubadas com aeração até atingir OD_{600} entre 0.4 – 0.6. Quando a OD_{600} atingiu 0.5, 1 mL da cultura foi coletado e centrifugado durante 1min à 14.000rpm. O pellet foi ressuspenso em $100\mu\text{L}$ de Tampão de Amostra de Proteína 4 X e armazenado à -20°C até o uso. Essa fração corresponde à proteína não induzida. Imediatamente o restante da cultura foi induzida com concentração final de 1mM de IPTG. Após 3h de indução uma amostra de 1mL foi coletada e processada de acordo com o explicitado para a fração não induzida. As amostras foram aquecidas a 95°C , durante 5 min, assim como o Marcador de Peso Molecular (Fermentas). Os tubos foram centrifugados durante 1 min, a 14.000rpm, e $10\mu\text{L}$ de cada amostra foi aplicada em gel de Poliacrilamida a 15%. Após a corrida o gel foi fixado e corado com Coomassie Blue durante 20 minutos. Após esse período foi descorado e a proteína induzida foi identificada através de comparação com a proteína não induzida.

3.4.11. Imunização de camundongos com DNA para obtenção de anticorpos policlonal mono específico

Camundongos Balb/C com idade de 6-8 semanas foram utilizados na imunização com DNA. Foram feitas imunizações com o plasmídeo pCDNA3*AspB* e pCDNA3 preparados com gradiente de césio e dialisados em PBS. Foram inoculados $200\mu\text{g}$ de DNA em $100\mu\text{L}$ de PBS ($100\mu\text{g}$ em cada pata/na tíbia) nos camundongos em cada imunização. Foram realizadas três imunizações, e após 15 dias da última

imunização foram feitas punções cardíacas dos camundongos imunizados. O sangue retirado (800 a 1000 μ L) foi incubado no gelo até coagular, em seguida centrifugados a 3.000 rpm por 5 minutos, e o soro coletado e estocado a -20° C.

3.4.12. Transfecção de formas epimastigotas de *T. cruzi*

As transfecções dos parasitas foram feitas de acordo com Ramirez MI e col (2000). Culturas de formas epimastigotas de *T. cruzi* cepas CL-Brener em fase logarítmica de crescimento (3^o dia: $0.8 - 1.2 \times 10^7$ parasitas/mL) foram lavadas com tampão de eletroporação (137 mM de NaCl, 21 mM de HEPES, 5 mM de KCl, 5.5 mM de Na_2HPO_4 , 0.77 mM glicose, pH 7.0) e ressuspensas no mesmo tampão na concentração 1.0×10^8 parasitas/mL. Depois da incubação de 10 minutos no gelo, alíquotas de 5.0×10^7 parasitas/mL foram incubadas com 25 μ g de DNA do vetor (pTEX ou pTEXAspB) e adicionadas a cuvetas de eletroporação para em seguida serem eletroporadas (em volume total de 500 μ l) em um aparelho Bio-Rad Gene Pulser a 300V e 500 μ F com dois pulsos consecutivos de até 10 ms. As células foram incubadas por 10 - 20 minutos no gelo sendo em seguida transferidas para um tubo com 4.5 mL de meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino (volume final de 5 ml). Após 24 horas foi adicionado 200 μ g/ml de geneticina (G418). A concentração de geneticina foi variada de acordo com a observação da cultura ao longo do tempo. As células foram repicadas semanalmente na presença de geneticina com concentrações crescentes durante 4 - 6 semanas desde 200 μ g/mL a 800 μ g/mL. Quando as culturas foram selecionadas com 5% de sangue fresco, foram utilizadas concentrações maiores de Geneticina (1000 e 2000 μ g/mL). Parasitas transgênicos estáveis foram observados a partir da sexta semana.

3.4.13. Preparação de extrato protéico total de *T. cruzi*

Epimastigotas em fase *log* de crescimento (3^o a 4^o dia) foram coletadas do meio de cultura por centrifugação à 4.000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. Os parasitas foram lavados 2 vezes com PBS, e ressuspensos com Triton-X 100 1% em PBS (com inibidor de proteases) na concentração de 5×10^6 parasitas/mL. O homogenizado foi incubado a 37° C por 30 minutos sendo em seguida centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e congelado a -20° C até o

momento de uso.

3.4.14. Análises de bioinformática

As seqüências obtidas de *T. cruzi* foram submetidas a análise de similaridade com a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) contra um banco de dados não redundante. As seqüências de *T. cruzi* das cepas CL-Brener também foram submetidas a um alinhamento múltiplo com a ferramenta Clustal-W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) com seqüências de outros organismos. Para análise de motivos e domínios a seqüência foi submetida às ferramentas PROTOGIM (www.biowebdb.org/protogim) e PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite/>). Para identificar putativas regiões hidrofóbicas que formam α -hélice transmembranares foi utilizado o programa TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Para análise dos sítios de restrição presentes nos genes foi usado o programa tacg. (<http://sela.umassmed.edu/tacg/formt.html>).

3.5. Análise de dados

Todos os ensaios relacionados com o transporte de L-glutamato em *L. amazonensis* foram realizados em triplicatas e os dados representam no mínimo três experimentos independentes. A contagem de incorporação por minuto (cpm_i) para cada experimento foi calculada da seguinte forma (Silber AM e col 2002):

$$cpm_i = cpm_e - cpm_b$$

Onde cpm_e é a média aritmética da cpm medida da triplicata após tempo indicado de incorporação de aminoácido radioativo, e cpm_b é a média aritmética da cpm referente ao background de cada amostra.

A quantidade de glutamato incorporado é calculada através da fórmula:

$$Glu_i = cpm_i[Glu]vcpm_{st}^{-1}t^{-1}$$

Onde o Glu_i é o glutamato incorporado, $[Glu]$ é a concentração nanomolar de glutamato radioativamente marcado, v é o volume de glutamato radioativamente

marcado (100 μ L em todos os casos), cpm_{st} é a cpm medida após adição de aminoácido marcado, e t é o tempo de incubação em minutos. Análises, ajustes de curvas e regressões foram feitas utilizando o OriginPro v7.5.

A viabilidade das células foi avaliada pela observação da motilidade e integridade em microscópio ótico.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização bioquímica do transporte de L-glutamato em *Leishmania amazonensis*

As reações metabólicas ocorrem no interior de células ou de organelas que estão separadas do ambiente que as cerca por membranas. O interior apolar das membranas biológicas torna-as altamente impermeáveis à maioria das substâncias iônicas e polares, que só conseguem atravessá-las graças à ação de proteínas transportadoras específicas. Essas proteínas medeiam todos os movimentos transmembrana de pequenos íons inorgânicos e também metabólitos, como aminoácidos, açúcares e nucleotídeos. O estudo bioquímico de transportadores envolve a elucidação de mecanismos cinéticos da reação entre o transportador (enzima) e o substrato (aminoácido), sendo baseado nos parâmetros de cinética enzimática. As medidas cinéticas de reações catalizadas enzimaticamente estão entre as técnicas mais utilizadas para a caracterização dos mecanismos catalíticos de transportadores.

4.1.1. Transporte de L-Glutamato em *Leishmania Amazonensis*

a) Incorporação ao longo do tempo de L-glutamato em *Leishmania amazonensis*

Para caracterizar bioquimicamente um transportador o primeiro passo é medir a incorporação do substrato através do tempo, para verificar se há uma utilização saturável do nutriente pelo transportador, o que permite caracterizar e estudar o sistema de transporte semelhante à uma reação enzimática, sendo o transportador a enzima e o aminoácido o substrato. Baseado nos dados da cinética de transporte de L-glutamato em *Trypanosoma cruzi* (Silber AM e col 2006), a concentração de 3mM de L-glutamato foi utilizada para se medir o transporte desse aminoácido ao longo do tempo em *Leishmania amazonensis*, uma vez que essa concentração está na faixa saturável do sistema de transporte em *T. cruzi*. Após incubação, à 28° C, durante os tempos indicados, a incorporação de L-glutamato radioativamente marcado foi medida de acordo como especificado em materiais e métodos e os dados foram plotados em um gráfico em função do tempo (Figura 4.1).

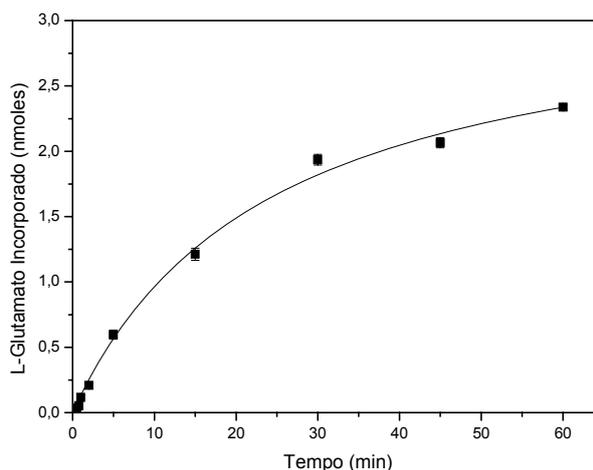


Figura 4.1. Incorporação de L-glutamato em promastigotas de *Leishmania amazonensis* ao longo do tempo. A incorporação de 3mM de L-glutamato radioativamente marcado foi acompanhada de acordo com o tempo, como descrito em materiais e métodos. Média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicatas e referentes a 20×10^6 células.

De acordo com o gráfico, pode se observar que a incorporação de L-glutamato radioativamente marcado ao longo do tempo se ajusta a uma função hiporbólica, demonstrando que o sistema atinge o equilíbrio ao longo do tempo de incubação. Isso indica que o sistema de transporte de L-glutamato em *L. amazonensis* não se trata de um sistema de transporte por difusão simples, pelo contrário, é um sistema associado a uma proteína específica, ligante de glutamato na superfície da célula.

Utilizando os dados de incorporação de L-glutamato ao longo do tempo, uma regressão linear foi realizada na fase inicial da curva, com o objetivo de encontrar a faixa de linearidade do sistema. Foi observada uma faixa de linearidade durante os primeiros 120 segundos ($R^2=0.95744$) de incubação com L-[3, 4- ^3H]-glutamato (Figura 4.2).

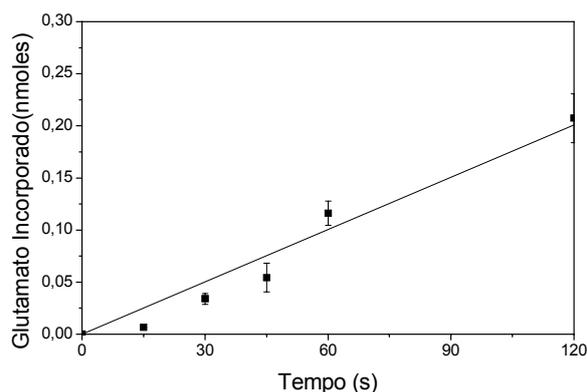


Figura 4.2. Fase linear do transporte de L-glutamato radioativamente marcado em promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicatas e referentes a 20×10^6 células.

Os parâmetros cinéticos de transporte devem ser calculados nessa faixa, pois é nessa faixa que a quantidade de substrato presente no meio é linearmente proporcional a quantidade de substrato associado a proteína transportadora. Para permanecer em uma faixa de segurança o tempo de 60s de incubação com o substrato foi utilizado para os experimentos posteriores.

b) Cinética do transportador de L-glutamato de *Leishmania amazonensis*

Para se calcular os parâmetros cinéticos do transporte de glutamato, a V_0 foi medida em função da concentração de L-[3, 4- 3 H]-glutamato presente no meio extracelular. Para o cálculo da V_0 a seguinte fórmula foi aplicada:

$$V_0 = \text{Glu}_i \text{ (nmoles)} / t \text{ (min)}, \text{ onde } \text{Glu}_i = \text{L-[3, 4-}^3\text{H]-glutamato incorporado.}$$

Os dados da incorporação medidos foram plotados em um gráfico e foi observado que se ajustam a uma clássica função hiperbólica de Michaelis-Menten ($R^2=0.99518$), como mostrado na figura 4.3.

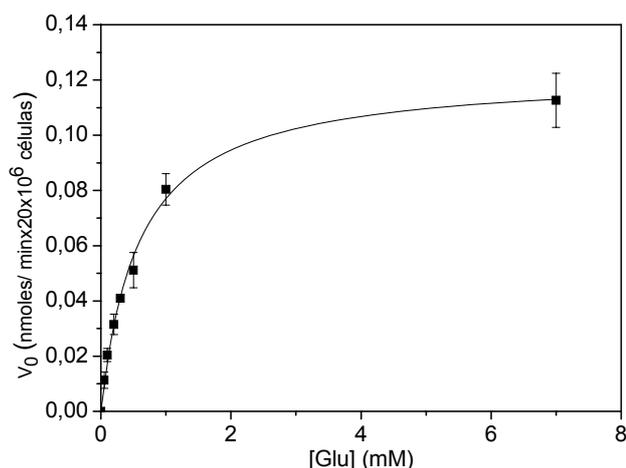


Figura 4.3. Efeito da concentração do substrato na incorporação de L-glutamato em promastigotas de *Leishmania amazonensis*. A taxa inicial de transporte (V_0) foi medida em função da concentração de glutamato radioativo, como descrito em materiais e métodos. Média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicatas.

De acordo com esse modelo, quando a concentração de L-glutamato é alta o suficiente para estar ligado a todos os transportadores, a segunda etapa da reação (do desacoplamento do aminoácido do transportador e liberação dentro da célula) torna-se limitante da velocidade e a velocidade da reação global não varia com o aumento adicional da concentração de substrato. Baseado nos resultados do cálculo da velocidade inicial (V_0) do transporte em função da concentração de L-glutamato, a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) é a velocidade na qual a enzima (transportador) está saturada, ou seja todos os transportadores estão com um aminoácido acoplado. A partir desses dados também é possível calcular outro parâmetro cinético do sistema, que é a K_M , constante de Michaelis. A K_M é a concentração de substrato na qual a velocidade da reação corresponde à metade da velocidade máxima. Ou seja, se o sistema tem uma K_M de valor baixo, ele atingirá a máxima eficiência catalítica em baixas concentrações de substrato. Para facilitar a determinação desses dois parâmetros cinéticos ($V_{m\acute{a}x}$ e K_M) é utilizado o método formulado por Hans Lineweaver e Dean Burk, que utiliza o inverso da equação de Michaelis-Menten, originando uma equação linear (Fig. 4.4).

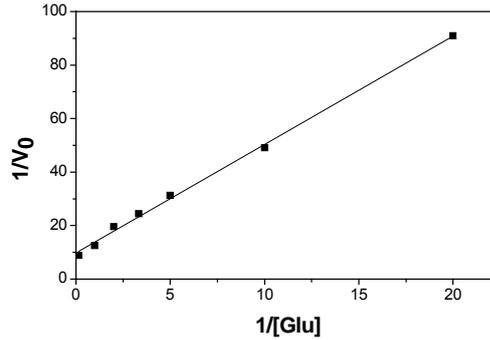


Figura 4.4. Gráfico de Lineweaver-Burk representando a variação da V_0 em função da concentração de L-glutamato em *Leishmania amazonensis*. A V_0 é dada em nmoles/ min x 20×10^6 cells e a concentração de glutamato em mM.

A inclinação da linha dá o valor da $K_M/V_{m\acute{a}x}$, a interseção no eixo $1/V_0$ dá o valor de $1/V_{m\acute{a}x}$, e a interseção no eixo $1/[Glu]$ dá o valor de $1/K_M$. Isso permitiu encontrar um valor de $V_{m\acute{a}x} = 0.123 \pm 0.003$ nmoles x min^{-1} por 20×10^6 células e uma $K_M = 0.59 \pm 0.04$ mM.

c) Incorporação de cadeias de carbono de L-glutamato em proteínas

Os tripanossomatídeos podem utilizar os aminoácidos basicamente para a formação de macromoléculas como proteínas e para seu metabolismo energético, através da oxidação do aminoácido pelo ciclo de Krebs. Além disso, parte pode permanecer livre no citoplasma celular. Para avaliar a proporção de L-glutamato que é utilizada na formação de proteínas o transporte foi realizado a uma concentração saturável do substrato de 3mM. Após incubar os parasitas com L-glutamato radioativamente marcado durante 30 minutos, a quantidade de radioatividade foi medida na fração protéica de promastigotas de *L. amazonensis*, precipitadas com ácido tricloroacético (TCA). De acordo com a análise dos dados apenas 39% da radioatividade é incorporada em proteínas, enquanto que os 61% restantes permanecem como metabólitos solúveis (dado não mostrado).

Para observar se ocorre uma diferença no transporte de aminoácidos em promastigotas submetidos a stress nutricional os parasitas foram incubados em PBS, à 28°C durante 3h. Após esse período o transporte de L-glutamato foi medido de acordo com o ensaio padrão de transporte descrito em materiais e métodos. Os resultados mostraram que o stress nutricional não causou efeito na velocidade de transporte do sistema (dado não mostrado).

d) Efeito da temperatura no transporte de L-glutamato em *Leishmania amazonensis*

A resposta do transporte de L-glutamato à variação de temperatura também foi analisada utilizando as mesmas condições do ensaio de avaliação do efeito do stress nutricional no transporte de L-glutamato, anteriormente descrito. As formas promastigotas de *L. amazonensis* foram incubadas em diferentes temperaturas e o transporte medido de acordo com descrito em materiais e métodos.

Os resultados estão mostrados na figura 4.5. Não houve detecção de transporte de L-glutamato em temperaturas menores do que 5°C. Entre 10 e 30 °C a atividade aumentou linearmente, atingindo um pico à 31° C. Para temperaturas acima de 31°C, a incorporação de L-glutamato declinou até a temperatura de 45° C. Os valores da região linear da curva foram usados para calcular a energia de ativação do sistema através de uma plotagem em um gráfico de Arrhenius (Figura 4.5, *inset*), dando um valor de 52.38 kJ/mole.

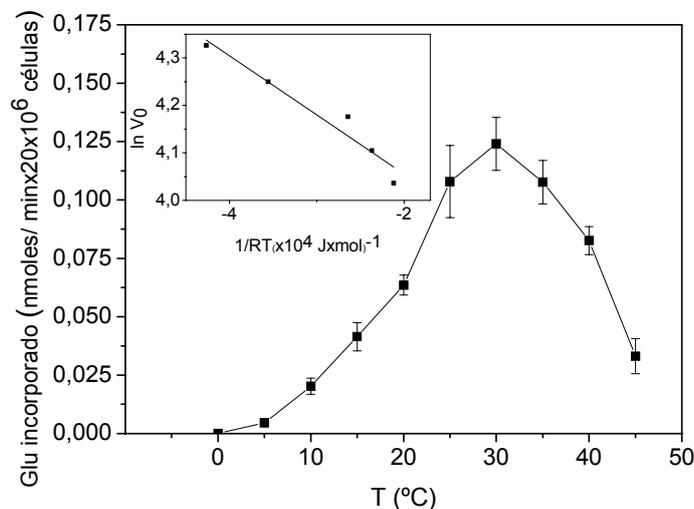


Figura 4.5. Variação do transporte de L-glutamato em função da temperatura. Promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram incubados em diferentes temperaturas e a V_0 correspondente a 20×10^6 células foi medida. Inset: plotagem em um gráfico de Arrhenius a partir do qual a aparente energia de ativação foi medida. Média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicatas.

e) Efeito de H⁺ e cátions no transporte de L-glutamato em *L. amazonensis*

O efeito de H^+ foi avaliado usando PBS modificado de forma a variar o pH do meio extracelular (Fig. 4.6)

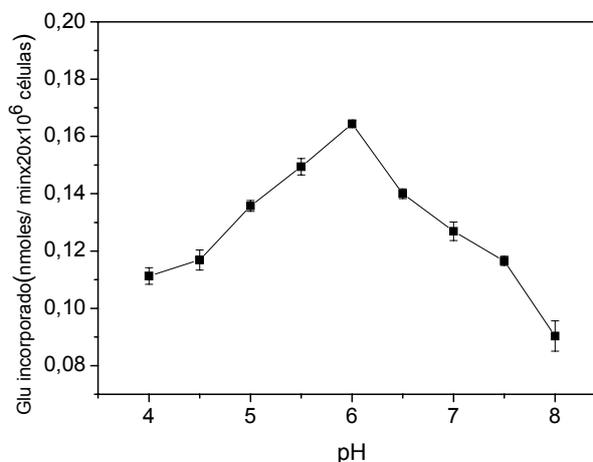


Figura 4.6. Efeito de cátions extracelulares no transporte de L-glutamato. Transporte de L-glutamato em função do pH extracelular em promastigotas de *Leishmania amazonensis*. A V_0 correspondente a 20×10^6 células foi medida em uma faixa de pH entre 4 e 8 em PBS. Média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicatas.

Há uma variação do transporte de acordo com o pH extracelular. O transporte aumenta consideravelmente entre o pH 4 e pH 6, e diminui em entre o pH 6 e 8. O pico de transporte é observado em pH 6.

Utilizando as condições ótimas de pH e temperatura a sensibilidade do sistema de transporte a cátions Na^+ , K^+ and H^+ foi analisada. O ensaio para avaliar o efeito de íons extracelulares Na^+ e K^+ foram feitos comparando a $V_{máx}$ do sistema entre parasitas incubados com PBS e PBS modificado substituindo todo o NaCl por KCl (K^+) ou substituindo todo o KCl por NaCl (Na^+). O controle é feito ajustando-se a um equilíbrio iônico usando Colina. Após 60s de incubação o transporte foi medido de acordo com explicado em materiais e métodos. Os resultados estão demonstrados na figura 4.7, onde é possível observar que houve um aumento na $V_{máx}$ do transporte quando os parasitas foram incubados na presença apenas do íon K^+ , enquanto que nas outras condições não houve efeito no transporte.

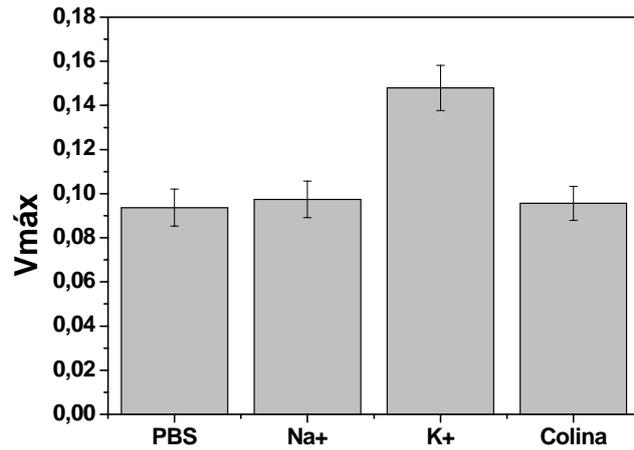


Figura 4.7. Efeito de cátions extracelulares no transporte de L-glutamato. Efeito dos cátions Na + e K+ no transporte de L-glutamato. A $V_{máx}$ correspondente a 20×10^6 células foi medida em PBS (145mM Na+ e 4.5mM K+) ou em PBS contendo apenas Na+ (149.5mM) ou K+(149.5mM). A colina (139.7mM) foi usada como controle. Média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicatas.

f) Mecanismos de transporte de L-glutamato em *Leishmania amazonensis*

Para avaliar de forma mais criteriosa a participação de diferentes mecanismos celulares no transporte de glutamato em promastigotas de *L. amazonensis*, tratamentos com diferentes inibidores foram realizados como mostra a figura 4.8.

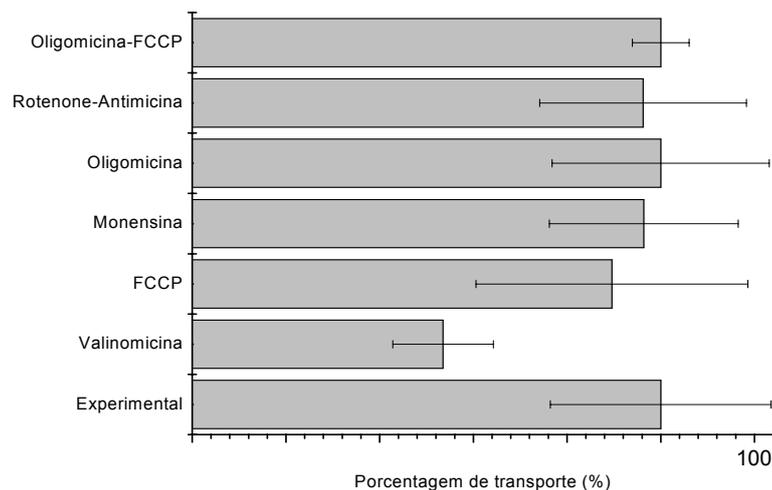


Figura 4.8. Efeito de inibidores no transporte de L-glutamato em promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Parasitas lavados com PBS foram ressuspensos em PBS, à 28° C, contendo a concentração desejada do inibidor. L- glutamato radioativo foi imediatamente adicionado em soluções contendo 0.59mM de L.glutamato e a V_0 medida após 30 s de incubação. Obs: o tratamento com antimicina é feito com pré-incubação dos parasitas durante 30 min, à 28°C.

Para verificar se o sistema de transporte de glutamato é ativo ensaios foram feitos com inibidores de ATPases (Oligomicina, 5µg/mL) e com inibidores da cadeia respiratória (Rotenona 200µM e Antimicina A 0.5µM). O sistema não foi afetado como se pode observar comparando os parasitas tratados e não tratados com esses inibidores, indicando que não se trata de um sistema dependente de ATP.

Para estudar mais a fundo os mecanismos envolvidos nesse sistema de transporte foram utilizados ionóforos sozinhos ou na presença de inibidores de cadeia respiratória. O ionóforo FCCP aumenta o transporte de H⁺ através da membrana (Benz R e McLaughlin C 1983). O tratamento com FCCP (0.5µM) afetou parcialmente o sistema. Porém o efeito do ionóforo FCCP, pode ser devido à direta desrupção do gradiente de H⁺ ou devido a uma rápida hidrólise de ATP, pelas H⁺/ATPases para restabelecer o gradiente de H⁺. Para diferenciar entre essas duas possibilidades foi feito um ensaio utilizando o ionóforo FCCP concomitante ao tratamento com oligomicina, para impedir a hidrólise de ATP. Como pode ser observado não houve efeito no transporte utilizando esses inibidores juntos, sugerindo mais uma vez que o transporte é independente de ATP, e que o efeito observado com o ionóforo é devido unicamente a desrupção do gradiente de H⁺ (Fig. 4.8)

O tratamento com Monensina (50µM), um inibidor de canais de Na⁺, confirmou que a o íon não está envolvido no transporte de L-glutamato, enquanto que o tratamento com Valinomicina (200µM), um inibidor de canais de K⁺, compromete em torno de 50% a incorporação de L-glutamato em *Leishmania amazonensis* (Fig. 4.8), corroborando os resultados obtidos anteriormente.

4.2. Caracterização *in silico* e molecular de enzimas envolvidas no metabolismo de asparagina de *Trypanosoma cruzi*

Existem duas enzimas chaves no metabolismo de asparagina, a Asparagina Sintetase e a L-Asparaginase. A Asparagina Sintetase é capaz de sintetizar asparagina a partir de aspartato, enquanto que a L-Asparaginase hidroliza arginina liberando aspartato e amônio (Fig. 1.6). Com o objetivo de indentificar e caracterizar as enzimas envolvidas no metabolismo de asparagina em *Trypanosoma cruzi* uma abordagem *in silico* e molecular foi utilizada.

4.2.1. O gene de Asparagina Sintetase (AS)

Através de uma busca de seqüências nucleotídicas depositadas no banco de dados do GeneDB (Versão 2.1) foram encontrados dois genes anotados que codificam para putativas Asparagina Sintetases em *Trypanosoma cruzi* (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Genes de Asparagina Sintetase e L-Asparaginase encontrados em *Trypanosoma cruzi* de acordo com o GeneDB.

ID Sistemático*	Classificação*	Denominação**
Tc00.1047053503625.10	asparagine synthetase A, putative	ASA
Tc00.1047053503899.90	asparagine synthetase A, putative	ASB
Tc00.1047053505555.61	cytoplasmic l-asparaginase i-like protein, putative	AspA
Tc00.1047053510823.80	cytoplasmic l-asparaginase i-like protein, putative	AspB
Tc00.1047053504147.110	asparaginase, putative	AspC
Tc00.1047053506705.60	hypothetical protein, conserved	PhA
Tc00.1047053505987.10	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	PhB

*classificação do GeneDB

**classificação didática proposta neste trabalho

As funções de ambos os genes estão anotadas no GeneDB de acordo com a homologia com proteínas já descritas. Para efeitos de simplificação e didática a primeira será chamada de ASA e a segunda de ASB. Diversas características são compartilhadas entre ASA e ASB, como tamanho da seqüência (1047pb) e massa molecular esperada (39KDa). Além disso, não apresentam peptídeo sinal, nem domínios transmembranares. Uma comparação das seqüências nucleotídicas de ASA e ASB foi realizada utilizando o Clustal-W, de acordo com o qual foi encontrado 98% de similaridade entre os genes (dado não mostrado). A diferença corresponde a 12 substituições nucleotídicas, distribuídas aparentemente de forma aleatória ao longo das seqüências (dado não mostrado). Além disso, o alinhamento das respectivas seqüências de aminoácidos das duas proteínas através de um alinhamento utilizando o Clustal-W demonstrou que ASA e ASB codificam proteínas idênticas (dado não mostrado). A partir desses resultados o gene ASA foi escolhido para posteriores análises. ASA apresenta a assinatura da família de Asparagina Sintetase (PF03590, Pfam, Sanger Institute), uma família também chamada de Aspartato-amônia Ligase.

O gene que codifica para Asparagina Sintetase também está presente em organismos geneticamente relacionados com *Trypanosoma cruzi*, como *Leishmania infantum*, *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma*

brucei brucei. As proteínas correspondentes aos genes encontrados em tripanossomatídeos foram alinhadas como mostra a Fig. 4.9.

T.b.AS	1	VPVKAIPNASFEVVHSLAKWKRRTLAN ^Y KFAPGHGLYTHMTALRVDDVLDNIHSVVVDQW
T.b.gamb.AS	1	VPVKAIPNASFEVVHSLAKWKRRTLAN ^Y KFAPGHGLYTHMTALRVDDVLDNIHSVVVDQW
T.congo.AS	1	VSVKAIPDASFEVVHSLAKWKRQVLA ^S YGFVPGSGLYTHMTALRVDDVLDNIHSVVVDQW
T.c.ASA	1	VHVKGIPD ^S KFEVVHSLAKWKRQTLG ^D HKFPVGGGTYVHMKALRVEEELDTTHSVFVDQW
L.in.AS	1	VHVKEIPGAN ^Y EVVHSLAKWKRMTLGN ^H RFPVGRGIFTNMRALRVEETL ^D NIHSVVVDQW
L.mj.AS	1	VHVKEIPGEN ^Y EVVHSLAKWKRMTLGN ^H KFPVGRGIFTNMRALRVEETL ^D SIHSVVVDQW
T.b.AS	61	DWEMVMKDDQRNLAFLKEV ^V CKVYAAIRKTELAVCEKY-KQKPILPETIQFVHAEHLLLA
T.b.gamb.AS	61	DWEMVMKDDQRNLAFLKEV ^V CKVYAAIRKTELAVCEKY-KQKPILPETIQFVHAEHLLLA
T.congo.AS	61	DWEMVIEKQRNLEFLKDVV ^G KLYAAVRETEFVCKMY-EQKPVLPETIEFVHAEQLLOA
T.c.ASA	61	DWELVMPDQERNLTF ^L KNTVQRLYAAIRQTEEA ^T CSKY-NLDRVLPANLQFLHAEHLLKM
L.in.AS	61	DWERVIAPADRCLE ^Y LQATVRS ^L YEVLR ^E TESR ^L CTE ^F PD ^I APILPDS ^L KFVH ^E TEQLLKR
L.mj.AS	61	DWERVIAPADRCLE ^Y LQATVRS ^L YEVLR ^E TERR ^L CTE ^F PD ^I APILPDS ^L KFVH ^E TEQLLKR
T.b.AS	120	YPNLTAKEREREIAREYGA ^V FLIGIGAVLSSGDRHDARAPDYDDWTS ^P VBA--SOVVFPR
T.b.gamb.AS	120	YPNLTAKEREREIAREYGA ^V FLIGIGAVLSSGDRHDARAPDYDDWTS ^P VBA--SOVVFPR
T.congo.AS	120	YPTLSPKEREREIVK ^K YGA ^V FLVIGIGQLSCGRHDARAPDYDDWSSP ^V EG--SEMASPG
T.c.ASA	120	YPEMNMKERERAI ^V KKYGA ^V FLIGIGNLTSGE ^P HDLRAPDYDDWSSP ^V SA--ADITFPC
L.in.AS	121	YPELDPKSREREAV ^K KLGA ^V FLIGIGCKLSHGDEHHDVRAPDYDDWSSP ^V SDSSKIGFPT
L.mj.AS	121	YPELDPKSREREAV ^K QFGA ^V FLIGIGCKLSHGDEHHDARAPDYDDWSSP ^V SDSSKIGFPT
T.b.AS	178	TSKPIPTMNSLSL ^K GLNGDILY ^N PTL ^D DSLE ^V SSMGIRVNAEALRHQ ^L SLTGDDSLLK
T.b.gamb.AS	178	TSKPIPTMNSLSL ^K GLNGDILY ^N PTL ^D DSLE ^V SSMGIRVNAEALRHQ ^L SLTGDDSLLK
T.congo.AS	178	TG ^L LTPMNSLCSL ^K GLNGDILY ^N PVLD ^V LELSSMGIRVDAE ^L LRRLQELTGD ^E EELMK
T.c.ASA	178	G---DPTMNSL ^S L ^P GLNGDILY ^N PVLD ^V LELSSMGIRVDAE ^L LRRLQELTGD ^E EDRLG
L.in.AS	181	AD ^E EKPSVNTIMS ^L QGLNGDILY ^N PVLD ^V LELSSMGIRVDAE ^L LRRLQELTGD ^E SDRLQ
L.mj.AS	181	AD ^E EKPSVNTIMS ^L QGLNGDILY ^N PVLD ^V DALELSSMGIRVDAE ^L LRRLQELTGD ^E SDRLK
T.b.AS	238	SEWHQQLLN ^G EF ^P QTVGGGIG ^Q SRMVMFMRKKHIGEVQCSVWP ^E EIRKHNLL
T.b.gamb.AS	238	SEWHQQLLN ^G EF ^P QTVGGGIG ^Q SRMVMFMRKKHIGEVQCSVWP ^E EIRKHNLL
T.congo.AS	238	SEWHQQLLN ^G EF ^P QTVGGGIG ^Q SRLIMFMRKKHIGEVQCSVWP ^E EETREYGLL
T.c.ASA	235	YVWHKRLLAG ^E F ^P QTVGGGIG ^Q SRLIML ^L LLKKKHIGEVQCSVWP ^E KEMRQNYPLL
L.in.AS	241	CRWHQC ^V LN ^G DL ^P QTVGGGIG ^Q SRTIVMFMRKKHIGEVQCSVWP ^E EVTAQYSLL
L.mj.AS	241	CRWHQC ^V LN ^G DL ^P QTVGGGIG ^Q SRTIVMFMRKKHIGEVQCSVWP ^E EVTTQYSLL

Figura 4.9. Alinhamento da proteína Asparagina Sintetase de tripanossomatídeos. As seqüências correspondem a *Trypanosoma brucei* (T.b.AS), *Trypanosoma brucei gambiense* (T.b.gamb. AS), *Trypanosoma congolense* (T.congo AS), *Trypanosoma cruzi* (T.c. ASA), *L. infantum* (L.in.AS) e *Leishmania major* (L.mj.AS). As seqüências foram alinhadas utilizando o Clustal-W, os aminoácidos conservados foram marcados em preto e os aminoácidos similares em cinza, de acordo com o BoxShade 3.2.

A análise dos dados permitiu observar que há uma similaridade na faixa de 53 a 99% entre as proteínas dos diferentes tripanossomatídeos. A Asparagina Sintetase de *T. brucei brucei* apresenta 99% de similaridade com a de *T. brucei gambiense*, enquanto que a de *L. infantum* apresenta 93% com a de *L. major*. Dentre estas proteínas as mais similares a ASA de *T. cruzi* são as de *T. brucei brucei* (64%) e a de *L. major* (61%).

Utilizando a ferramenta BLAST, para comparação da ASA de *T. cruzi* com outras proteínas depositadas no GenBank foi possível encontrar 73% de similaridade com AS de *Yersinia pestis* e 70% de similaridade com AS de *Escherichia coli*. Em contrapartida a ASA de *T. cruzi* é bastante divergente da AS encontrada em humanos (similaridade de 21%).

Uma busca de motivos importantes presentes na enzima codificada pelo gene ASA foi feita utilizando o programa PROTOGIM, desenvolvido pelo nosso grupo (Cestari IS e col 2006). De acordo com esta análise a ASA de *T. cruzi* apresenta sítios de ligação de Ferro, o que poderia estar relacionado com sua função, e sítios de adição de N-meristoil, que poderia ser uma importante modificação pós-traducional para a correta função da enzima, que poderia ser posteriormente explorada.

4.2.2. O gene de L- Asparaginase (L-Asp)

De acordo com o GeneDB, em *T. cruzi*, existem 3 genes que codificam para putativas L-Asparaginases, e mais 2 genes que codificam para proteínas hipotéticas que apresentam domínios e assinaturas de L-Asparaginases, sendo um deles um pseudogene. Os genes e os seus respectivos ID estão listados na tabela 4.1.

O alinhamento múltiplo das seqüências (Tabela 4.2) permitiu observar que há uma diferença bastante significativa entre os genes. A duas proteínas hipotéticas (PhA e PhB) apresentam similaridade de 96% entre elas, porém PhB é um pseudogene. A proteína citoplasmática T.c.AspA apresenta aproximadamente metade do tamanho da T.c.AspB e não apresenta os motivos e assinaturas comuns de L-Asparaginases, podendo ser um gene erradamente seqüenciado ou anotado, sendo por isso removido das análises posteriores. A T.c.AspC apresenta similaridade muito baixa com as outras proteínas (2 a 27%), porém apresenta domínios e assinaturas da família de L-Asparaginases. Para estudos moleculares e posterior caracterização funcional do gene selecionamos a T.c.AspB.

Tabela 4.2. Alinhamento múltiplo de putativas L-Asparaginase de *Trypanosoma cruzi*. O alinhamento foi feito utilizando o Clsutil-W.

Seqüência A	Seqüência B	% Similaridade
1 T.c.AspB	2 T.c.AspC	27
1 T.c.AspB	3 T.c.PhA	6
1 T.c.AspB	4 T.c.PhB	11
1 T.c.AspB	5 T.c.AspA	94
2 T.c.AspC	3 T.c.PhA	7
2 T.c.AspC	4 T.c.PhB	2
2 T.c.AspC	5 T.c.AspA	18
3 T.c.PhA	4 T.c.PhB	96
3 T.c.PhB	5 T.c.AspA	6
4 T.c.PhB	5 T.c.AspA	7

Uma busca de motivos e expressões regulares em T.c.AspB foi realizada utilizando o PROTOGIM. De acordo com essa ferramenta T.c.AspB apresenta o motivo de Asparaginase/Glutaminase, sinais de direcionamento para organelas da via secretora, sítios de N-glicosilação e sítios de N-miristilação. Utilizando a ferramenta signalP 3.0 foi observado que o gene apresenta um peptídeo sinal na região N-terminal (Figura 4.10).

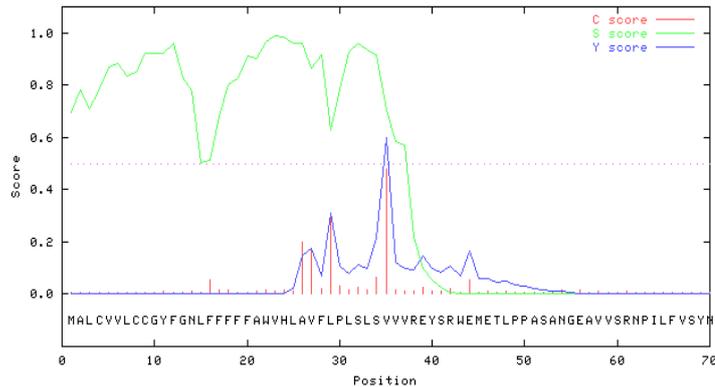


Figura 4.10. Predição de peptídeo sinal utilizando o SignalP, demonstrando um possível sítio de clivagem entre a posição 34 e 35 da proteína T.c.AspB de *Trypanosoma cruzi*.

Utilizando o TMHMM foi observado que existem duas possíveis hélices transmembranares na proteína T.c.AspB, uma na posição 15 – 37 e outra na posição 89 – 108 (Figura 4.11).

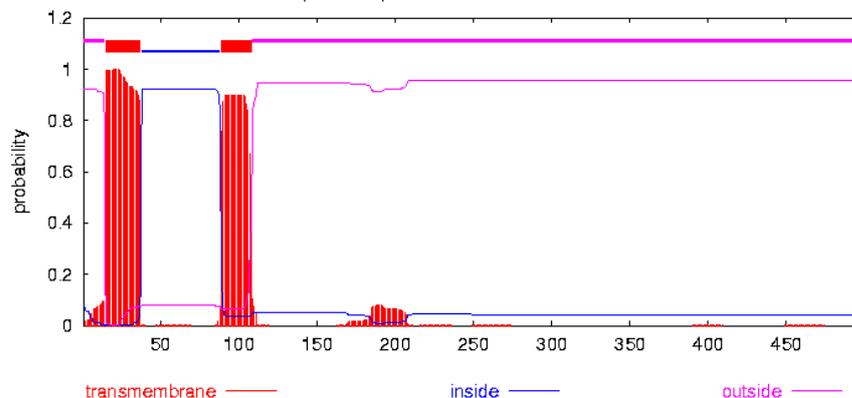


Figura 4.11. Previsão de regiões transmembranares de T.c.AspB de *Trypanosoma cruzi* utilizando o TMHMM.

Foram encontrados 6 outros genes que codificam para L-Asparaginases em tripanossomatídeos, 2 de *Leishmania major* (chamados de L.mj.AspA e L.mj.AspB), 2 de *Leishmania infantum* (chamados de L.inf.AspA e L.inf.AspB) e 2 de *Leishmania brasiliensis* (chamados de L.b.AspA e L.b.AspB). É interessante observar não há genes para L-Asparaginase no genoma de parasitas do complexo *T. brucei*. As seqüências de aminoácidos encontradas em tripanossomatídeos foram alinhadas e o resultado está representado na figura 4.12.

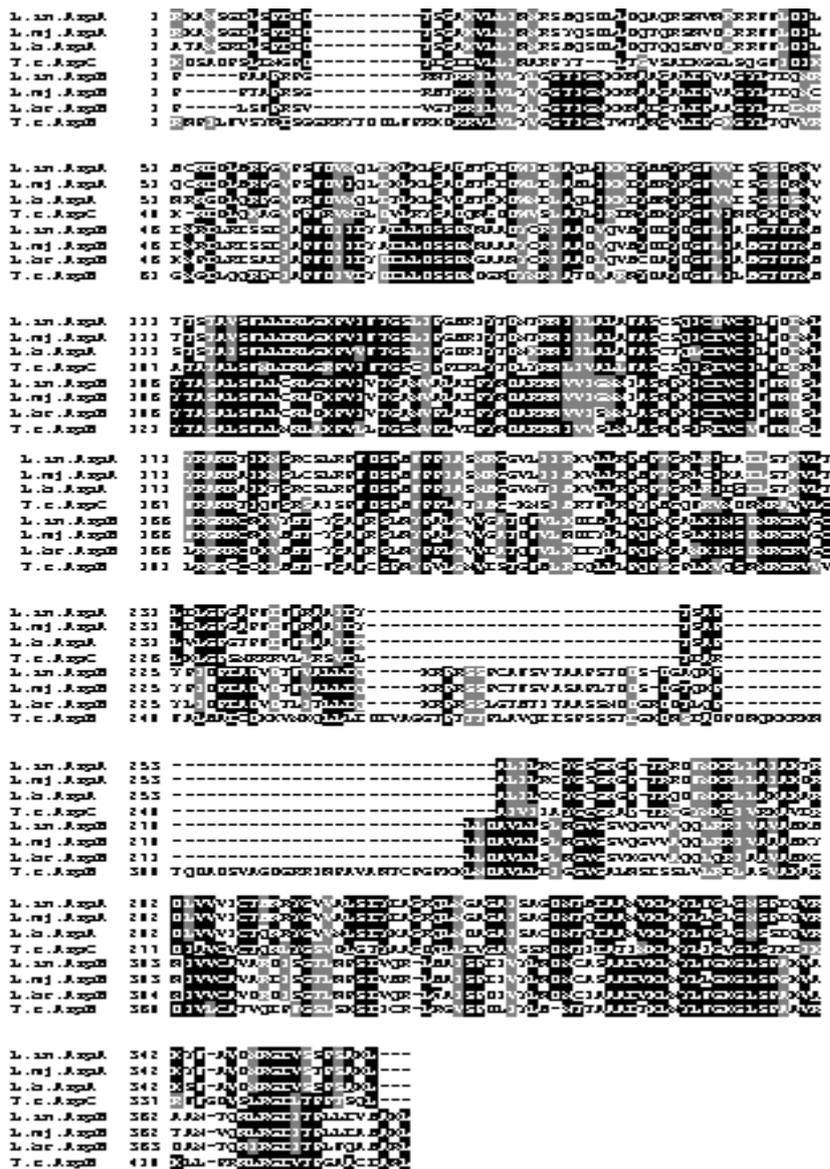


Figura 4.12. Alinhamento da proteína L-Asparaginase de tripanossomatídeos. As seqüências são dos seguintes organismos *Leishmania infantum* (L.in.AspA e L.in.AspB), de *Leishmania major* (L.mj.AspA e L.mj.AspB), *Leishmania brasiliensis* (L.b.AspA e L.b.AspB) e *Trypanosoma cruzi* (T.c.AspA e T.c.AspB). As seqüências foram alinhadas utilizando o Clustal-W, os aminoácidos conservados foram marcados em preto e os aminoácidos similares em cinza, de acordo com o BoxShade 3.2.

De acordo com o Clustal-W foi observado que L.in.AspA é mais similar a L.mj.AspA (94%), assim como a L.in.AspB é mais similar a L.mj.AspB(92%). A L.b.AspA apresenta 84% de similaridade com a L.mj.AspA e L.in.AspA. Porém quando se compara a AspA com a AspB de uma mesma espécie observa-se não mais do que 25% de similaridade. A T.c.AspB apresenta 54% de similaridade com L.b.AspB e 51% com L.mj.AspB.

A L-Asparaginase foi encontrada em diversos outros organismos. Utilizando as seqüências de aminoácidos encontradas uma árvore filogenética foi gerada e está representada na figura 4.13.

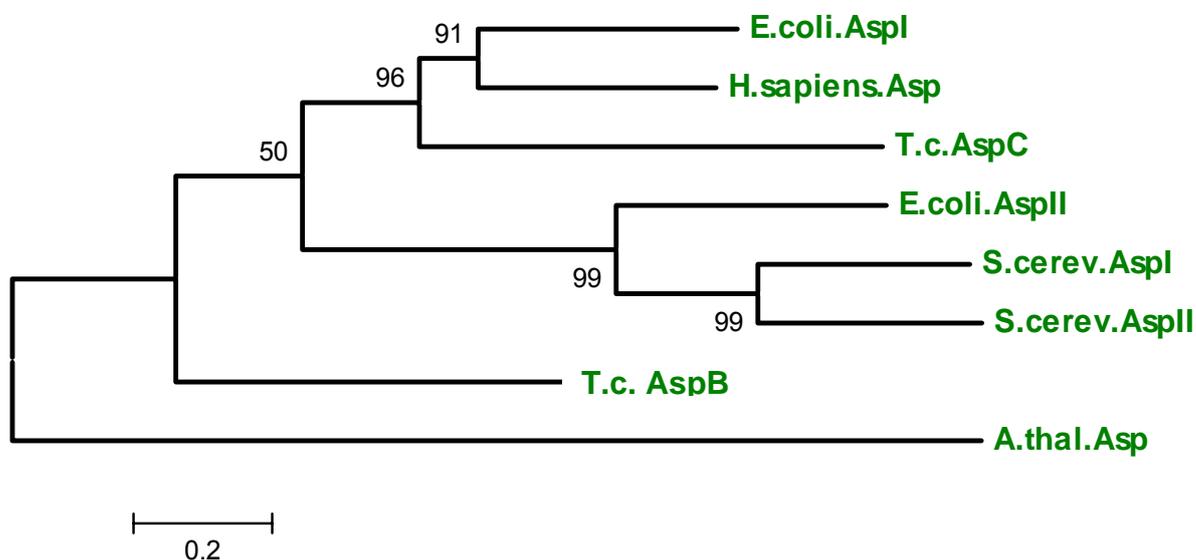


Figura 4.13. Filogenia da seqüência de aminoácidos da proteína L-Asparaginase de diferentes organismos. A árvore filogenética foi gerada utilizando o método de Neighbor-joining usando o programa MEGA 3.1. O tamanho dos braços é proporcional à distância entre as seqüências de aminoácidos. O valor de *bootstrap* de 1000 réplicas está indicado.

A comparação das seqüências das proteínas L-Asp, incluindo outros organismos geneticamente distantes, permitiu observar a presença de dois resíduos conservados de glicina (G) entre os organismos, que está representado na figura 4.14. Estes resíduos estão presentes na região catalítica em organismos cuja proteína já foi caracterizada funcionalmente.

```

T.c.AspB      -----GGVGALNSESSLVLRELASVAKARDIVLCATVQEP-----F 431
T.c.AspA      -----GGVGALNSESSLVLRELASVAKARDIVLCATVQEP-----F 165
E.coli.AspI    -----YGGNAPQN-KAFLQELQ-EASDRGIVVVNLTQCM-----S 275
H.sapiens.Asp -----FGSNGPTK-PDLLQELR-VATERGLVIVNCTHCL-----Q 301
G.lamb.Asp     -----YGAGNGPTDDKHFVSAIK-LLKSKNVVVIGVTQTH-----W 330
D.disc.AspI    -----YGSNAPAKKSRFLEAIT-LAVKRGVIVIVTSQCL-----R 367
T.c.AspC      -----YGGNAPTRGGYMKEIVR-KAVERDIAVCVCTQNL-----Y 320
S.cerev.AspI   -----MGAGSLPEE---VNETCM---KLS-LPIVYSKRS-----M 324
S.cerev.AspII -----SGAGSWTATGSIVNEQLY---EEYGIPIVHSRRT-----A 311
E.coli.AspII   -----VCNGNLYKSVFDTLATA---KTGTAVVRSRVP-----T 297
D.disc.AspII   -----TGTEAFMRTVAAFDIAAMMEYGSLSLKDASNKVV-----M 292
A.thal.Asp     FLVGCCVSGAGEYLMRGFAARECCTSLALSQAGPASAAMKVLRSVMHQESSKIGTADKTA 332

```

Figura 4.14. Alinhamento múltiplo de L-asparaginases de diferentes organismos representando a região onde foram encontrados 2 resíduos de Glicina(G) conservados. O Alinhamento foi realizado utilizando o Clustal-W. Os organismos representados são: *Trypanosoma cruzi* (T.c.AspA, T.c.AspB e T.c.AspC), *Escherichia coli* (E.coli.AspI e E.coli.AspII), *Homo sapiens* (H.sapiens.Asp), *Giardia lamblia* (G.lamb.Asp), *Dysctiostelium discoideum* (D.disc.AspI e D.disc.AspII), *Sacharomycea cerevisiae* (S.cerev.AspI e S.cerev.AspII) e *Arabidopsis thaliana* (A.thal.Asp).

4.2.3. Amplificação dos genes ASA e AspB de *Trypanosoma cruzi*

Para amplificação da ORF do gene ASA e ORF do gene AspB de *Trypanosoma cruzi*, oligonucleotídeos específicos foram desenhados para as respectivas regiões. Após obtenção de DNA genômico da cepa CL Brener de *T. cruzi*, 20 ng de DNA foram utilizados para uma reação em cadeia da polimerase (PCR) nas condições descritas em materiais e métodos. Diferentes concentrações de Cloreto de Magnésio foram testadas para otimizar a reação de amplificação. Como mostra a figura 4.15, para o gene ASA a concentração de 2.0 mM de MgCl₂ apresentou uma amplificação de menor intensidade do que as concentrações de 1,5 mM e 2,5 mM, porém nessas duas concentrações não houve diferença significativa entre a intensidade das bandas. Baseado nesses resultados as reações de PCR subsequentes para o gene ASA foram feitas utilizando a concentração de 1,5mM de MgCl₂. A mudança de concentração de MgCl₂ na PCR de AspB (Fig. 4.16) não alterou a intensidade da banda, porém na concentração de 2,5 mM, foi observada a amplificação de uma banda inespecífica. Baseado nesses dados a concentração de 1,5 mM foi utilizada em amplificações posteriores.

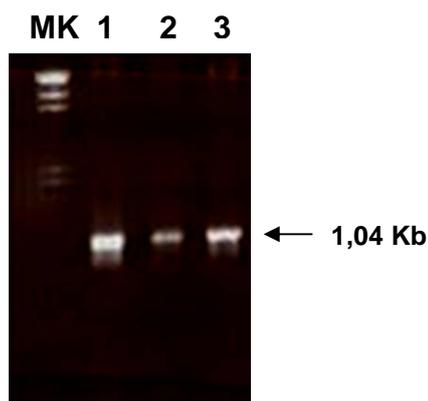


Figura 4.15. Gel de agarose a 0.8% contendo o gene ASA amplificado por PCR a partir de DNA genômico de *Trypanosoma cruzi* CL-Brener, com diferentes concentrações de MgCl₂. MK λ *HindIII*; Poço 1: 1,5mM MgCl₂; Poço 2: 2,0mM MgCl₂; Poço 3: 2,5mM MgCl₂.

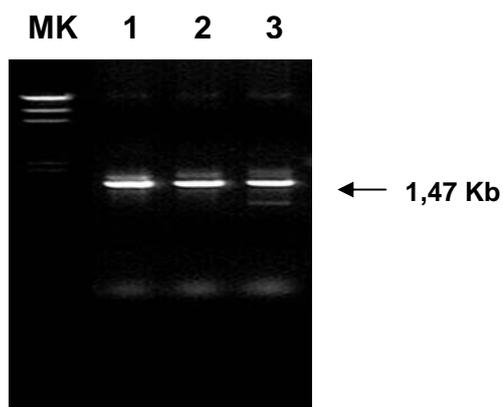


Figura 4.16. Gel de agarose 0.8% representando o gene AspB de *Trypanosoma cruzi* CL Brener amplificado por PCR a partir de DNA genômico variando a concentração de MgCl₂. MK λ *HindIII*; Poço 1: 1,5mM MgCl₂; Poço 2: 2,0mM MgCl₂; Poço 3: 2,5mM MgCl₂.

4.2.4. Construções

a) Clonagem em pGEM-T easy

Produtos de PCR foram clonados no vetor pGEM-T aproveitando o estado linearizado do vetor e a presença de uma timina flanqueadora que permite a entrada de produtos amplificados pela enzima Taq Polimerase, uma enzima incluída na reação de PCR, que adiciona uma adenina aos produtos de PCR ao final de cada ciclo de amplificação.

Para as construções pGEM-ASA e pGEM-AspB os genes foram amplificados por PCR, purificados a partir de gel de agarose e diretamente clonados no vetor pGEM-T easy (PROMEGA, mapa em anexo) (Fig. 4.17) através de uma reação de ligação, utilizando a enzima T4 ligase. Os produtos da ligação foram transformados em células competentes *E. coli* DH5 α preparadas de acordo como descrito em materiais e métodos. O DNA de colônias recombinantes foi obtido e digerido com as enzimas *HindIII* e *XhoI* e analisado em gel agarose através de eletroforese. As figuras 4.18 e 4.19 mostram a liberação dos insertos correspondentes aos genes clonados.

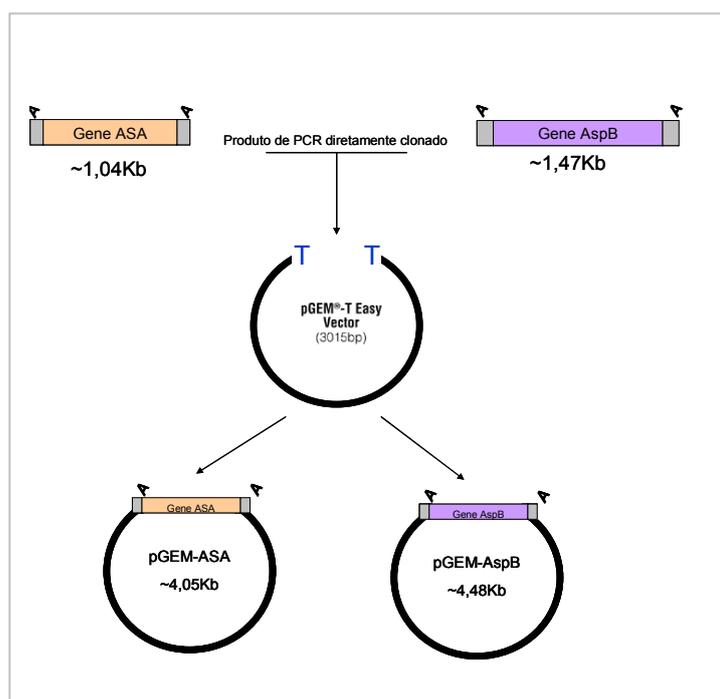


Figura 4.17. Esquema de clonagem do gene ASA e AspB de *Trypanosoma cruzi* no vetor pGEM-T easy.

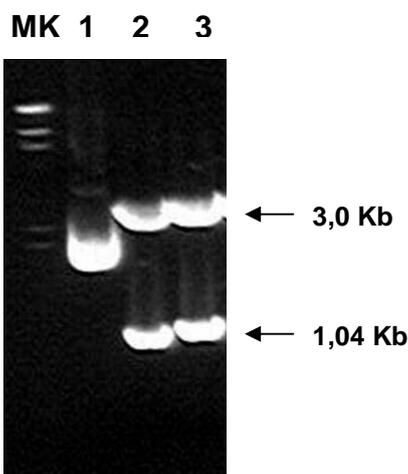


Figura 4.18. Clonagem do gene ASA de *Trypanosoma cruzi* em pGEM-T easy. MK λ *HindIII*; Poço 1: Vetor pGEM-T easy não digerido; Poço 2 e 3: pGEM-ASA digerido com *HindIII* e *XhoI* Clones 1 e 2, respectivamente

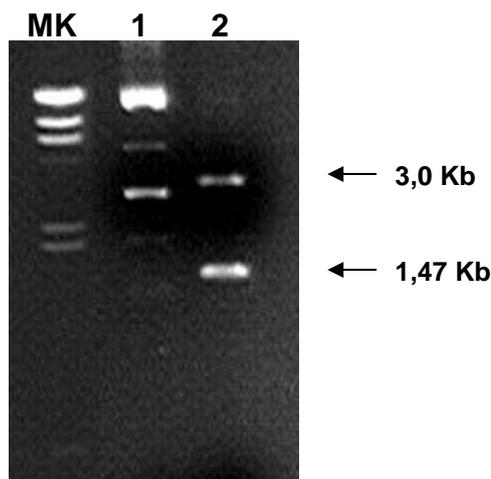


Figura 4.19. Clonagem do gene AspB de *Trypanosoma cruzi* no vetor pGEM-T easy. MK λ *HindIII*; Poço 1: Vetor pGEM-T easy não digerido; Poço 2: pGEMAspB digerido com *BamHI* e *HindIII* Cone 1.

b) Clonagens em Pet28a(+)

Para expressão de proteína recombinante em bactérias o plasmídeo pET28a(+) foi utilizado (ver mapa em anexo) o qual permite a clonagem do gene desejado em fase com uma cauda de 6 histidinas C-terminal, facilitando a purificação posterior da proteína em coluna de níquel.

A construção pGEM-ASA e o plasmídeo Pet28a(+) foram digeridos com as enzimas *HindIII* e *XhoI*, o que permitem a clonagem direcionada do gene ASA no vetor Pet28a(+) (Figura 4.20).

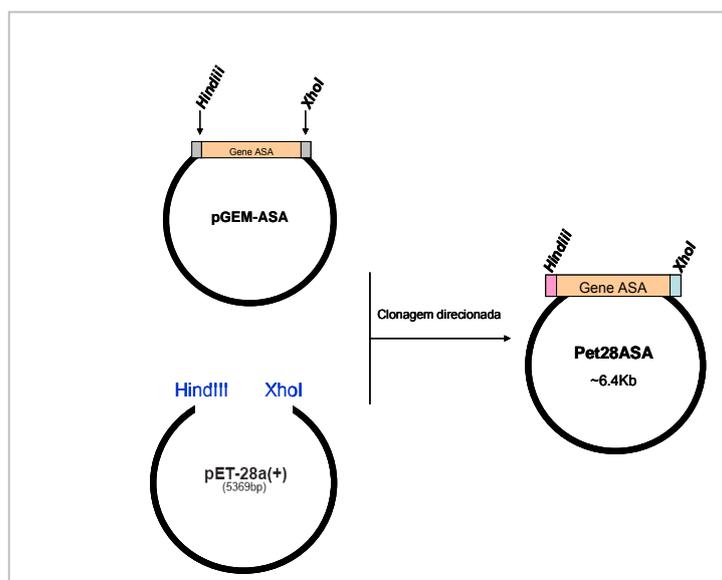


Figura 4.20. Esquema da estratégia de clonagem do gene ASA no vetor de expressão em bactéria pET28a(+).

Os produtos das clivagens com as enzimas de restrições foram submetidas a eletroforese para recuperação do inserto e do plasmídeo Pet28a(+) linearizado. Após

recuperação com o kit Gene Clean (Promega®) os produtos foram submetidos a eletroforese e quantificados (Fig. 4.21).

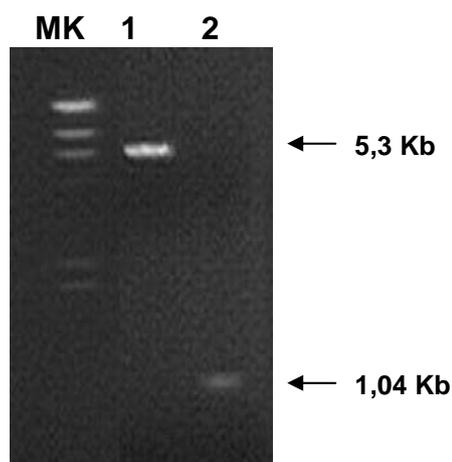


Figura 4.21. Análise de produtos de clivagem purificados em gel de agarose 0.8%. MK λ *HindIII*; Poço 1: Pet28a(+) digerido com *HindIII* e *XhoI*; Poço 2: Produto de PCR ASA digerido com *HindIII* e *XhoI*.

A quantificação do DNA plasmidial e do inserto foi feita através da comparação de intensidade das bandas com o marcador de peso molecular utilizado. Os cálculos foram feitos para que a reação da ligação mantenha uma relação molar de 1:5 - 10 (vetor:inserto). Após a ligação e transformação em bactérias competentes, colônias recombinantes foram analisadas através de digestão com *HindIII* e *XhoI*. Vários clones positivos foram encontrados, sendo um deles selecionado para obtenção de DNA plasmidial em grande escala pelo método de lise alcalina descrita em materiais e métodos. Este clone está representado na figura 4.22.

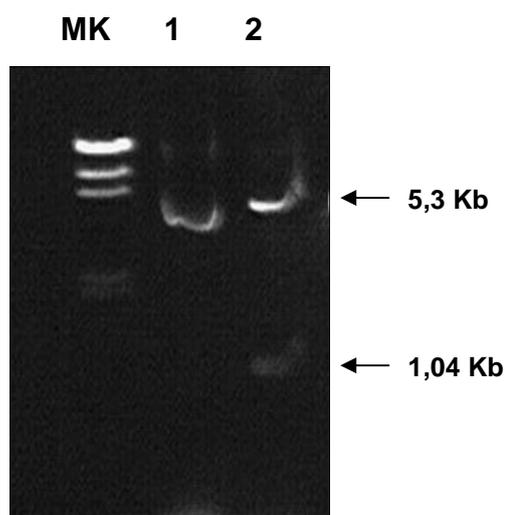


Figura 4.22. Clonagem do gene ASA de *Trypanosoma cruzi* em pET28a(+). Clone pET28ASA. Um gel de agarose a 0.8% foi corrido com as amostras de DNA plasmidial obtido a partir de 200mL de cultura de bactéria contendo o clone. MK λ *HindIII*; Poço 1: pET28a(+) não digerido; Poço 2: pET28ASA digerido com *HindIII* e *XhoI*.

Utilizando a mesma metodologia o gene AspB foi clonado em Pet28a(+), porém

os sítios utilizados para clonagem foram *Bam*HI e *Hind*III (Fig. 4.23). O plasmídeo digerido e o produto amplificado e digerido, ambos com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III foram recuperados e estão representados na figura 4.24 e o clone na figura 4.25. Após ligação e transformação, alguns clones foram obtidos e submetidos ao sequenciamento, na plataforma do Instituto Oswaldo Cruz, para confirmação da seqüência do gene.

Figura 4.23. Esquema representativo da estratégia de clonagem do gene AspB de *Trypanosoma cruzi* no vetor de expressão em bactéria pET28a(+).

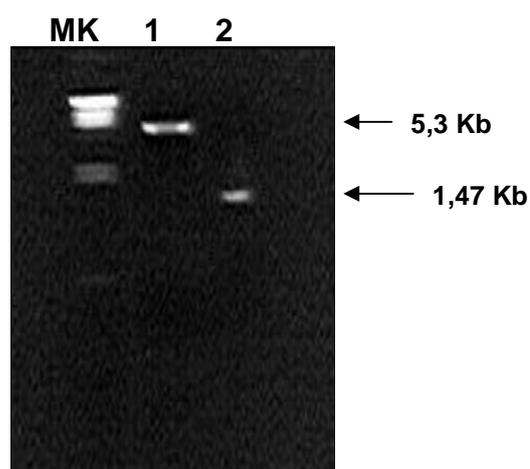


Figura 4.24. Clonagem do gene AspB de *Trypanosoma cruzi* em pET28a(+). Um gel de agarose a 0.8% foi corrido com as amostras de DNA digeridas e recuperadas a partir de gel de agarose. MK λ *Hind*III; Poço 1: pET28a(+) digerido com *Bam*HI e *Hind*III; Poço 2: Produto de PCR AspB digerido com *Bam*HI e *Hind*III.

MK 1 2

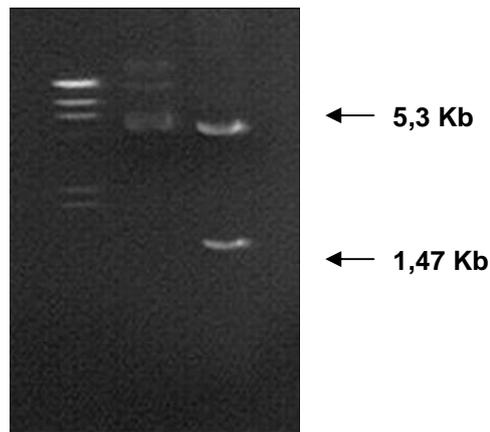


Figura 4.25. Clonagem do gene AspB de *Trypanosoma cruzi* em pET28a(+). Clone Pet28AspB. Um gel de agarose a 0.8% foi corrido com as amostras de DNA plasmidial obtido a partir de 200mL de cultura de bactéria contendo o clone. MK λ *HindIII*; Poço 1: pET28a(+) não digerido; Poço 2: Pet28AspB digerido com *BamHI* e *HindIII*

c) Clonagem em pTEX

O plasmídeo de expressão utilizado para gerar epimastigotas de *T. cruzi* transgênicos foi o vetor pTEX (Kelly e col, 1992) que apresenta um gene de resistência ao antibiótico Neomicina, permitindo que os parasitas transfectados sejam selecionados com a adição de concentrações crescentes do análogo de Neomicina, a Geneticina (G418). Além disso o vetor contém regiões regulatórias 5'UTR e 3'UTR do gene de GADPH que garante a estabilidade de RNAs exógenos expressos no parasitas. A construção pTEXASA foi gerada através da clonagem direcionada de ASA retirado de pET28ASA utilizando as enzimas de restrições *HindIII* e *XhoI*, no vetor pTEX, digerido com as mesmas enzimas (Fig. 4.26). A mesma estratégia foi utilizada para obter a construção pTEXAspB, porém utilizando os sítios *BamHI* e *HindIII*, e o gene AspB retirado da construção pET28AspB, utilizando as mesmas enzimas (Fig. 4.27). A figura 4.28 mostra os clones referentes às duas construções.

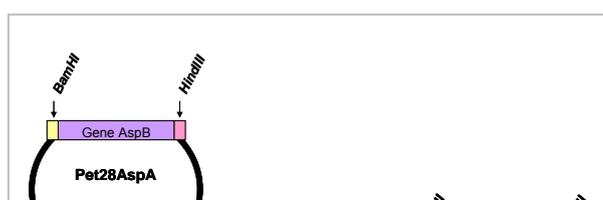


Figura 4.26. Esquema representativo da estratégia de clonagem do gene ASA de *Trypanosoma cruzi* no vetor de expressão em parasitas pTEX.

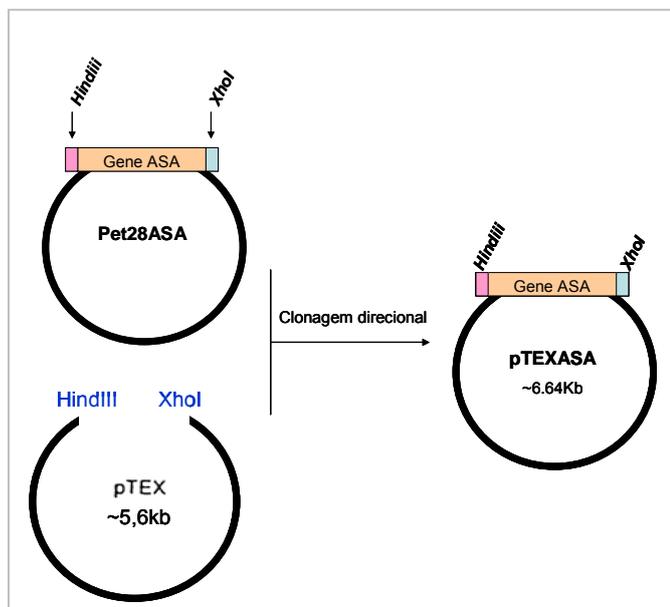


Figura 4.27. Esquema representativo da estratégia de clonagem do gene AspB de *Trypanosoma cruzi* no vetor de expressão em parasitas pTEX.

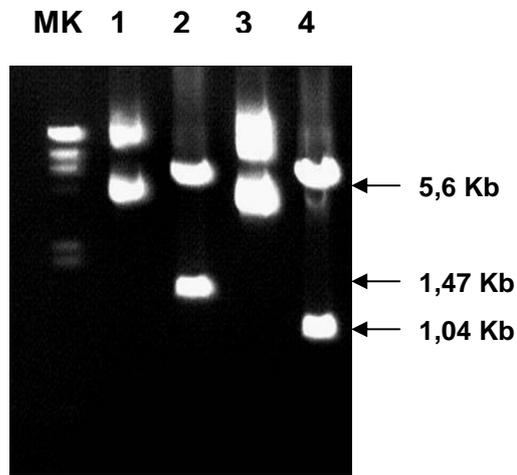


Figura 4.28. Clonagem dos genes AspB e ASA de *Trypanosoma cruzi* no vetor de expressão em parasitas pTEX. Um gel de agarose 0.8% foi corrido com o DNA plasmidial obtido a partir de 200mL de bactérias recombinantes. Clones pTEXAspB e pTEXASA. MK λ *HindIII*; Poço 1: pTEXAspB não digerido; Poço 2: pTEXAspB digerido com *BamHI* e *HindIII*; Poço 3: pTEXASA não digerido; Poço 4: pTEXASA digerido com *HindIII* e *XhoI*.

d) Clonagem em pCDNA3

Além das construções para posterior geração da proteína recombinante em sistema heterólogo, uma outra estratégia para produzir soro policlonal monoespecífico anti AspB foi realizada, sendo baseada na clonagem do gene AspB no plasmídeo pCDNA3, o qual pode ser usado para imunizações de DNA em camundongo.

O gene AspB foi retirado da construção pET28AspB, como mostra a figura 4.29, através da digestão com *BamHI* e *NotI* e subclonado em pCDNA3 digerido com as mesmas enzimas. O clone está representado na figura 4.30.

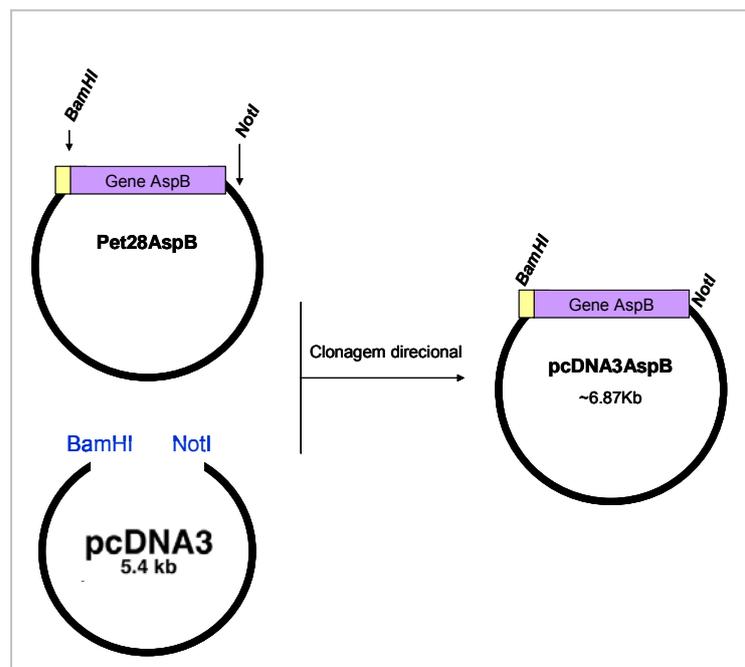


Figura 4.29. Esquema representativo da estratégia de clonagem do gene AspB de *Trypanosoma cruzi* no vetor pCDNA3.

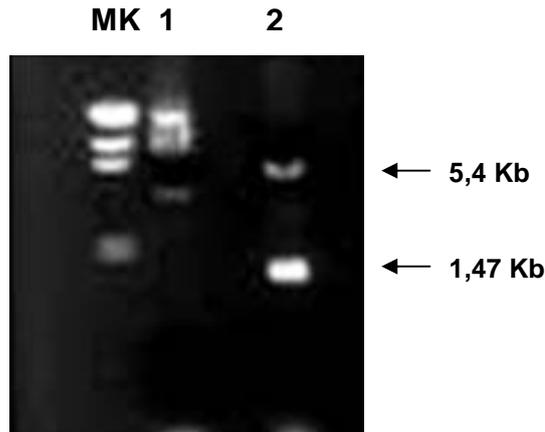


Figura 4.30. Clonagem dos genes AspB de *Trypanosoma cruzi* no vetor parasitas pCDNA3. Um gel de agarose 0.8% foi corrido com o DNA plasmidial obtido a partir de 200mL de bactérias recombinantes. Clone pCDNA3. MK λ *HindIII*; Poço 1: pCDNA3AspB não digerido; Poço 2: pCDNA3AspB digerido com *BamHI* e *NotI*.

4.2.5. Imunização de Camundongos BALB/C com pCDNA3AspB

Uma colônia recombinante de pCDNA3AspB foi crescida durante 16 horas em 400mL de LB contendo o antibiótico de seleção (Ampicilina 100 μ g/mL). Posteriormente um gradiente de Cloreto de Césio foi gerado, permitindo a separação de bandas que correspondem ao DNA plasmidial circular de acordo com descrito em Materiais e Métodos. Ao final da purificação o DNA plasmidial foi aplicado em um gel de agarose (Fig. 4.31) e quantificado em um espectofotômetro. Um total de 6 mg de pCDNA3AspB foi obtido na concentração de 3 μ g/ μ L.

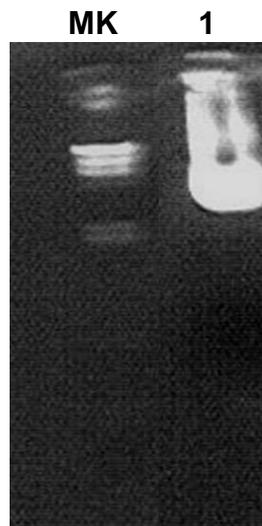


Figura 4.31. DNA plasmidial de pCDNA3AspB purificado a partir de 400mL de bactérias recombinantes através de Gradiente de CsCl₂. MK λ *HindIII*; Poço 1: pCDNA3AspB purificado.

As imunizações de camundongos BalB/C, de 6 a 8 semanas, foi realizada de acordo com a Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Imunização de BalB/C de 6 a 8 semanas com pCDNA3AspB.

Camundongo	1ª Imunização(Dia 1)	2ª Imunização(Dia 15)	3ª Imunização(Dia 30)
Controle (pCDNA3)	100µg pata	100µg pata	100µg pata
Experimental 1 (pCDNA3AspB)	100µg pata	100µg pata	100µg pata
Experimental 2 (pCDNA3AspB)	100µg pata	100µg pata	100µg pata
Experimental 3 (pCDNA3AspB)	100µg pata	100µg pata	100µg pata

Foi realizada punção cardíaca após 45 dias da imunização dos camundongos, retirando-se em torno de 1mL de sangue, correspondente a mais ou menos 200µL de soro policlonal anti-AspB.

4.2.6. Presença dos genes ASA e AspB em *Trypanosoma cruzi* TcI e TcII

O nosso grupo está interessado na busca de padrões e diferenças nas cepas do grupo *TcI* e *TcII*, de acordo com classificação de Zingales, 2000. Para avaliar se há alguma diferença em relação à presença do gene de ASA e AspB e os seus respectivos tamanhos, realizamos uma PCR utilizando DNA genômico de representantes de *TcI* e de *TcII*, gentilmente cedidos pela Dr. Ana Jansen (Departamento de Parasitologia/FIOCRUZ). Foi observado que o gene está presente nos dois grupos, apresentando bandas no mesmo tamanho do gene da cepa de referência *T. cruzi* CL Brener (Figs 4.32 e 4.33).

I

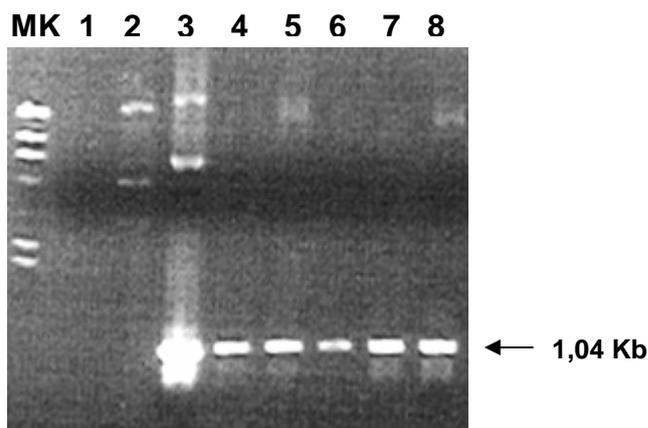


Figura 4.32. Amplificação do gene ASA em diferentes grupos de *T. cruzi*. MK: λ HindIII; Poço 1: controle sem DNA; Poço 2: controle negativo pTEX; Poço 3: controle positivo pTEXASA; Poço 4: T.c. CL-Brener (TcII); Poço 5: T.c. MLC88 (TcII); Poço 6: T.c. JCT1 (TcII); Poço 7: T.c. Colombiana (TcI); Poço 8: T.c. 4264 (TcI).

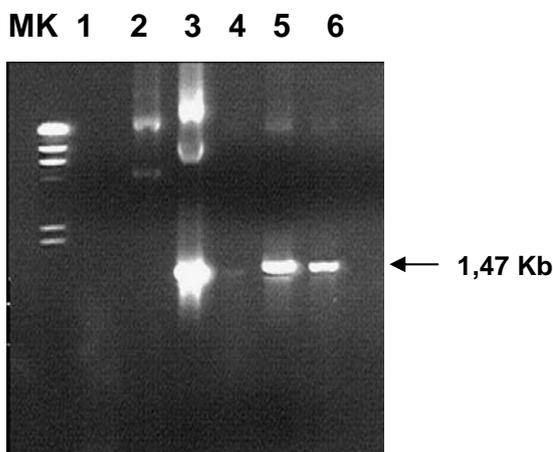


Figura 4.33. Amplificação do gene AspB em diferentes grupos de *Trypanosoma cruzi*. MK: λ HindIII; Poço 1: controle sem DNA; Poço 2: controle negativo pTEX; Poço 3: controle positivo pTEXAspB; Poço 4: T.c. CL-Brener (TcII); Poço 5: T.c. MLC88 (TcII); Poço 6: T.c. 4264 (TcI).

4.2.7. Presença do gene de Asparaginase no genoma de *T. cruzi* CL Brener

Para comprovar a existência do gene de L-Asparaginase no genoma de *T. cruzi* CL-Brener e posteriormente averiguar o número de cópias, um Southern Blot foi realizado utilizando como sonda o gene AspB amplificado por PCR a partir da construção pGEM-AspB e posteriormente recuperado a partir de gel de agarose. A sonda foi marcada radioativamente de acordo com descrito em materiais e métodos e incubada com a membrana de nylon contendo o DNA genômico de *T. cruzi* CL-Brener (25 μ g) não digerido e digerido com *EcoRI*. Foi observada (Fig. 4.34) a presença de pelo menos uma cópia do gene no genoma desse parasita. A digestão com *BamHI* também foi realizada apresentando o mesmo padrão (dado não mostrado), sugerindo

que é um gene de cópia única.

1 2

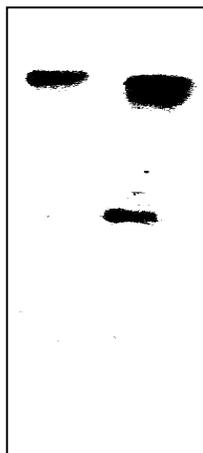


Figura 4.34. Southern Blot de DNA genômico de *T. cruzi* CL-Brener, utilizando sonda radioativa baseada no gene AspB de *Trypanosoma cruzi* CL-Brener. Poço 1: DNA genômico de *T. cruzi* CL-Brener não digerido; Poço 2: DNA genômico de CL-Brener digerido com *EcoRI*.

5. DISCUSSÃO

Uma vez que os aminoácidos participam em uma variedade de rotas metabólicas, que dão origem à diversos compostos essenciais para a sobrevivência dos parasitas nas diversas fases do crescimento, os transportadores e enzimas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos podem ser eficazes alvos para o desenho de fármacos.

A compreensão do transporte de aminoácidos pode ser baseado em parâmetros cinéticos. A análise dos mecanismos de transporte é feita principalmente por ensaios de competição com o substrato e por análise do efeito de íons e ATP na atividade do transportador (Kandpal M e col 1996).

No presente trabalho nosso grupo descreveu os mecanismos de transporte de glutamato em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Esse sistema é saturável e utiliza a força próton motriz gerado pelo gradiente de H^+ na membrana celular, sugerindo que ocorra um co-transporte de glutamato e prótons, assim como encontrado por Vieira LL e Cabantchik ZI (1995) em promastigotas de *Leishmania major*. Para demonstrar a dependência de H^+ no transporte de L-glutamato, a incorporação desse aminoácido radioativamente marcado foi realizada em diferentes pH, demonstrando a atividade do transportador varia de acordo com o pH do meio extracelular e apresenta atividade ótima de incorporação de L-glutamato entre os pH 5.5 e 6.5. No sistema de transporte de glutamato de *T. cruzi* o pH é 5.0, estando próximo ao valor encontrado no sistema em *Leishmania amazonensis* (Silber AM e col 2006). Essa semelhança pode estar relacionada a fase de vida em que a atividade do transportador é mais necessária, podendo ser na forma amastigota no hospedeiro vertebrado, uma vez que o parasita sobrevive em ambientes com pH ácido.

A incorporação de L-glutamato em *L. amazonensis* é dependente do íon K^+ , pois na presença da valinomicina, o transporte de L-glutamato foi inibido em mais do que 50%. Além disso, em ensaios de substituição de íons, houve um aumento na incorporação de L-glutamato em PBS modificado contendo apenas o íon K^+ . Essa dependência não ocorre no sistema de transporte de L-glutamato em *T. cruzi* (Silber AM e col 2006), sendo uma diferença no mecanismo de transporte de glutamato entre esses organismos que pode ser posteriormente explorada, podendo estar relacionada com as pressões seletivas que um ou outro organismo sofre, levando ao estabelecimento de características diferenciais para um sistema que utiliza o mesmo substrato.

Além disso, mostramos que o transporte de L-glutamato em *L. amazonensis* não é dependente de ATP, assim como mostrado em *T. cruzi* (Silber AM e col 2006). Os parâmetros cinéticos estudados demonstram que o transporte de L-glutamato em *L. amazonensis* é saturável, e apresentando um platô após 15 minutos de incubação com aminoácido marcado. O sistema apresenta $V_{\text{máx}}$ de 123 ± 0.003 pmoles \times min^{-1} por 20×10^6 células e K_M de 0.59 ± 0.04 mM. A K_M está na mesma ordem de grandeza da descrita para os sistemas combinados A e B de transporte de prolina em promastigotas de *Leishmania donovani* (0.65mM) (Mazareb e col S 1999) e o sistema de transporte de L-glutamato de *Trypanosoma cruzi* (0.3mM) (Silber AM e col 2006). A $V_{\text{máx}}$ encontrada por nosso grupo similar ao valor encontrado no sistema de transporte de L-glutamato de *T. cruzi* ($V_{\text{máx}} = 98.34$ pmoles min^{-1} por 20×10^6 células) (Silber AM e col 2006). Porém a energia de ativação calculada para o transportador de *L. amazonensis* evidencia que é um diferente do sistema encontrado em *T. cruzi*, porém com algumas características conservadas como a dependência de um gradiente de prótons, e parâmetros cinéticos como $V_{\text{máx}}$ e K_M .

Outro parâmetro cinético demonstrado foi a dependência de temperatura para a atividade do transportador de L-glutamato em *L. amazonensis*, como encontrado em diversos outros sistemas (Mazareb e col S 1999, Kandpal M e col 1995, Silber AM e col 2002, Canepa GE e col 2004). A atividade é basal a 15° C e aumenta em torno de 2,5 vezes, a 30° C, ponto em que atinge a atividade máxima. Em contrapartida, o transporte em *T. cruzi* apresenta uma temperatura ótima a 40° C (Silber AM e col 2006).

Para averiguar a proporção de L-glutamato que é direcionada pelo parasita para a síntese protéica o nosso grupo analisou a quantidade de L-glutamato radioativo em frações protéicas. Foi demonstrado que 39% do aminoácido é utilizado para síntese protéica, evidenciando o fato que esse aminoácido não é importante apenas para a síntese de proteínas, pois os 61% dos aminoácidos permanecem na fração solúvel e podem desempenhar outras funções celulares importantes, como síntese de poliaminas e osmorregulação. Porém experimentos posteriores devem ser feitos para o entendimento da utilização do glutamato nesses parasitas. A quantidade de L-glutamato que é incorporada em proteínas é exatamente igual a encontrada em *Trypanosoma cruzi* (Silber AM e col). Em *T. cruzi* já existem evidências de que o L-glutamato, junto com aspartato e glicose são essências para a diferenciação celular (Contreras VT e col 1985). É possível que o L-glutamato seja importante na diferenciação em *Leishmania* sp., porém nenhum estudo comprovou esse papel até o

momento.

De forma geral, as características bioquímicas do transportador de glutamato descritas sugerem que ele seja pertencente à família de aminoácidos/auxinas permeases (AAP), da qual fazem parte os transportadores que se utilizam do potencial eletroquímico para seu funcionamento (Bouvier LA e col 2004). A presença de mais de 60 diferentes genes que codificam para essa família foi encontrada em *T. cruzi* através de estratégias de bioinformática (Bouvier LA e col 2004), mostrando que há possibilidade de redundância de transportadores, que por fim garantiriam o suprimento de aminoácidos para a célula.

O controle do transporte de nutrientes e íons para dentro e fora das células é importante para a manutenção da homeostase intracelular e para garantir os requerimentos metabólicos e fisiológicos para a adaptação do parasita ao ambiente do seu vetor e hospedeiro (Zilberstein D 1993).

Até o presente momento a evidência de que *Leishmania* sp. é capaz de metabolizar o L-glutamato (Blum JJ 1996) e o fato de *L. amazonensis* eficientemente incorporar L-glutamato é um indicativo da relevância desse aminoácido no metabolismo desses parasitas, tanto para síntese protéica como para outros mecanismos celulares.

A elucidação do mecanismo de transporte de L-glutamato nas formas amastigotas de *L. amazonensis* seria de grande importância para o entendimento da necessidade de L-glutamato e seu papel nessas formas. Uma vez que se mostre que apresenta papel vital o posterior entendimento da estrutura molecular do transportador abriria novas perspectivas de desenvolvimento de fármacos específicos para a forma presente no hospedeiro mamífero.

No contexto de metabolismo de aminoácidos iniciamos uma busca por genes que pudessem ser caracterizados em *Trypanosoma cruzi* que pudessem ser interessantes alvos quimioterápicos. Nosso grupo fez uma busca em bancos de dados contendo as informações do genoma recém terminado das três espécies causadoras de doenças em humanos, *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania major* (El Sayed MM e col 2005). Após a análise dos dados encontrados dentro do contexto do metabolismo de tripanossomatídeos selecionamos genes que codificam para enzimas chaves do metabolismo de asparagina para serem caracterizados. O metabolismo de asparagina está relacionado com o metabolismo de glutamato e aspartato. O glutamato e o aspartato são aminoácidos essenciais para a diferenciação *in vitro* de formas epimastigotas para formas tripomastigotas metacíclicas em *T. cruzi* (Contreras VT e col

1985).

Asparagina sintetase, já foi isolada de organismos eucariotos e procariotos, e cataliza a reação de conversão dependente de ATP, do aspartato a asparagina, utilizando a glutamina como fonte de nitrogênio (Campbell HA e Mashburn LT 1969). A asparagina sintetase encontrada em bactérias já tem sua estrutura cristalizada, o que permitiu diversos estudos na busca de um inibidor efetivo (Tesson AR e col 2003). Porém no metabolismo de parasitas pouco se sabe sobre o papel dessa enzima e sua estrutura molecular.

Para o início da caracterização desse gene em *T. cruzi*, ferramentas de bioinformática disponíveis *on-line* foram utilizadas. As proteínas selecionadas apresentam domínios catalíticos característicos da família de asparagina sintetases a que pertencem e isso é um indicativo da função dos genes dentro do metabolismo de aminoácido de *T. cruzi*.

Inicialmente uma comparação foi feita entre os genes encontrados em tripanossomatídeos, e foi observado que o gene da asparagina sintetase está presente em espécies de *Leishmania*, em *Trypanosoma brucei* e em *T. brucei congolensis*. A seqüência de aminoácidos das proteínas que são codificadas por esses genes são conservadas entre as espécies de tripanossomatídeos estudadas, evidenciando que poderiam ter uma estrutura conservada e desenvolver papéis semelhantes. Pode-se observar que a AS de *T. cruzi* apresenta maior similaridade com a AS de *T. brucei*.

A capacidade de sintetizar asparagina pode ter sido selecionada ao longo da evolução dos organismos como uma etapa metabólica essencial. Até o momento não existem evidências de que os parasitas sejam capazes de obter asparagina do meio, e se essa obtenção é maior ou menor do que a quantidade sintetizada pelo próprio parasita. Em células BALB3t3 de mamíferos, o nível basal de RNAm de AS aumenta quando as células são cultivadas em meio privado de asparagina, porém não se sabe qual o mecanismo envolvido no controle da expressão da proteína em diferentes condições ambientais (Min B e col 2001). Esse é um aspecto importante de regulação de expressão gênica que ainda é pouco conhecido (Chiyo T e col 1995).

Seria interessante avaliar futuramente se o crescimento de *T. cruzi in vitro* é afetado pela retirada de asparagina do meio, ou se ele é capaz de compensar a ausência do aminoácido através do aumento da expressão ou atividade da asparagina sintetase.

Uma comparação entre os genes de AS de outros organismos demonstrou uma semelhança maior com as proteínas de procariotos, de *E. coli* e de *Y. pestis* (em torno

de 70% de similaridade) do que com proteínas de eucariotos como *S. cerevisiae*. Interessantemente a asparagina sintetase de *Trypanosoma cruzi* é bastante diferente da encontrada em humanos (21% de similaridade). Pelo fato da maioria das drogas e medicamentos do combate à Doença de Chagas serem tóxicas por apresentarem pouca seletividade, a divergência entre esse genes pode ser explorada como uma estratégia promissora.

Apenas quatro vias são universalmente conservadas em um grupo de 12 eucariotos estudados recentemente: a que produz asparagina, glutamina, glicina e prolina (Payne SH e Loomis WF 2006). A habilidade de sintetizar asparagina e prolina é universalmente conservada, porém, a análise das enzimas dessas rotas sugerem que os mecanismos de síntese não o são (Payne SH e Loomis WF 2006). Esse é um aspecto interessante a ser estudado do ponto de vista evolutivo.

No presente trabalho, clonamos o gene de AS *T. cruzi* em um vetor de expressão em bactéria para gerar a proteína recombinante e avaliar em trabalhos futuros o nível de expressão dessa proteína no modelo de estudo. Esses dados seriam de importante contribuição para o entendimento do metabolismo intermediário do parasita. A elucidação da atividade enzimática da asparagina sintetase também deve ser estudada em experimentos futuros pelo nosso grupo.

A hipótese de que a asparagina é utilizada como fonte de carbono e energia nos parasitas também pode ser avaliada, determinando assim a importância da asparagina na formação de outras moléculas e no metabolismo energético de *T. cruzi*.

A L-asparaginase, enzima que hidroliza a asparagina formando asparatato e amônio está presente em diversos organismos desde bactérias, fungos, plantas até mamíferos (Wriston e Yellin 1973). Essa enzima tem sido usada como tratamento para casos de Leucemia, pois depleta a quantidade de asparagina no sangue e medula óssea. As células não cancerígenas são capazes de manter a sobrevivência e a taxa de síntese protéica e multiplicação, pela atividade compensatória da asparagina sintetase. Em contrapartida as células cancerígenas apresentam baixa atividade da AS, de forma a morrerem por falta de asparagina (Bussolati O e col 1995). Esse mecanismo de morte tem sido estudado e se sabe que as células páram na fase G1 do ciclo celular e morrem por apoptose (Ando M e col 2005).

Baseado no GeneDB, foram encontrados 5 genes que codificam para putativas L-asparaginases no genoma de *T. cruzi*. Esses 5 genes foram analisados e a partir dessas análises um foi selecionado para caracterização gênica e funcional. Esse gene, por motivos didáticos foi denominado por nosso grupo de AspB. AspB apresenta um

peptídeo sinal, indicando que pode ser direcionado para organelas da via secretória. O gene apresenta também motivos de N-glicosilação e N-miristilação, que sugerem que a proteína passe por processos de modificações pós-traducionais. É interessante notar que foram encontrados duas regiões na proteína L-AspB que possivelmente são regiões transmembranares. A primeira está localizada na região N-terminal da proteína e possivelmente corresponde ao peptídeo sinal que será clivado, porém a outra está localizada em torno do aminoácido 100. A segunda região transmembranar encontrada pode ser um indicativo de que essa proteína seja ancorada na membrana plasmática.

Genes que codificam para L-Asp estão presentes nas diferentes espécies de tripanossomatídeos. E em cada espécie foi observada a presença de pelo menos dois genes, que foram denominados de AspA e AspB, por motivos didáticos. Em *T. cruzi* além de AspA e AspB, foram encontrados mais 3 genes, que foram denominados de AspC, PhA e PhB. Um alinhamento das AspA e AspB de *Leishmania major* e *Leishmania brasiliensis* e AspB e AspC de *T. cruzi* foi realizado demonstrando que há uma divisão de L-asparaginases em dois possíveis grupos, como encontrado em outros organismos, como *E. coli* (Arima e col 1972) e *S. cerevisiae* (Kim KW e col 1988). Interessantemente, é possível observar no alinhamento que há uma divisão entre esses dois grupos, no primeiro estando incluindo todas as AspB de *Leishmania* e a T.c.AspB, e no segundo todas as AspA e T.c.AspC (Fig 4.11). Essas duas classes de L-Asparaginases poderiam apresentar diferenças estruturais e funcionais importantes dentro do contexto do metabolismo de tripanosomatídeos.

Outro fato interessante é que a L-asparaginase não está presente no genoma de *Trypanosoma brucei*, que poderia indicar que essa rota de quebra de asparagina não existe nesse organismo, podendo ter sido ausente desde o surgimento da espécie, ou ter sido perdida ao longo da evolução. Uma vez que parasitas da mesma família apresentam diferentes isoformas da enzima e *T. brucei* não, pode ser possível que tenha ocorrido uma perda da rota metabólica. A perda de uma rota pode ser devido a um acúmulo de mutações deletérias, a perda da funcionalidade de uma enzima ou a deleção do gene do genoma (Payne SH e Loomis WF 2006). Isso indica que a etapa de quebra de asparagina pode ter relação com a disponibilidade de asparagina ou aspartato no ambiente em que o parasitas vive. O fato de *T. brucei* não invadir células pode ser um indicativo de que esses parasitas apresentam uma maior disponibilidade de aspartato livre na corrente sanguínea, e dessa forma diminuiria a necessidade de obter aspartato a partir da quebra de asparagina. Uma outra explicação poderia ser uma maior necessidade de asparagina livre por parte de *T. brucei* que justificaria a

ausência de uma enzima capaz de depletar esse aminoácido. Isso se justificaria se houvesse uma maior necessidade de asparagina por parte de *T. brucei* para processos como replicação celular. Esses aspectos precisam ser experimentalmente caracterizados. Uma análise das seqüências do genoma de *T. cruzi*, *L. major* e *T. brucei* aponta diversos genes que estão presentes de forma diferencial nas espécies (El Sayed e col 2005).

Quando comparadas às L-asparaginases de outros organismos a L-AspB se apresenta filogeneticamente distante de L-asparaginases de outros organismos. A L-AspC está mais próxima filogeneticamente da L-AspI de *E. coli* e da L-Asp presente em *Homo sapiens*, indicando que essa não seria um bom candidato a desenho de fármacos. Essa diferença entre essas duas L-Asparaginases de *T. cruzi* sugerem mais uma vez a existência de dois grupos de enzimas nesse organismo.

Para uma análise inicial decidimos clonar a L-asparaginase e analisar a sua representatividade no genoma. Através de um Southern Blotting de epimastigotas da cepa CL-Brener observamos que T.c.AspB é possivelmente um gene de cópia única no genoma, condição essencial para a geração de mutantes nulos e comprovação do papel da enzima na vida parasitária (Taylor MC e Kelly JM 2006). Em colaboração com grupo do Dr. Martin Taylor (London School of Hygiene and Tropical Medicine, Londres, UK) pretendemos gerar parasitas transgênicos no sistema tetraciclina induzível para estudar o papel desse gene no metabolismo de *T. cruzi*.

O gene L-AspB foi clonado em vetor de expressão em bactéria, para posterior purificação e imunização de camundongos para obtenção de anticorpos policlonais monoespecíficos, porém ao se induzir a expressão não observamos a banda correspondente a proteína esperada. Após uma análise observamos a presença de numerosos códons raros após sequenciamento do clone pET28AspB (Anexo). Essa é a possível causa da não expressão da proteína de interesse. Seria necessário utilizar linhagens bacterianas modificadas que sejam capazes de expressar os tRNA raros correspondentes. Essa será nossa próxima estratégia para expressão da proteína recombinante a utilização dessa proteína para o estudo da expressão da L-Asparaginase nas diferentes fase de vida de *T. cruzi*.

A geração de transgênicos estáveis permitirá observar alterações fenotípicas em parasitas que sobreexpressam a L-Asp. Além disso permitirá a realização de ensaios que comprovem a função do gene no metabolismo intermediário de *Trypanosoma cruzi*.

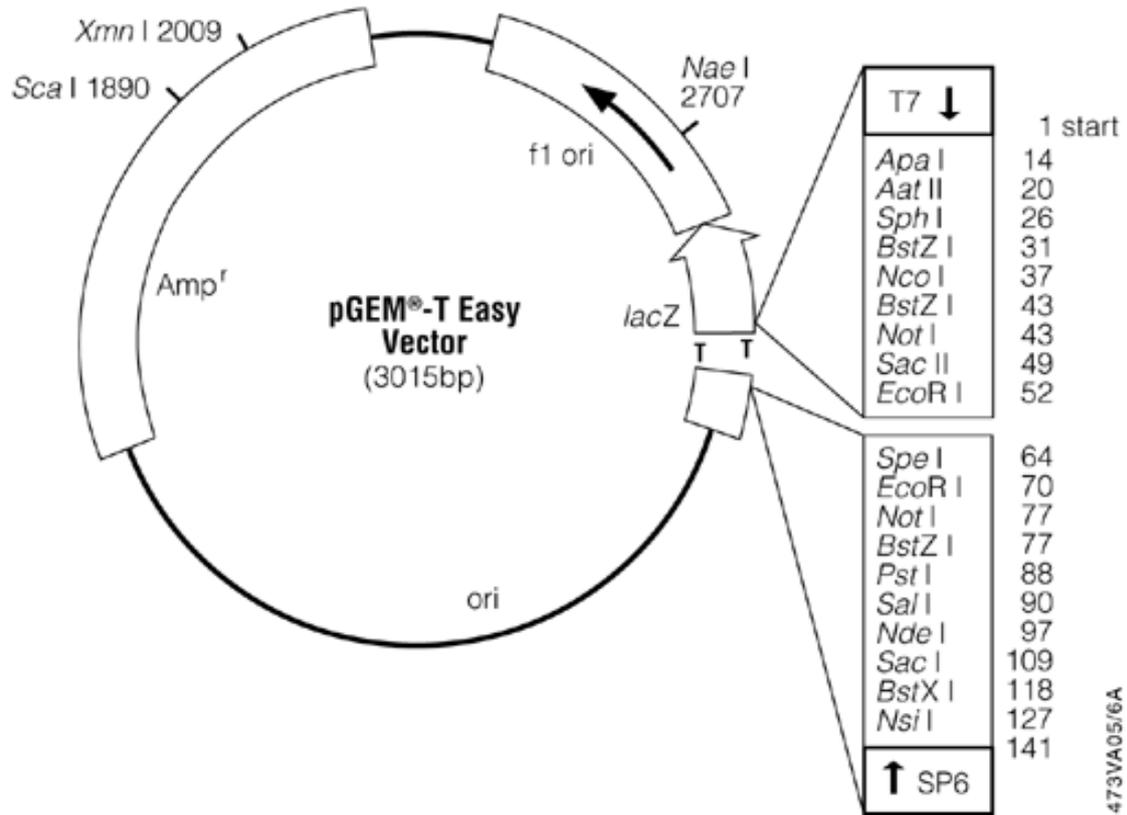
Elucidar o papel dessa enzima no metabolismo de parasitas também pode ser

de importância para o entendimento de etapas básicas do metabolismo de eucariotos inferiores. Outra possibilidade é usar a enzima L-asparaginase de *Trypanosoma cruzi* como alvo de drogas, uma vez que no presente trabalho se evidenciou que a L-AspB é bastante divergente da asparaginase do hospedeiro vertebrado humano (4% de similaridade). A caracterização da estrutura molecular dessa enzima de *T. cruzi* pode ser realizada através de cristalografia e dessa forma abrir novos campos de desenho racional de inibidores catalíticos. Para isso, acreditamos que a escolha de enzimas envolvidas no metabolismo de asparagina em *T. cruzi*, e a caracterização de sua função no contexto metabólico seja o primeiro passo para estudos de desenho de fármacos baseados nessas enzimas.

6. ANEXOS

6.1 - Mapas dos plasmídeos

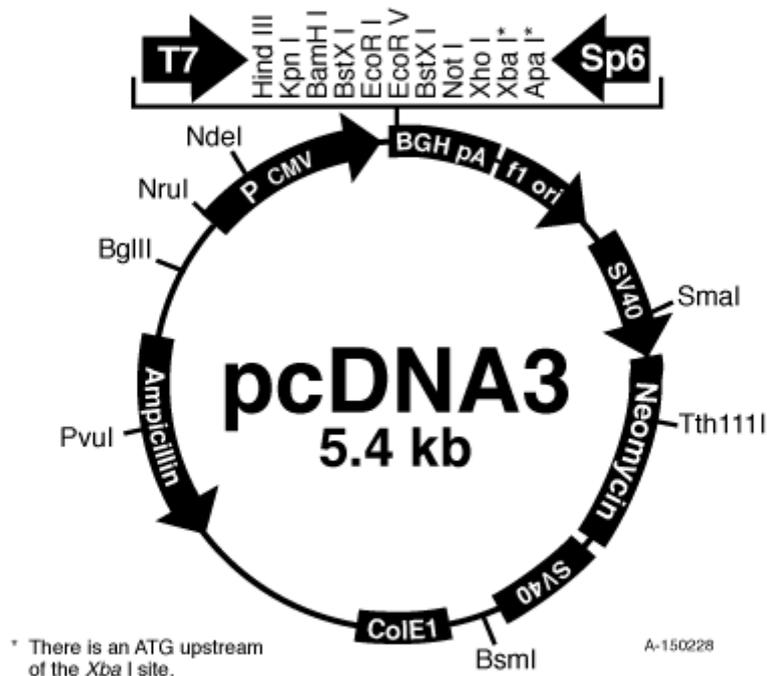
6.1.1. pGEMT-easy



6.1.2. pcDNA3

Comments for pcDNA3:
5446 nucleotides

CMV promoter: bases 209-863
T7 promoter: bases 864-882
Polylinker: bases 889-994
Sp6 promoter: bases 999-1016
BGH poly A: bases 1018-1249
SV40 promoter: bases 1790-2115
SV40 origin of replication: bases 1984-2069
Neomycin ORF: bases 2151-2945
SV40 poly A: bases 3000-3372
ColE1 origin: bases 3632-4305
Ampicillin ORF: bases 4450-5310



The sequence of pcDNA3 has been compiled from information in sequence databases, published sequences, and other sources. This vector has not yet been completely sequenced. If you suspect an error in the sequence, please contact Invitrogen's Technical Services Department at 800-955-6288.

U.S. Headquarters

Tel: 1-800-955-6288
Fax: 1-760-603-7201

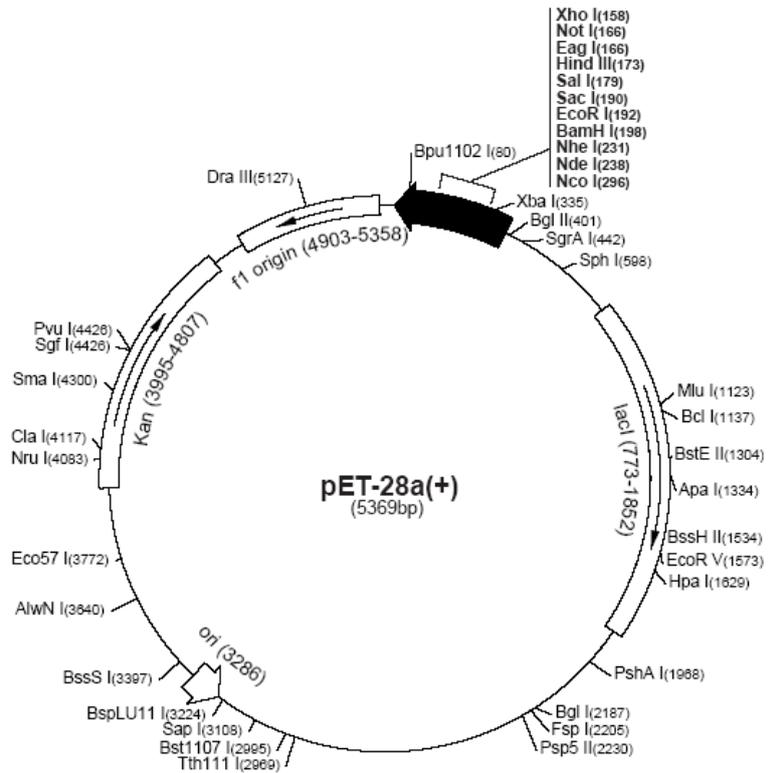
European Headquarters

Tel: +31 (0) 594 515 175
Fax: +31 (0) 594 515 312

6.1.3. pET28a(+)

pET-28a(+) sequence landmarks	
T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His•Tag coding sequence	270-287
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (<i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lac</i> I coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

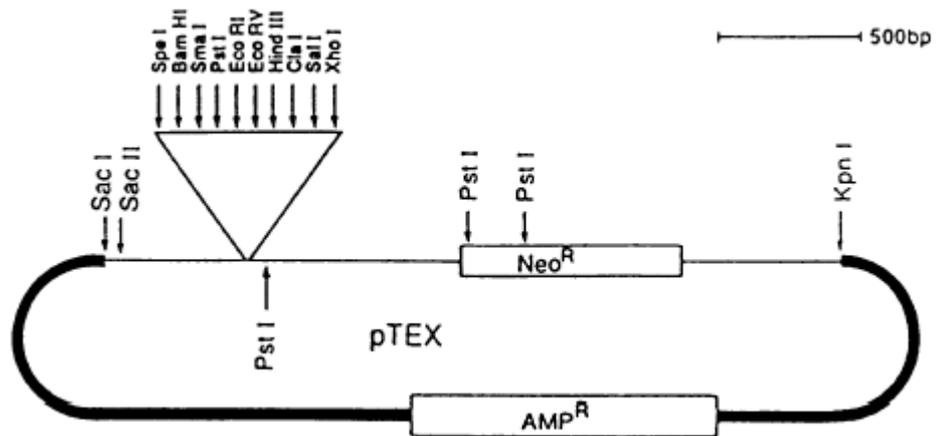
The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198.



pET upstream primer #89214-3 → *Bgl*II → T7 promoter primer #89348-3 → T7 promoter → lac operator → *Xba*I → rbs
 AGATCTCGATCCCGGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAATGTGAGCGGATAACAATTCCTCTAGAAATAATTTTGTTAACTTAAGAAGSAGA
 Nco I His•Tag Nde I Nhe I T7•Tag
 TATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCAGCAGCGGCCGGTGGCGCGCGCCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA
 MetGlySerSerHisHisHisHisHisHisHisSerSerGlyLeuValProArgGlySerHisMetAlaSerMetThrGlyGlyGlnGln
 thrombin
 BamH I EcoR I Sac I Sal I Hind III Not I Xho I His•Tag
 ATGGGTCGGGATCGAATTCGAGCTCCGTCGAAAGCTTGGCGCGCACTCGAGCACCCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGGCC pET-28a(+)
 MetGlyArgGlySerGluPheGluLeuArgArgGlnAlaCysGlyArgThrArgAlaProProProProLeuArgSerGlyCysEnd
 His•Tag
 ...GGTCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGGCGCGCACTCGAGCACCCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGGCC pET-28b(+)
 ...GlyArgAspProAsnSerSerSerValAspLysLeuAlaAlaAlaLeuGluHisHisHisHisHisHisEnd
 ...GGTCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGGCGCGCACTCGAGCACCCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGGCC pET-28c(+)
 ...GlyArgIleArgIleArgAlaProSerThrSerLeuArgProHisSerSerThrThrThrThrThrThrGluIleArgLeuLeuThrLysPro...
 Spu1102 I T7 terminator
 GAAAGGAAGCTGAGTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAAC TAGCAATAACCCCTTGGGGCCCTAAACGGGCTTGAGGGGTTTTTTG
 T7 terminator primer #89337-3 →

pET-28a-c(+) cloning/expression region

6.1.4. pTEX



6.2. Presença de códons raros na sequência de pET28AspB

AspI

GAT **AGG** GTT **AGG** CTT TGG GAC TCT TTT TTT TTC TTT TTG TCT GAG TGC ACC TTG CCG TTT TTC TCC CTC CCT TTC TCT CTC TCT GTT GTT GTC **CGA** GAG TAC
ACG **CGG** TGG GAA ATG GAA ACC TTG CCG **ACG** CCG GCG GCA AAT **GGA** GAG GCC GTG GTG TCC **CGG** AAC CCT ATT TTA TTT GTT TCC TAC AAT GAG AGC GGT
GTT **AGG** CGT TAT **ACG** GAC GAT CTC TTC CCG CGT AAG GAT **CGA** CGT GTG CTC GTC CTT TAT GTT GGC GGT ACT ATT GGT ATG GCG TGG **ACG** GCA AAT GGT
GTG CTT GAG CCG TGC **AGG** **GGA** TAC TTG **ACG** CAG GTG GTG **CGG** **GGG** ATG **GGG** GAG CTG CAG CAA **CGG** CCG GAA ATT GCC CCG TTT GAC ATT GTG GAG TAC
GAC GAA CTG CTT GAC AGT AGC GAC ATG GAT GGT CGT GAC TAC ATG CGT ATT GCC ATG GAT GTG GCC CGT AAT TAC GAT GCG TAT GAC GGC TTC TTG ATT
TTG CAC **GGG** **ACG** GAC **ACG** ATG CAC TAC ACT GCC AGT GCA CTG AGT TTC TTG **CUA** ATG AAT CTT GCC AAA **GGG** GTC CTG TTG ACA GGC TCC ATG GTG CCG
CTG GTT GAG CCG TAT AAT GAT GCC **CGG** CGC AAT ATT GTG ATC AGC CTC ATG CTG GCC TCA AAT **GGG** AGC ATC **CGG** GAG GTG TGT GTC TTC TTC AAC GAC
TGT CTG CTG CGT **GGA** AAC TGC TGC TGC AAG CTG CAC CAT ACA TTT **AGG** GCC TTC TGC AGC CCA AAT TAC **GGG** GTA CTG **GGA** **ATG** GTG GAG TCG **ACG** GGC
TTT CAC CTT CGC GAG CAA CTG CTG CTG CCG CAA CCG AGT GAC CAC TGA **AGG** TGC AGT CCA ACA TGC GAG GCC GCG TGG TGT GTT TGC GCT CCA CGC CCA
TTG TGA TCG AAG TGA TGA GTA CTG CTT TGA AAG ACA AGC CGC AA

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida-de-Faria M, Freymuller E, Colli W, Alves MJ. *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. *Exp Parasitol*. 1999 Aug;92(4):263-74.
- Alonso GD, Pereira CA, Remedi MS, Paveto MC, Cochella L, Ivaldi MS, Gerez de Burgos NM, Torres HN, Flawia MM. Arginine quinase of the flagellate protozoa *Trypanosoma cruzi*. Regulation of its expression and catalytic activity. *FEBS Lett*. 2001 Jun 1;498(1):22-5.
- Ando M, Sugimoto K, Kitoh T, Sasaki M, Mukai K, Ando J, Egashira M, Schuster SM, Oshimi K. Selective apoptosis of natural killer-cell tumours by L-asparaginase. *Br J Haematol*. 2005 Sep;130(6):860-8.
- Asselin BL, Ryan D, Frantz CN, Bernal SD, Leavitt P, Sallan SE, Cohen HJ. In vitro and in vivo killing of acute lymphoblastic leukemia cells by L-asparaginase. *Cancer Res*. 1989 Aug 1;49(15):4363-8.
- Barrett MP, Tetaud E, Seyfang A, Bringaud F, Baltz T. Trypanosome glucose transporters. *Mol Biochem Parasitol*. 1998 Mar 1;91(1):195-205. Review.
- Benz R, McLaughlin S. The molecular mechanism of action of the proton ionophore FCCP (carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone). *Biophys J*. 1983 Mar;41(3):381-98.
- Bera T. The gamma-guanidinobutyramide pathway of L-arginine catabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 1987 Apr;23(3):183-92.
- Bloch KE. Sterol structure and membrane function. *CRC Crit Rev Biochem*. 1983;14(1):47-92. Review.
- Blum JJ. Arginine catabolism by *Leishmania donovani* promastigotes. *J Protozool*. 1992 Sep-Oct;39(5):613-8.
- Blum JJ. Oxidation of alanine, acetate, glutamate, and succinate by digitonin-permeabilized *Leishmania major* promastigotes. *J Eukaryot Microbiol*. 1996 Mar-Apr;43(2):144-50.
- Bouvier LA, Silber AM, Galvao Lopes C, Canepa GE, Miranda MR, Tonelli RR, Colli W, Alves MJ, Pereira CA. Post genomic analysis of permeases from the amino acid/auxin

family in protozoan parasites. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Aug 27;321(3):547-56

Bringaud F, Stripecke R, Frech GC, Freedland S, Turck C, Byrne EM, Simpson L. Mitochondrial glutamate dehydrogenase from *Leishmania tarentolae* is a guide RNA-binding protein. *Mol Cell Biol.* 1997 Jul;17(7):3915-23.

Brusell E. "An Introduction to Insect Physiology". 1970. pp 31-4. Academic Press, London.

Burrows C, Blum JJ. Effect of hyper-osmotic stress on alanine content of *Leishmania major* promastigotes. *J Protozool.* 1991 Jan-Feb;38(1):47-52.

Buscaglia CA, Di Noia JM. (2003) *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect.* 5(5):419-427.

Bussolati O, Belletti S, Uggeri J, Gatti R, Orlandini G, Dall'Asta V, Gazzola GC. Characterization of apoptotic phenomena induced by treatment with L-asparaginase in NIH3T3 cells. *Exp Cell Res.* 1995 Oct;220(2):283-91.

Campbell HA, Mashburn LT. L-Asparaginase EC-2 from *Escherichia coli*. Some substrate specificity characteristics. *Biochemistry.* 1969 Sep;8(9):3768-75.

Cancado JR. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2002 Jan-Feb;44(1):29-37.

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 Jun 1;247(1):65-71.

Capizzi RL. Asparaginase revisited. *Leuk Lymphoma.* 1993;10 Suppl:147-50. Review.

Cazzulo JJ, Juan SM, Segura EL. Glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol B.* 1977;56(3):301-3.

Cazzulo JJ. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *FASEB J.* 1992 Oct;6(13):3153-61. Review.

Cazzulo JJ. Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J Bioenerg Biomembr.* 1994

Apr;26(2):157-65. Review.

Cestari IS, Haver NJ, Barbosa-Silva A, Ramirez MI. PROTOGIM: a novel tool to search motifs and domains in hypothetical proteins of protozoan genomes. *Parasitol Res.* 2006 Mar;98(4):375-7.

Chamond N, Gregoire C, Coatnoan N, Rougeot C, Freitas-Junior LH, da Silveira JF, Degraeve WM, Minoprio P. Biochemical characterization of proline racemases from the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and definition of putative protein signatures. *J Biol Chem.* 2003 May 2;278(18):15484-94.

Christensen HN. Organic ion transport during seven decades. The amino acids. *Biochim Biophys Acta.* 1984 Sep 3;779(3):255-69. Review.

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

Coons T, Hanson S, Bitonti AJ, McCann PP, Ullman B. Alpha-difluoromethylornithine resistance in *Leishmania donovani* is associated with increased ornithine decarboxylase activity. *Mol Biochem Parasitol.* 1990 Feb;39(1):77-89.

Costa J, Saldanha AC, Costa AAU, Barral, A. Difuse cutaneous leishmaniasis in Brasil (DCL) 60 years after description. *Proc Third World Congress in Leishmaniasis, Palermo-Terrasini 10-15 April 2005, p.70.*

Cunningham I, Slater JS. Amino acid analyses of haemolymph of *Glossina morsitans morsitans* (Westwood). *Acta Trop.* 1974;31(1):83-8.

da Silva ER, Castilho TM, Pioker FC, Tomich de Paula Silva CH, Floeter-Winter LM. Genomic organisation and transcription characterisation of the gene encoding *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase and its protein structure prediction. *Int J Parasitol.* 2002 Jun;32(6):727-37.

Darling TN, Burrows CM, Blum JJ. Rapid shape change and release of ninhydrin-positive substances by *Leishmania major* promastigotes in response to hypo-osmotic stress. *J Protozool.* 1990 Nov-Dec;37(6):493-9.

Desjeux P. Leishmaniasis. Nat Rev Microbiol. 2004 Sep;2(9):692.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2004 Sep;27(5):305-18.

Dusanic DG (1992) in: Parasitic Protozoa, vol I (Kreier JP e Baker JR Eds), pp. 137-194, Academic Press, London.

El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, Caler E, Renauld H, Worthey EA, Hertz-Fowler C, Ghedin E, Peacock C, Bartholomeu DC, Haas BJ, Tran AN, Wortman JR, Alsmark UC, Angiuoli S, Anupama A, Badger J, Bringaud F, Cadag E, Carlton JM, Cerqueira GC, Creasy T, Delcher AL, Djikeng A, Embley TM, Hauser C, Ivens AC, Kummerfeld SK, Pereira-Leal JB, Nilsson D, Peterson J, Salzberg SL, Shallom J, Silva JC, Sundaram J, Westenberger S, White O, Melville SE, Donelson JE, Andersson B, Stuart KD, Hall N. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. Science. 2005 Jul 15;309(5733):404-9.

Fernandes O, Sturm NR, Derre R, Campbell DA. (1998) The mini-exon gene: a genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 95(1):129-133.

Forsberg H, Ljungdahl PO. Sensors of extracellular nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet. 2001 Sep;40(2):91-109. Review.

Friedrichson T, Kurzchalia TV. Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. Nature. 1998 Aug 20;394(6695):802-5.

Frydman B, de los Santos C, Cannata JJ, Cazzulo JJ. Carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of [1-13C]glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi*. Evidence of the presence of two alanine pools and of two CO₂ fixation reactions. Eur J Biochem. 1990 Sep 11;192(2):363-8.

Geraldo MV, Silber AM, Pereira CA, Uliana SR. Characterisation of a developmentally regulated amino acid transporter gene from *Leishmania amazonensis*. FEMS Microbiol Lett. 2005 Jan 15;242(2):275-80.

Ginger ML, Chance ML, Goad LJ. Elucidation of carbon sources used for the biosynthesis of fatty acids and sterols in the trypanosomatid *Leishmania mexicana*. Biochem J. 1999 Sep 1;342 (Pt 2):397-405.

Ginger ML, Prescott MC, Reynolds DG, Chance ML, Goad LJ. Utilization of leucine and acetate as carbon sources for sterol and fatty acid biosynthesis by Old and New World *Leishmania* species, *Endotrypanum monterogeii* and *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Biochem*. 2000 May;267(9):2555-66.

Girones N, Cuervo H, Fresno M. (2005) *Trypanosoma cruzi* - induced molecular mimicry and Chagas' disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 296:89-123.

Glaser TA, Baatz JE, Kreishman GP, Mukkada AJ. pH homeostasis in *Leishmania donovani* amastigotes and promastigotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Oct;85(20):7602-6.

Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *Int J Parasitol*. 2005 Oct;35(11-12):1169-80.

Hampton JR. Serine metabolism in the culture form of *Trypanosoma cruzi*: synthesis of other amino acids. *Comp Biochem Physiol B*. 1971 Aug 15;39(4):999-1003.

Hoffmann ME, Jang J, Moreno SN, Docampo R. Inhibition of protein synthesis and amino acid transport by crystal violet in *Trypanosoma cruzi*. *J Eukaryot Microbiol*. 1995 May-Jun;42(3):293-7.

Hyde R, Taylor PM, Hundal HS. Amino acid transporters: roles in amino acid sensing and signalling in animal cells. *Biochem J*. 2003 Jul 1;373(Pt 1):1-18. Review.

Jackson PS, Strange K. Single channel properties of a volume sensitive anion channel: lessons from noise analysis. *Kidney Int*. 1996 Jun;49(6):1695-9. Review.

Kanai Y, Endou H. Heterodimeric amino acid transporters: molecular biology and pathological and pharmacological relevance. *Curr Drug Metab*. 2001 Dec;2(4):339-54. Review.

Kandpal M, Fouce RB, Pal A, Guru PY, Tekwani BL. Kinetics and molecular characteristics of arginine transport by *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 1995 May;71(2):193-201.

Kandpal M, Tekwani BL, Chauhan PM, Bhaduri AP. Correlation between inhibition of

growth and arginine transport of *Leishmania donovani* promastigotes in vitro by diamidines. *Life Sci.* 1996;59(7):PL75-80.

Keating MJ, Holmes R, Lerner S, Ho DH. L-asparaginase and PEG asparaginase--past, present, and future. *Leuk Lymphoma.* 1993;10 Suppl:153-7. Review.

Kim KW, Kamerud JQ, Livingston DM, Roon RJ. Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. Characterization of the ASP3 gene. *J Biol Chem.* 1988 Aug 25;263(24):11948-53.

Kirk K, Kirk J. Volume-regulatory taurine release from a human lung cancer cell line. Evidence for amino acid transport via a volume-activated chloride channel. *FEBS Lett.* 1993 Dec 20;336(1):153-8.

Kollien AH, Schaub GA. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol Today.* 2000 Sep;16(9):381-7. Review.

Kropf P, Fuentes JM, Fahrnich E, Arpa L, Herath S, Weber V, Soler G, Celada A, Modolell M, Muller I. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *FASEB J.* 2005 Jun;19(8):1000-2. Epub 2005 Apr 5.

Law SS, Mukkada AJ. Transport of L-proline and its regulation in *Leishmania tropica* promastigotes. *J Protozool.* 1979 May;26(2):295-301.

Mazareb S, Fu ZY, Zilberstein D. Developmental regulation of proline transport in *Leishmania donovani*. *Exp Parasitol.* 1999 Apr;91(4):341-8.

McConville MJ, Mullin KA, Ilgoutz SC, Teasdale RD Secretory pathway of trypanosomatid parasites *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002 Mar;66(1):122-54

Medina-Acosta E, Cross GA. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. *Mol Biochem Parasitol.* 1993 Jun;59(2):327-9.

Min B, Pelaschier JT, Graham DE, Tumbula-Hansen D, Soll D. Transfer RNA-dependent amino acid biosynthesis: an essential route to asparagine formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Mar 5;99(5):2678-83.

Miranda MR, Canepa GE, Bouvier LA, Pereira CA. *Trypanosoma cruzi*: Oxidative stress induces arginine kinase expression. *Exp Parasitol.* 2006 Dec;114(4):341-344. Epub 2006

May 24.

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

Mukkada AJ, Schaefer FW 3rd, Simon MW, Neu C. Delayed in vitro utilization of glucose by *Leishmania tropica* promastigotes. *J Protozool.* 1974 May;21(2):393-7.

Nosei C, Avila JL. Serine hydroxymethyltransferase activity in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* and American *Leishmania* spp. *Comp Biochem Physiol B.* 1985;81(3):701-4.

Nozaki T, Shigeta Y, Saito-Nakano Y, Imada M, Kruger WD. Characterization of transsulfuration and cysteine biosynthetic pathways in the protozoan hemoflagellate, *Trypanosoma cruzi*. Isolation and molecular characterization of cystathionine beta-synthase and serine acetyltransferase from *Trypanosoma*. *J Biol Chem.* 2001 Mar 2;276(9):6516-23.

Nussenzweig V, Sonntag R, Biancalana A, De Freitas JL, Amato Neto V, Kloetzel J. [Effect of triphenylmethane dyes on *Trypanosoma cruzi* in vitro; use of gentian violet in prevention of transmission of Chagas disease by blood transfusion.] *Hospital (Rio J).* 1953 Dec;44(6):731-44.

Opperdoes FR, Borst P. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett.* 1977 Aug 15;80(2):360-4.

Oza SL, Tetaud E, Ariyanayagam MR, Warnon SS, Fairlamb AH. A single enzyme catalyses formation of Trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* 2002 Sep 27;277(39):35853-61. Epub 2002 Jul 16.

Paveto C, Guida MC, Esteva MI, Martino V, Coussio J, Flawia MM, Torres HN. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of green tea (*Camellia sinensis*) catechins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jan;48(1):69-74.

Payne SH, Loomis WF. Retention and loss of amino acid biosynthetic pathways based on analysis of whole-genome sequences. *Eukaryot Cell.* 2006 Feb;5(2):272-6.

Pegg AE. Regulation of ornithine decarboxylase. *J Biol Chem.* 2006 May 26;281(21):14529-32. Epub 2006 Feb 3. Review.

Peluffo G, Piacenza L, Irigoien F, Alvarez MN, Radi R. L-arginine metabolism during interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Trends Parasitol.* 2004 Aug;20(8):363-9. Review.

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 Nov 6;554(1-2):201-5.

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 Jan 14;275(2):1495-501.

Pinto Dias JC (2006) The treatment of Chagas disease (South American trypanosomiasis). *Ann Intern Med.* 16;144(10):724-734.

Pinto WJ, Nes WR. Stereochemical specificity for sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 1983 Apr 10;258(7):4472-6.

Piper RC, Xu X, Russell DG, Little BM, Landfear SM. Differential targeting of two glucose transporters from *Leishmania enriettii* is mediated by an NH₂-terminal domain. *J Cell Biol.* 1995 Feb;128(4):499-508.

Ramirez MI, Yamauchi LM, de Freitas LH Jr, Uemura H, Schenkman S. The use of the green fluorescent protein to monitor and improve transfection in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2000 Nov;111(1):235-40.

Reina-San-Martin B, Degraeve W, Rougeot C, Cosson A, Chamond N, Cordeiro-Da-Silva A, Arala-Chaves M, Coutinho A, Minoprio P. A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. *Nat Med.* 2000 Aug;6(8):890-7.

Reizer J, Finley K, Kakuda D, MacLeod CL, Reizer A, Saier MH Jr. Mammalian integral membrane receptors are homologous to facilitators and antiporters of yeast, fungi, and eubacteria. *Protein Sci.* 1993 Jan;2(1):20-30.

Reizer J, Reizer A, Saier MH Jr. A functional superfamily of sodium/solute symporters. *Biochim Biophys Acta* 1197 1994 133-166.

Richards NG, Kilberg MS. Asparagine synthetase chemotherapy. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:629-54.

Richards NG, Schuster SM. Mechanistic issues in asparagine synthetase catalysis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1998;72:145-98. Review.

Roberts SC, Tancer MJ, Polinsky MR, Gibson KM, Heby O, Ullman B. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. *J Biol Chem*. 2004 May 28;279(22):23668-78.

Sanchez Olea R, Pasantes-Morales H, Lazaro A, Cerejido M. Osmolarity-sensitive release of free amino acids from cultured kidney cells (MDCK). *J Membr Biol*. 1991 Apr;121(1):1-9.

Sant'Anna C, de Souza W, Cunha-e-Silva N. Biogenesis of the reservosomes of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc Microanal*. 2004 Oct;10(5):637-46.

Sarkar M, Hamilton CJ, Fairlamb AH. Properties of phosphoenolpyruvate mutase, the first enzyme in the aminoethylphosphonate biosynthetic pathway in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*. 2003 Jun 20;278(25):22703-8. Epub 2003 Apr 2.

Shaked-Mishan P, Suter-Grotemeyer M, Yoel-Almagor T, Holland N, Zilberstein D, Rentsch D. A novel high-affinity arginine transporter from the human parasitic protozoan *Leishmania donovani*. *Mol Microbiol*. 2006 Apr;60(1):30-8.

Silber AM, Colli W, Ulrich H, Alves MJ, Pereira CA. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 2005 Mar;5(1):53-64.

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

Slotboom DJ, Sobczak I, Konings WN, Lolkema JS. A conserved serine-rich stretch in the glutamate transporter family forms a substrate-sensitive reentrant loop. *Proc Natl Acad*

Sci U S A. 1999 Dec 7;96(25):14282-7.

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

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

Tabor CW, Tabor H. Polyamines. *Annu Rev Biochem*. 1984;53:749-90. Review.

Taylor MC, Kelly JM. pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*. *BMC Biotechnol*. 2006 Jul 6;6:32.

Ter Kuile BH e Opperdoes FR. Proline metabolism in *Leishmania donovani*. *Journal of Protozoology* 39, 972 – 6, 1992.

Tesson AR, Soper TS, Ciustea M, Richards NG. Revisiting the steady state kinetic mechanism of glutamine-dependent asparagine synthetase from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys*. 2003 May 1;413(1):23-31.

Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol*. 2001 May 1;31(5-6):472-81. Review.

Urbina JA. Intermediary metabolism of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today*. 1994 Mar;10(3):107-10.

Uzcategui NL, Figarella K, Camacho N, Ponte-Sucre A. Substrate preferences and glucose uptake in glibenclamide-resistant *Leishmania* parasites. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2005 Mar-Apr;140(3-4):395-402.

van Sluijters DA, Dubbelhuis PF, Blommaert EF, Meijer AJ. Amino-acid-dependent signal transduction. *Biochem J*. 2000 Nov 1;351 Pt 3:545-50. Review.

Varma R, Mayor S. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature*. 1998 Aug 20;394(6695):798-801.

Vaulont S, Vasseur-Cognet M, Kahn A. Glucose regulation of gene transcription. *J Biol Chem*. 2000 Oct 13;275(41):31555-8. Review.

Vernal J, Cazzulo JJ, Nowicki C. Isolation and partial characterization of a broad specificity aminotransferase from *Leishmania mexicana* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 1998 Oct 30;96(1-2):83-92.

Vieira LL, Cabantchik ZI. Amino acid uptake and intracellular accumulation in *Leishmania major* promastigotes are largely determined by an H(+)-pump generated membrane potential. *Mol Biochem Parasitol.* 1995 Dec;75(1):15-23.

Vieira LL, Lafuente E, Blum J, Cabantchik ZI. Modulation of the swelling-activated amino acid channel of *Leishmania major* promastigotes by protein kinases. *Mol Biochem Parasitol.* 1997 Dec 15;90(2):449-61.

Vieira LL, Lafuente E, Gamarro F, Cabantchik Z. An amino acid channel activated by hypotonically induced swelling of *Leishmania major* promastigotes. *Biochem J.* 1996 Nov 1;319 (Pt 3):691-7.

Vieira LL, Sloti I, Cabantchik. 1995. Chloride conductive pathway wich support electrogenic H⁺ pumping by *Leishmania major* promastigotes. *J. Biol. Chem* 270(10), 5209-5304.

World Health Organization/TDR. Report of the Scientific Working Group on Leishmaniasis, 2004. TDR/SWG/04. Geneva: WHO, 2004. Disponível em www.who.int/tdr/publications/publications/swg_leish.htm, acessado em Nov de 2006.

Wriston JC Jr, Yellin TO. L-asparaginase: a review. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1973;39:185-248.

Yoshida Y, Kiyosue T, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiol.* 1997 Oct;38(10):1095-102. Review.

Young GB, Jack DL, Smith DW, Saier MH Jr. The amino acid/auxin:proton symport permease family. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Jan 8;1415(2):306-22.

Zeledon R. Comparative physiological studies on four species of hemoflagellates in culture. II. Effect of carbohydrates and related substances and some amino compounds

on the respiration. *J Parasitol.* 1960 Oct;46:541-51.

Zilberstein D, Dwyer DM. Protonmotive force-driven active transport of D-glucose and L-proline in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Mar;82(6):1716-20.

Zilberstein D, Gepstein A. Regulation of L-proline transport in *Leishmania donovani* by extracellular pH. *Mol Biochem Parasitol.* 1993 Oct;61(2):197-205.

Zilberstein D, Philosoph H, Gepstein A. Maintenance of cytoplasmic pH and proton motive force in promastigotes of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol.* 1989 Sep;36(2):109-17.

Zingales, B, Souto, RP, Mangia, RH, et al. (1998) Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol.* 28: 105-12.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)