

CHRISTIANE MARIOTINI MOURA

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA, PURIFICAÇÃO E BUSCA DE INIBIDORES DA
NTPDase-1 DE *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada
à Universidade Federal de
Viçosa, como parte das
exigências do Programa de
Pós-Graduação em Biologia
Celular e Estrutural, para
obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

CHRISTIANE MARIOTINI MOURA

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA, PURIFICAÇÃO E BUSCA DE INIBIDORES DA
NTPDase-1 DE *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada
à Universidade Federal de
Viçosa, como parte das
exigências do Programa de
Pós-Graduação em Biologia
Celular e Estrutural, para
obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 26 de Julho de 2010.

Prof. Ricardo De Marco

Prof. Gustavo Costa Bressan

Prof. Humberto Josué de Oliveira Ramos

Prof. Leandro Licursi de Oliveira
(Coorientador)

Profa. Juliana Lopes Rangel Fietto
(Orientadora)

À minha família, em especial à minha avó Maria Delminda, pela dedicação de toda uma vida e pelo amor incondicional.

Saudades eternas.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima”

Louis Pasteur

iii

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder mais essa bênção.

À minha família, em especial à minha mãe, Fátima, pela amizade e por sempre acreditar em mim.

Aos meus sogros, Adriana e Josias, e às minhas cunhadas, Carolina e Cecília, por me adotarem como filha e irmã, e pelo apoio desde o início.

Ao meu marido, Raphael, por sempre estar ao meu lado, pelo seu amor, sua amizade e compreensão, e pelas madrugadas e fins de semana no laboratório.

A Universidade Federal de Viçosa e ao departamento de Biologia Geral pelo programa de Pós-Graduação.

A minha orientadora Juliana Lopes Rangel Fietto pelos ensinamentos, dedicação e paciência.

Ao professor Leandro Licursi de Oliveira pela boa vontade em nos atender sempre que precisamos.

A professora Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo, por nos receber em sua equipe.

A Ethel Fernandes de Oliveira Peternelli, pela paciência, atenção e carinho com que sempre lidou conosco.

Aos professores, pelo conhecimento transmitido.

À Capes pela bolsa concedida.

Aos amigos do LIMA, que compartilharam dessa jornada.

Ao Sr. Valdir pela boa convivência.

À Xênia e ao Felipe pela parceria na realização desse projeto.

À Monique e ao Tchatchá pela amizade sincera.

À todos que de alguma forma contribuíram para este momento.

Muito obrigada!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. Introdução.....	1
2. Revisão da Literatura.....	3
2.1. Doença de Chagas.....	3
2.2. Transmissão vetorial e ciclo de vida de <i>Trypanossoma cruzi</i>	4
2.3. As Ecto-NTPDases.....	8
2.4. Sinalização Purinérgica.....	11
3. Objetivos.....	13
3.1. Objetivo geral.....	13
3.2. Objetivos específicos.....	13
4. Materiais e Métodos.....	14
4.1. Produção da sNTPDase-1 de <i>T. cruzi</i>	14
4.2. Purificação da sNTPDase-1 de <i>T. cruzi</i>	14
4.3. Determinação da Concentração de Proteína.....	15
4.4. Análises em <i>SDS-PAGE</i>	15
4.5. Atividade Enzimática.....	15
4.6. Avaliação da estabilidade da sNTPDase-1 armazenada em diferentes temperaturas.....	16
4.7. Estudo da homogeneidade e oligomerização da NTPDase-1 recuperada dos corpos de inclusão.....	17
4.8. Produção de anticorpos policlonais anti-NTPDase-1.....	17
5. Resultados e Discussão.....	19
5.1. Purificação da NTPDase-1 heteróloga expressa em sistema bacteriano.....	19
5.2. Teste do método de dosagem de proteína.....	21
5.3. Estudo da homogeneidade e oligomerização da TcNTPDase-1 semi-purificada dos corpos de inclusão.....	22
5.4. Estabilidade da NTPDase-1 heteróloga.....	26

5.5. Ensaio de atividade nucleotidásica na presença de análogos de adenina como possíveis inibidores da TcNTPDase-1.....	27
5.6. Produção de anticorpos policlonais anti-NTPDase-1.....	32
6. Conclusões e Perspectivas.....	34
7. Referências Bibliográficas.....	36

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Transmissão vetorial e ciclo de vida de <i>Trypanossoma cruzi</i>	6
Figura 2. Ciclo de vida natural de <i>Trypanossoma cruzi</i>	7
Figura 3. Representação esquemática de localizações conhecidas ou preditas encontradas em humanos e patógenos, baseada em evidências experimentais e motivos presentes nas sequencias das proteínas.....	9
Figura 4. Purificação da sNTPDase-1 de <i>T. cruzi</i> em resina de níquel.....	19
Figura 5. Semi-purificação da NTPDase-1 de <i>T. cruzi</i>	20
Figura 6. Dosagem comparativa de proteína.....	22
Figura 7. Cromatograma de exclusão molecular para desalinização da amostra de TcNTPDase-1 semi-purificada e renaturada a partir dos corpos de inclusão.....	23
Figura 8A. Curva de calibração da Superdex 200 10/300GL.....	24
Figura 8B. Cromatografia de exclusão molecular da NTPDase-1 semi-purificada desalinizada.....	24
Figura 9. Atividade nucleotidásica (UDPásica) dos picos coletados da exclusão molecular.....	25
Figura 10. Estabilidade da TcNTPDase-1 renaturada a partir dos corpos de inclusão e mantida armazenada em diferentes temperaturas.....	26
Figura 11. Ensaio de atividade ATPásica na presença de DMSO.....	28
Figura 12. Estrutura dos análogos de adenina.....	30
Figura 13. Estrutura dos compostos intermediários de síntese dos análogos de adenina.....	31
Figura 14. Ensaio de inibição da atividade nucleotidásica sobre ATP da TcNTPDase-1, em concentração igual de inibidor e substrato.....	31
Figura 15. Ensaio de inibição da TcNTPDase-1 em alta concentração de substrato e baixa concentração dos possíveis inibidores.....	32
Figura 16. <i>Dot Blotting</i> do soro policlonal produzido em coelho.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ACR	Apyrase Conserved Regions
Adenosina_e	Adenosina extracelular
ADP	5'- Difosfato de adenosina
ADP_e	ADP extracelular
AMP	5'- Monofosfato de adenosina
AMP_e	AMP extracelular
ATP	5'- Trifosfato de adenosina
ATP_e	ATP extracelular
BCA	Ácido Bicinconínico
BSA	Soroalbumina bovina
DTT	Ditiotreitol
GDP	5'- Difosfato de guanosina
GTP	5'- Trifosfato de guanosina
Hepes	4-(2-hidroxietil)1-ácido piperazina-etanosulfônico
IL-8	Interleucina 8
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilo Dalton
km	Constante de Michaelis-Menten
mAU	Unidade de absorvância (Stanchev <i>et al.</i>)
MgCl	Cloreto de magnésio
mM	miliMolar
μM	microMolar
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanômetro

nmol	Nanomol
NTPDase	Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase
pH	Potencial hidrogeniônico
Pi	Fosfato inorgânico
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em condições desnaturantes
sNTPDase	Porção solúvel da NTPDase
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TcNTPDase	NTPDase de <i>Trypanosoma cruzi</i>
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UDP	5'- Difosfato de uridina
UTP	5'- Trifosfato de uridina
UV	Ultravioleta

RESUMO

MOURA, Christiane Mariotini, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2010. **Expressão heteróloga, purificação e busca de inibidores da NTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi***. Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto. Coorientadores: Márcia Rogéria de Almeida Lamego e Leandro Licursi de Oliveira

A Doença de Chagas é uma antropozoonose causada por *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida. *T. cruzi* possui em sua superfície uma ectonucleotidase denominada NTPDase-1. As ectonucleotidasas da família E-NTPDases são enzimas capazes de hidrolisar nucleotídeos tri e/ou difosfatados, que podem ser degradados a nucleosídeos por outras ectonucleotidasas. Os nucleotídeos extracelulares atuam como sinalizadores em vários processos celulares, como modulação da resposta imune de hospedeiros mamíferos. A hidrólise de ATP extracelular possui papel na infectividade e virulência do *T. cruzi*, bem como para outros parasitos, como *Leishmania*, *Trichomonas*, *Toxoplasma*, *Entamoeba* e outros. Por isso, as NTPDases são consideradas um alvo em potencial para o desenho racional de novas drogas para uso no tratamento da doença de Chagas. Neste trabalho realizamos a purificação parcial da NTPDase-1 e produzimos anticorpos policlonais contra ela. Além disso, avaliamos a estabilidade da sua atividade com relação à temperatura e tempo de armazenamento, estado de oligomerização, padronizamos um ensaio de inibição enzimática e realizamos uma triagem de análogos sintéticos de adenina como possíveis inibidores da NTPDase-1. Foi possível observar que a temperatura de armazenamento influenciou a atividade enzimática ao longo do tempo, sendo a temperatura de 4°C a que melhor preservou tal atividade. A amostra protéica purificada é heterogênea, apresentando oligômeros inativos e monômeros e/ou dímeros ativos. A atividade ATPásica pode ser inibida por adenina e análogos e essa inibição parece ser do tipo competitiva.

ABSTRACT

MOURA, Christiane Mariotini, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2010. **Heterologous expression, purification and search for inhibitors of the NTPDase-1 of *Trypanosoma cruzi***. Adviser: Juliana Lopes Rangel Fietto. Co-advisers: Márcia Rogéria de Almeida Lamego and Leandro Licursi de Oliveira

The Chagas' Disease is an antrozoonose caused by *Trypanosoma cruzi*, a flagellate protozoan of order Kinetoplastida. *T. cruzi* presents an ectonucleotidase on its surface, named NTPDase-1. The ectonucleotidases of the E-NTPDase family are enzymes capable of hydrolyse nucleotides tri and/or diphosphates that can be degraded to nucleosides by other ectonucleotidases. Extracellular nucleotides act as signaling molecules in several cellular processes, such as modulation of immune response of mammalian hosts. The ATP_e hydrolysis plays a role on *T. cruzi* infectivity and virulence, as in other parasites such as, *Leishmania*, *Trichomonas*, *Toxoplasma* and *Entamoeba*. Therefore, NTPDases are taken as potencial targets for the rational design of new drugs for the treatment of Chagas' disease. In this work we performed the parcial purification of TcNTPDase-1 and produced polyclonal antibodies against it. Futhermore, we evaluated the stability of its activity with respect to time and temperature of storage, standardized an inhibition assay and performed a screening of synthetic adenine analogues as potential inhibitors of NTPDase-1. It was observed that the storage temperature influenced the enzyme activity over time, and temperature of 4 ° C was the most efficient to preserve this activity. The purified protein sample is heterogeneous, with inactive oligomers and active monomers and/or dimers. The ATPase activity can be inhibited by adenine and analogues and this inhibition seems to be competitive.

1. Introdução

Trypanosoma cruzi é um protozoário hemoflagelado pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, conhecido como agente etiológico da Doença de Chagas (Chagas, 1909). Este parasito é naturalmente transmitido ao homem pelas fezes de insetos triatomíneos hematófagos contaminados. O parasito pode ainda ser transmitido verticalmente, por transfusão de sangue e transplante de órgãos, e por via oral, através da ingestão de alimentos contaminados (Rassi et al., 2010).

Conhecida também como Tripanossomíase Americana, a Doença de Chagas é uma enfermidade tropical predominantemente encontrada em 18 países da América Latina, acometendo atualmente cerca de 8 milhões de pessoas no mundo (Who, 2010). Apesar de o Brasil ter sido oficialmente considerado livre da transmissão pelo principal vetor relacionado ao ciclo doméstico, *Triatoma infestans* (Schofield et al., 2006), alguns surtos provenientes do ciclo silvestre têm acontecido principalmente relacionados a alimentos contaminados (Benchimol-Barbosa, 2009). Atualmente existem cerca de 2.500.000 indivíduos infectados por *T. cruzi* no Brasil (Amato Neto et al., 2009). De acordo com (Coura, 2006), após o controle do principal vetor e da transmissão via transfusão sanguínea, a forma oral de infecção tornou-se a mais importante, sendo responsável por micro-epidemias em diversas regiões do país.

No início dos anos 70, dois fármacos para o tratamento da Doença de Chagas começaram a ser comercializados, o Benznidazol e o Nifurtimox. Nos anos 80, a comercialização do Nifurtimox foi interrompida no Brasil. Além de ambas as drogas serem ineficazes no combate à doença, principalmente na fase crônica, elas apresentam ainda efeitos colaterais graves (Guedes et al., 2004).

A realidade é que mesmo tendo se passado um século desde sua descoberta, e apesar dos esforços empenhados para a redução da transmissão da doença, o Mal de Chagas ainda persiste como um grave

problema de saúde pública, afetando milhões de pessoas com alto impacto na morbidade e mortalidade.

O nosso foco de trabalho são as E-NTPDases, enzimas da família das Ectonucleotidases, mesma família gênica do marcador de linfócitos CD39 (Vasconcelos *et al.*, 1996). Estas enzimas são capazes de hidrolisar nucleotídeos extracelulares tri e difosfatados (Zimmermann, 2000), os quais exercem diversas funções como sinalizadores celulares via receptores purinérgicos e pirimidinérgicos, e têm sido apontadas como fatores de virulência de patógenos, incluindo *T. cruzi* (Sansom *et al.*, 2008). Além disso, os tripanosomatídeos são incapazes de sintetizar o anel das purinas na via de biossíntese de novo, o que os torna dependentes da via de salvação (Cohn *et al.*, 1997), onde o papel das NTPDases é descrito como importante.

Baseado na função típica desta família de proteínas tem sido proposto que estas enzimas podem modular respostas biológicas induzidas por nucleotídeos extracelulares e seus metabólitos (Sansom *et al.*, 2008). Vários eventos biológicos são modulados por nucleotídeos extracelulares e podem ser influenciados por ectonucleotidases de parasitos, como a agregação plaquetária dependente de ADP e a resposta inflamatória dependente de ATP (Maioli *et al.*, 2004).

T. cruzi apresenta uma E-NTPDase de superfície, denominada NTPDase-1 (Fietto *et al.*, 2004) cujo gene foi clonado e posteriormente expresso em sistema bacteriano (Santos *et al.*, 2009). Nestes dois trabalhos, demonstrou-se uma relação entre a hidrólise de ATP extracelular e a infectividade e virulência de *T. cruzi*, o que levou a hipótese da NTPDase-1 ser um bom alvo para o desenho racional de novas drogas para uso no tratamento da doença de Chagas. Para isso, o objetivo deste trabalho é obter esta proteína em grau de pureza e estabilidade suficientes para padronização de ensaio de inibição enzimática, e encontrar compostos capazes de inibir sua atividade que possam ser testados futuramente *in vitro* e *in vivo* para aplicação na quimioterapia da Doença de Chagas.

2. Revisão da Literatura

2.1. Doença de Chagas

A Doença de Chagas caracteriza-se por duas fases distintas, uma fase aguda e uma fase crônica. A fase aguda apresenta alta parasitemia, e é assintomática ou oligossintomática na grande maioria dos casos. Entretanto, dependendo do local de inoculação apresenta manifestações locais, como quando *T. cruzi* penetra na conjuntiva causando um edema bpalpebral unilateral (sinal de Romana), ou na pele, causando um edema pela picada do triatomíneo (chagoma de inoculação) (Who/Trs, 2009). Existem ainda algumas manifestações gerais como, febre, edema generalizado, mialgia, dor abdominal, dores de cabeça, diarreia, poliadenia, hepatomegalia, esplenomegalia, dispnéia, podendo vir acompanhada também de insuficiência cardíaca e perturbações neurológicas, entre outras (Prata, 2001). Durante esta fase, todos os tipos de células nucleadas no hospedeiro humano podem ser infectadas. A resposta imune do organismo leva a redução substancial da parasitemia, sinalizando o fim da fase aguda e início da fase crônica, caracterizada pela infecção de tecidos específicos (Rassi *et al.*, 2010)

Durante a fase crônica os parasitos se encontram nos tecidos-alvo, especialmente coração e musculatura lisa do trato digestivo. Essa fase pode ser assintomática (forma indeterminada ou latente), ocorrendo tipicamente no início da fase crônica e durando a vida toda na maioria dos pacientes (70%), ou sintomática, que pode evoluir após a fase de latência e apresentar sintomatologia relacionada com o sistema cardiovascular (forma cardíaca), digestivo (forma digestiva), ou ambos (forma mista), causando cardiomiopatias e megavísceras. Uma suposta fase neurológica, embora descrita pelo próprio Carlos Chagas, ainda é a menos estudada e pouco se sabe sobre ela (Who/Trs, 2009).

Diversos estudos tem sido realizados ao longo dos anos na tentativa de elucidar a patofisiologia da infecção por *T. cruzi*. É sabido que os danos causados durante a fase aguda da infecção são causados pelo parasita em si e pela resposta imune inflamatória aguda do hospedeiro, desencadeada pela

presença do parasito (Andrade, 1999), porém, a patogênese da fase crônica da doença de Chagas e os mecanismos que causam as lesões nos tecidos, nesta fase, ainda não estão claros (Who/Trs, 2009). Sabe-se, no entanto, que diversos fatores atuam direta ou indiretamente no aparecimento das lesões produzidas por *T. cruzi*. Alguns desses fatores estão relacionados ao parasito (tropismo celular, virulência da cepa, re-infecção, infecções mistas etc.), enquanto outros são inerentes ao hospedeiro (constituição genética, sexo, idade, raça, resposta imune, nutrição etc.) (Tafari, 1987). Podemos notar com isso, que como em outras doenças parasitárias, também na Doença de Chagas, os mecanismos pelos quais *T. cruzi* determina as lesões são multifatoriais.

2.2. Transmissão vetorial e ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

Apesar de ser considerada uma doença endêmica da América Latina, a doença de Chagas vem se tornando um problema de saúde pública emergente em países da América do Norte e Europa, devido ao forte movimento populacional, através de infecção não-vetorial (Who, 2010). Essa doença pode ser transmitida ao homem e a mais de 150 espécies de mamíferos domésticos e selvagens. Os insetos triatomíneos são os principais responsáveis pela transmissão vetorial, com destaque para *Triatoma infestans* (Rassi *et al.*, 2010). A transmissão vetorial e o ciclo evolutivo de *T. cruzi* estão resumidos na figura 1.

Ao longo do seu ciclo evolutivo, *T. cruzi* sofre profundas alterações morfológicas caracterizadas pela presença de vários estágios de desenvolvimento, que podem ser observados nos hospedeiros vertebrados e invertebrados e, de modo geral, refletem em sua adaptação aos microambientes onde se localizam (figura 2). As formas amastigotas, também conhecidas como esferomastigotas, presentes nos estágios evolutivos iniciais no barbeiro (*Triatoma infestans*), são responsáveis pela multiplicação intracelular nos hospedeiros vertebrados (Tyler *et al.*, 2001; De Souza, 2002). Os epimastigotas são encontrados no intestino médio e posterior dos

hospedeiros invertebrados onde se multiplicam ativamente por fissão binária (Tyler *et al.*, 2001; De Souza, 2002). Os tripomastigotas são considerados as formas infectivas para os hospedeiros vertebrados. Existem as formas tripomastigotas de tecidos ou sangüíneos, derivados do ciclo intracelular de multiplicação, quando após cumprir o ciclo intracelular são liberados para o meio extracelular, alcançando posteriormente os vasos sangüíneos. Existem ainda os tripomastigotas metacíclicos, provenientes da diferenciação nos insetos vetores, dos epimastigotas em tripomastigotas por um processo conhecido como metaciclogênese. Estes são naturalmente encontrados na ampola retal dos hospedeiros invertebrados e eliminados através das fezes e urina, representando, portanto, a forma infectiva para os hospedeiros vertebrados, considerando o mecanismo de infecção natural, via transmissão vetorial (Tyler *et al.*, 2001; De Souza, 2002).

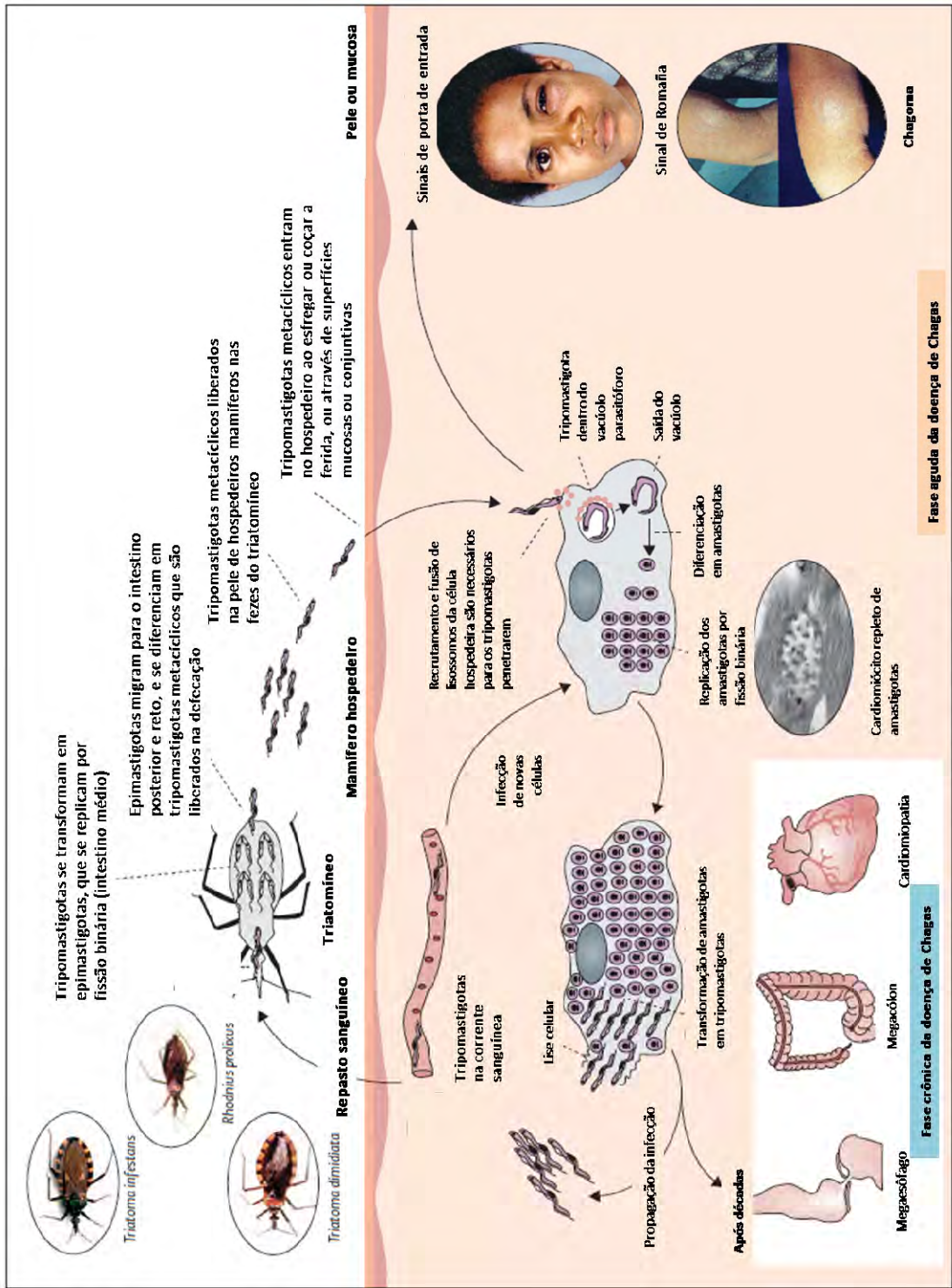


Figura 1: Transmissão vetorial e ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Adaptado de Rassi, 2010

Por ser um parasito intracelular obrigatório no hospedeiro vertebrado, a invasão da célula hospedeira tem um papel fundamental na manutenção e propagação da infecção. O processo de invasão pode ser dividido simplificadamente em três fases: (1) adesão do parasito à membrana da célula hospedeira; (2) internalização através da formação de um vacúolo parasitóforo; e (3) rompimento da membrana do vacúolo e liberação do parasito no citoplasma, onde ocorre sua replicação (De Souza, 1984). As moléculas que figuram nestes eventos são o foco de diversos estudos que visam encontrar alvos para uma terapia efetiva contra a Doença de Chagas.

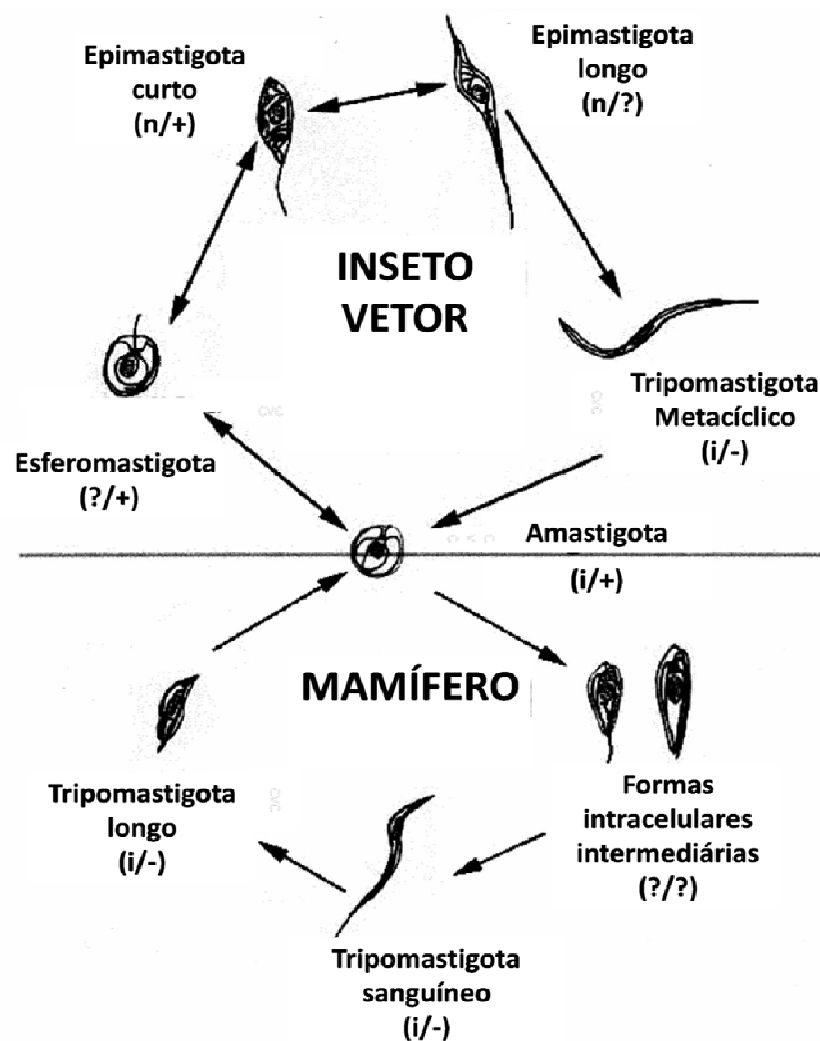


Figura 2: Ciclo de vida natural de *Trypanosoma cruzi*. Os desenhos representam morfologias presentes nos hospedeiros vertebrados e invertebrados (os desenhos não estão em escala). (i) forma infectiva; (n) forma não infectiva; (+) forma proliferativa; (-) forma não proliferativa. Adaptado de Tyler, 2001.

2.3. As Ecto-NTPDases

As apirases do tipo E-NTPDases são ectonucleotidases descritas, de uma maneira geral, como proteínas de superfície de membrana ou solúveis (excretadas) que têm como principal função a degradação de nucleotídeos, especialmente extracelulares, di e/ou trifosfatados. Essas enzimas são muito importantes para vários processos biológicos e tem sido muito estudadas com relação à sua importância em infecções causadas por patógenos, incluindo protozoários como *T. cruzi* (Sansom et al., 2008).

Todas as enzimas pertencentes à família das apirases possuem cinco regiões altamente conservadas de apirase (ACRs) (Handa et al., 1996; Schulte Am Esch et al., 1999), e mutações dentro das ACRs podem levar a perda da atividade bioquímica (Schulte Am Esch et al., 1999).

As apirases possuem diferentes localizações subcelulares e, conseqüentemente, diferentes funções como participação na via de glicosilação de proteínas (Braun et al., 2000; Sanchez et al., 2003) e trombaregulação (Pinsky et al., 2002). Membros da família das E-NTPDases são classificados em dois grupos, de acordo com sua topologia de membrana. As E-NTPDases 1, 2, 3, 4, 7 e 8 possuem predição de domínio transmembrana N- e C-terminal, enquanto as NTPDases 5 e 6 possuem predição somente N-terminal (figura 3) (Zimmermann, 2000; Herbert Zimmermann, 2001; Sansom et al., 2008).

T. cruzi apresenta até o momento somente uma E-NTPDase descrita, a NTPDase-1 (Fietto et al., 2004). O parasito intacto é capaz de hidrolisar ATP, ADP, UTP, UDP, GTP e GDP, e apresenta proteínas imunorreativas com antisoro anti-NTPDase de *T. gondii*, na superfície da membrana de todas as formas do parasito (Fietto et al., 2004). A forma infectiva (tripomastigota) apresenta hidrólise significativamente maior de ATP em relação ao ADP, comparada com a forma não-infectiva (epimastigota), o que sugere uma participação dessa atividade com o processo infectivo (Fietto et al., 2004).

Sabe-se que o ATP extracelular (ATP_e), e seus produtos de degradação ADP_e , AMP_e e adenosina $_e$, bem como outros nucleotídeos e nucleosídeos, são componentes normais do meio extracelular e estão envolvidos com vários

efeitos biológicos em diferentes células, tecidos e órgãos (Dombrowski *et al.*, 1998). Visto que os nucleotídeos extracelulares não são, por si só, capazes de atravessar a membrana celular, para que estas inúmeras respostas ocorram, é preciso que ocorra o reconhecimento destes nucleotídeos pelos purinoreceptores para que a célula possa captar o sinal e definir a resposta.

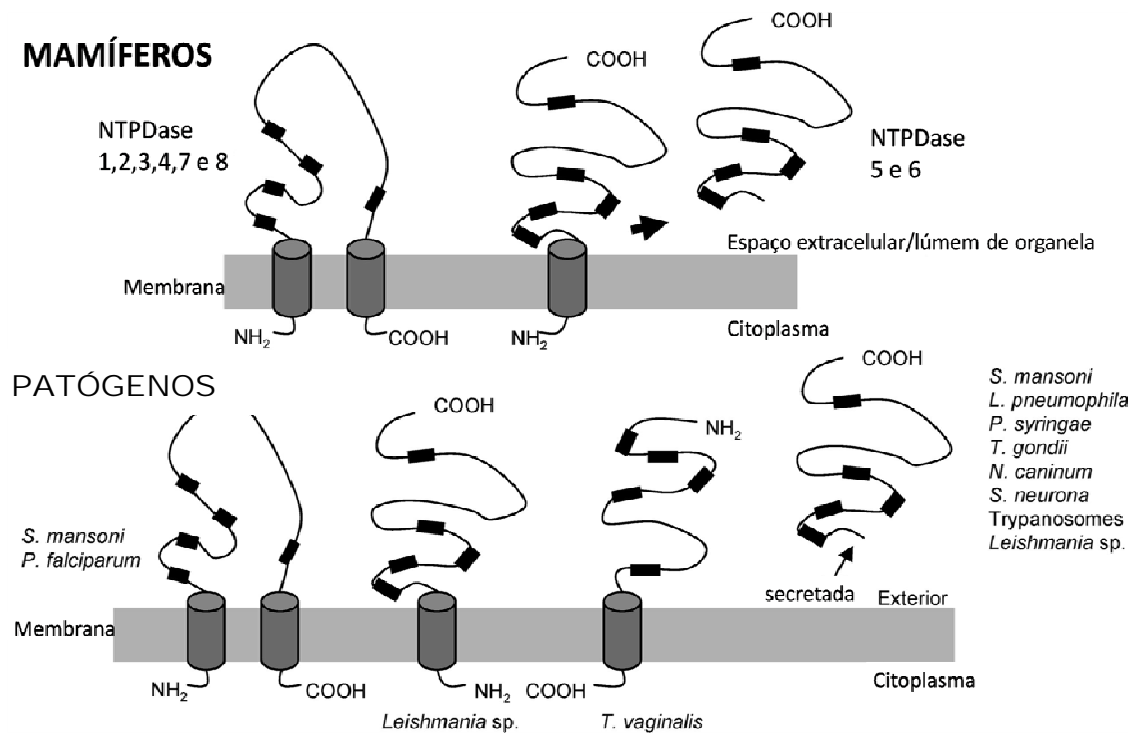


Figura 3: Representação esquemática de localizações conhecidas ou previstas encontradas em humanos e patógenos, baseada em evidências experimentais e motivos presentes nas sequências das proteínas. Cilindros representam os domínios transmembrana, e retângulos pretos representam as ACRs. Adaptada de Sansom, 2008.

A penetração de *T. cruzi* nas células hospedeiras envolve uma série combinada de eventos que culmina com a mobilização de Ca²⁺ celular, com esse aumento ocorrendo inicialmente nas células hospedeiras seguido por um aumento citosólico de cálcio no parasito, logo após a adesão parasito-célula hospedeira (Moreno *et al.*, 1994; Tardieux *et al.*, 1994; Burleigh *et al.*, 1995a; b; Docampo *et al.*, 1996; Burleigh *et al.*, 1998). Sabe-se que as formas infectivas de *T. cruzi* secretam um fator solúvel de estrutura desconhecida, capaz de

estimular sinais de Ca^{2+} nas células hospedeira (Burleigh *et al.*, 1995a), este fator poderia ser a NTPDase-1 ou uma outra enzima com atividade ecto-nucleotidásica.

De uma maneira geral, a concentração extracelular dos nucleotídeos e a presença de subtipos diferentes de receptores nas células regulam a resposta celular a estas biomoléculas e, por sua vez, a presença e concentração dos nucleotídeos são reguladas pela ação de enzimas metabolizadoras destes.

Em trabalho recente (Santos *et al.*, 2009) observou-se com o cultivo de tripomastigotas em células VERO, que após três passagens celulares, apenas uma pequena fração dos tripomastigotas era capaz de realizar uma quarta passagem, e que esses parasitos (tripomastigotas) apresentavam níveis 2,5 vezes maiores de atividade ecto-ATPásica quando comparados com parasitas que não foram capazes de penetrar nas células. Foram realizados também ensaios com três conhecidos inibidores de E-NTPDases: ARL67156, Gadolinium e Suramina. Observou-se que tripomastigotas de primeira passagem tratados com esses inibidores, especialmente a Suramina, mostraram redução significativa da infectividade *in vitro* e da virulência *in vivo* (em modelo murino). A suramina também inibiu a NTPDase-1 recombinante de *T. cruzi*. Porém, por não serem inibidores específicos, não podemos excluir a possibilidade de uma atividade adicional em outras moléculas-alvo. No entanto, o mesmo efeito inibitório da infecção *in vitro* foi verificado com adição de anti-soro policlonal anti-NTPDase1 recombinante, o que reforça a possível participação desta enzima ou homólogos como facilitadores da infecção. Apesar da provável participação da NTPDase-1 no processo infectivo, não se conhece o mecanismo molecular exato da indução de perda de infectividade e virulência observadas. Entretanto, acredita-se que estes efeitos estejam relacionados a não inibição da sinalização purinérgica da célula hospedeira, que levaria a ativação da resposta imune do hospedeiro quando a NTPDase-1 e seus possíveis homólogos estejam parcialmente inibidos pelos compostos inibidores ou pelo soro policlonal anti-NTPDase-1.

2.4. Sinalização Purinérgica

Por muitos anos, o interesse nas purinas e pirimidinas resumiu-se ao envolvimento do ATP no metabolismo e em seu papel como fonte de energia (Abbracchio *et al.*, 1998). Em 1972, Burnstock observou a participação das purinas em mecanismos de sinalização no sistema nervoso autônomo, e utilizou, pela primeira vez, o termo “purinérgico” (Burnstock, 1972). Hoje se sabe que não somente as purinas, mas também as pirimidinas possuem papel como moléculas sinalizadoras, existindo diversos exemplos de sinalização purinérgica com efeitos biológicos conhecidos, como proliferação celular, diferenciação, migração e morte (Burnstock, 2006).

Em diversos tecidos, incluindo o sistema imune, o ATP e outros nucleosídeos tri e difosfatados são hidrolisados por enzimas da família das E-NTPDases, também chamadas de apirases (Kaczmarek *et al.*, 1996; Kegel *et al.*, 1997; Atkinson *et al.*, 2006). A enzima ecto-5'-nucleotidase catalisa o passo final da hidrólise dos nucleotídeos, hidrolisando nucleosídeos monofosfatados a nucleosídeo e Pi (Zimmermann, 2000). A adenosina extracelular resultante pode ser transportada e incorporada em vias de recuperação de purinas, nos diversos parasitos que não possuem a via de síntese *De novo* (Maioli *et al.*, 2004; De Almeida Marques-Da-Silva *et al.*, 2008). Além disso, o acúmulo de adenosina extracelular contribui para a imunodeficiência por possuir um efeito tóxico no desenvolvimento dos linfócitos (Abbracchio *et al.*, 2007). O ATP extracelular (ATPe), por exemplo, está envolvido em efeitos citostáticos e citotóxicos em vários tumores, além de ser necessário para a secreção de algumas citocinas. O ADP extracelular estimula a agregação plaquetária e o UDP estimula a liberação de IL-8 por monócitos (Dombrowski *et al.*, 1998). Contudo, como dito anteriormente, para que estas respostas ocorram é necessário o reconhecimento destes nucleotídeos pelos purinoreceptores.

Os purinoreceptores são proteínas ancoradas à membrana celular que se ligam a purinas e/ou pirimidinas. Quando ocorre o reconhecimento, este receptor desencadeia uma série de reações, alterando o comportamento celular. Os receptores que ligam nucleotídeos e nucleosídeos são divididos em receptores do tipo P1, acoplados a proteína G, (subdivididos em A₁, A_{2A}, A_{2B} e

A₃), e em receptores P2, que são subdivididos em dois grandes grupos: os receptores tipo canal iônico P2X (P2X₁₋₇); e os receptores tipo serpentina, P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ e P2Y₁₁₋₁₄) (Ralevic *et al.*, 1998). Cada classe e subclasse destes receptores possui uma afinidade diferente para um ou mais nucleosídeos. Por exemplo, o receptor P1A₁ é ativado por adenosina e inosina, possuindo uma maior afinidade por adenosina. Os receptores do tipo P2X são ativados por ATP em diferentes concentrações para cada subtipo. Os receptores P2Y podem ser ativados por ATP, ADP, UTP, UDP e UDP-Glicose (Bours *et al.*, 2006). Desta forma, o efeito de um mesmo nucleotídeo será diferente em cada tipo de célula dependendo de sua concentração no microambiente e do receptor específico, ou conjunto de receptores, sendo expresso no momento pela célula. Além disso, foi demonstrado que os efeitos fisiológicos de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina dependem de uma rede formada por receptores e enzimas na membrana plasmática, mostrando que as respostas podem variar, também, de acordo com essa combinação (Schicker *et al.*, 2009).

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Encontrar inibidores em potencial da NTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi*.

3.2. Objetivos específicos

- Purificar a proteína NTPDase-1 recombinante, expressa em sistema heterólogo bacteriano;
- Produzir anti-soro policlonal anti-sNTPDase-1 recombinante de *T. cruzi* em coelho;
- Padronizar um ensaio de atividade enzimática em microplaca;
- Avaliar a estabilidade da atividade enzimática com relação ao tempo e à temperatura de armazenamento;
- Avaliar o estado de oligomerização do preparado protéico;
- Realizar uma triagem de análogos sintéticos de adenina quanto à capacidade de inibição da sNTPDase-1 heteróloga.

4. Materias e Métodos

4.1. *Produção da sNTPDase-1 de T. cruzi*

A NTPDase-1 apresenta uma região transmembrana N-terminal de 36 aminoácidos predita, com um sinal de clivagem, indicando que possa ser secretada. Essa porção transmembranar foi retirada para expressão somente do ectodomínio contendo 600 aminoácidos (porção solúvel – sNTPDase-1). A sequência gênica que codifica a porção solúvel da NTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi* já havia sido clonada no plasmídeo pET21b Novagen® (Fietto *et al.*, 2004). O pET21b possui fusão C-terminal de uma cauda de hexahistidina, a fim de possibilitar a posterior purificação da proteína recombinante através de cromatografia de afinidade por metal. O plasmídeo recombinante foi purificado a partir das células Top10 (Sambrook *et al.*, 1989) e células de *E. coli* BL21(DE3)RIL foram transformadas para a expressão da proteína. A transformação foi feita por choque térmico (30' em gelo e 1'30" a 42°C, em seguida) e as células cresceram por 40' em meio LB (Sambrook *et al.*, 1989). O pré-inóculo foi cultivado overnight em 4mL de meio LB contendo 50µg/mL de ampicilina. A cultura foi transferida para 0,5L de meio SOC (Sambrook *et al.*, 1989) e as células cresceram até atingir a DO₆₀₀ de 0,6. Para a indução da expressão, 0,25mM de IPTG foi adicionado e a indução foi realizada por uma hora, a 30°C. Ao final da indução pellets de alíquotas de 50mL (aproximadamente 0,5g de células) foram armazenados à -80°C até o uso.

4.2. *Purificação da sNTPDase-1 de T. cruzi*

A purificação dos corpos de inclusão foi realizada como previamente descrito por (Areas *et al.*, 2002) com modificações (semi-purificação). O tampão de lise continha 50mM de Tris pH8,0, 100mM de NaCl e os inibidores de proteases aprotinina (1µg/mL), pepstatina (1µg/mL), leupeptina (1µg/mL).

Foi adicionado 1mg/mL de lisozima para auxiliar no processo de lise, feita por sonicação em 6 pulsos de 10 segundos intercalados com intervalos de 10 segundos, e amplitude de 20 Hz. Os passos de centrifugação foram realizados a 12500g e o pellet solubilizado foi ressuspendido em 10mL de tampão (50mM de Tris pH8,0; 500mM de NaCl) e armazenado à 4°C por 24h antes de ser utilizado. A purificação da fração solúvel e dos corpos de inclusão em resina de Ni⁺⁺ Sigma[®], em condições nativas, foi feita de acordo com o manual do fabricante. Para condições desnaturantes, algumas modificações foram feitas. O tampão de lavagem continha 50mM de tris pH 8,0, 100mM de NaCl, 10mM de imidazol, 8M de uréia e 10mM de β-mercaptoetanol. Para o tampão de eluição foi utilizado 250mM de imidazol e concentrações decrescentes de uréia, mantendo os demais constituintes e suas respectivas concentrações.

4.3. Determinação da Concentração de Proteína

A concentração de proteína utilizada para os demais ensaios foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) para microplaca, segundo instruções do fabricante (Biorad[®]). As concentrações padrão foram determinadas com BSA. Quando indicado no texto também foram feitas dosagens pelo método do BCA (ácido bicinconínico) e por UV a 280nm.

4.4. Análises em SDS-PAGE

As análises em SDS-PAGE foram realizadas como previamente descrito (Sambrook *et al.*, 1989). O SDS-PAGE foi corado com coomassie blue ou AgNO₃ (Sambrook *et al.*, 1989), conforme indicado.

4.5. Atividade Enzimática

A atividade enzimática foi realizada por dois métodos diferentes. O método mais utilizado foi o microcolorimétrico de determinação de fosfato livre,

pelo método do verde de malaquita (Tausky *et al.*, 1953). A atividade foi feita em tampão 50mM de Tris pH8,0; 50mM de HEPES pH8,0; 2,5mM de MgCl₂; 116mM de NaCl ; 5,4mM de KCl e 2,5mM de nucleotídeo, num total de 80μL de reação, incluindo a proteína. A reação foi disparada com 0,5μg de proteína e ocorreu por 30 minutos à 37°C, até que fosse parada com mesmo volume de 0,1M de HCl. Para determinação de fosfato livre, foi utilizado o reagente colorimétrico (verde malaquita 0,2% e molibdato de amônio 10% 1:3, ambos ressuspendidos em HCl 4M) . O branco da reação continha todos os reagentes, exceto a proteína que foi adicionada após a parada da reação. Foi utilizado 20mM de DTT quando indicado. A leitura foi realizada a 650nm.

Para os testes de compostos químicos sintéticos como possíveis inibidores da NTPDase-1, foi usado DMSO como diluente dos compostos em várias concentrações, adenina comercial, 7 análogos sintéticos de adenina e 3 intermediários de síntese, sendo cada um diluído em DMSO e adicionados nos ensaios de atividade nucleotidásica nas concentrações indicadas nas legendas das figuras. Os análogos foram sintetizados e cedidos pelo laboratório da Prof. Arlene Gonçalves Correa, especialista em síntese orgânica (UFSCAR). Os ensaios de inibição competitiva foram realizados usando [γ -³²P]ATP (Lemos *et al.*, 2000), feitos em colaboração com o grupo do Dr. José Roberto Meyer-Fernandes, no Departamento de Bioquímica Médica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

4.6. Avaliação da estabilidade da sNTPDase-1 armazenada em diferentes temperaturas

Para avaliar a estabilidade da atividade enzimática com relação ao tempo e à temperatura de armazenamento, cada uma de três amostras diferentes de proteína semi-purificada foram divididas em três alíquotas. De cada amostra, uma alíquota foi armazenada a -22°C, uma a 4°C e uma a 22°C. Foram realizados ensaios de atividade enzimática (UDPásica) por 20 dias

consecutivos, partindo do tempo “zero” após a purificação. Antes de cada ensaio, todas as amostras eram mantidas por 5 minutos em gelo.

4.7. Estudo da homogeneidade e oligomerização da NTPDase-1 recuperada dos corpos de inclusão

Os corpos de inclusão foram solubilizados em 1mL de tampão 8M de uréia e depois aplicados em um FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) Äkta Purifier (GE Healthcare®) em coluna Hi-trap desalting (GE Healthcare®), para retirada da uréia e excesso de sais. O pico foi coletado em aproximadamente 1,5 mL de tampão de atividade. Para determinação da homogeneidade da amostra protéica e estado de oligomerização, estrutura quaternária foi utilizado o mesmo equipamento com a coluna de exclusão molecular Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare®), onde foi aplicado 500µL de amostra desalinizada. Para a curva padrão foram utilizados 2mg/mL cada de blueextran (2000 kDa), tireoglobulina (669 kDa) e aldolase (158 kDa); 7mg/mL cada de albumina (67 kDa) e ovoalbumina (43 kDa), 5mg/mL de catalase (232 kDa); 3mg/mL de quimiotripsinogênio A (25 kDa); 0,5mg/mL de ferritina (440 kDa) e 1mg/mL de ribonuclease A (13,7 kDa), para os quais foram feitas três corridas separadas, de acordo com instruções do fabricante. O tampão de corrida foi o mesmo utilizado para a atividade enzimática.

4.8. Produção de anticorpos policlonais anti-NTPDase-1

Para a produção de anticorpos, um coelho, fêmea, adulta jovem, proveniente do biotério de criação de coelhos da Universidade Federal de Viçosa (UFV) foi utilizado. Antes da imunização, uma amostra de sangue foi obtida por punção da veia marginal da orelha (soro pré-imune). A sNTPDase foi purificada em resina de níquel (Sigma Aldrich®) até a obtenção de uma quantidade satisfatória. Foram realizadas três imunizações, intradérmicas, com 200µg/500µL de proteína, com intervalos de 21 e 15 dias, respectivamente. Na

primeira imunização foi adicionado, em igual volume, adjuvante completo de Freund, e nas outras duas, adjuvante incompleto. No sétimo dia após a terceira imunização foi colhida uma amostra de sangue para verificar se a imunização havia sido efetiva.

Para a determinação do título do antisoro, um *Dot Blotting* foi realizado, com 0,6 mg de proteína em membrana de nitrocelulose. Para o bloqueio, BSA na concentração de 0,3% foi utilizado por trinta minutos. Após três lavagens de cinco minutos com PBS-T, os soros policlonal e pré-imune foram adicionados em diferentes concentrações e a incubação ocorreu por uma hora. Em seguida, três lavagens de cinco minutos com PBS-T foram realizadas para posterior incubação com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich[®]) na diluição 1: 20.000. A reação foi revelada com 0,1% de 3,3'-diaminobenzidina, 0,01% de H₂O₂, 1% de cloreto de níquel em Tris-HCl pH 7,6.

5. Resultados e Discussão

5.1. Purificação da NTPDase-1 heteróloga expressa em sistema bacteriano

Devido ao nosso interesse em cristalizar futuramente a NTPDase-1 de *T. cruzi*, havia a necessidade de se obter a proteína em seu estado nativo, ou seja, sem que tenha passado por processos de desnaturação e renaturação, e com alto grau de pureza. Porém, a proteína proveniente da fração solúvel não foi capaz de se ligar à resina de níquel (figura 4A) em nenhuma das condições tempo de ligação, pH ou concentração de sal testadas. Para afastar a hipótese da cauda de poli-histidina não estar presente na estrutura da proteína, a purificação foi realizada em condições desnaturantes (figura 4B). Como podemos observar na figura, a proteína desnaturada foi capaz de se ligar à resina, comprovando a presença da cauda de poli-histidina. Acreditamos que a proteína solúvel, durante o seu dobramento, tenha ocultado a cauda de forma que ela não esteja disponível para interagir com o metal. A NTPDase-1 solúvel somada dos aminoácidos adicionados pelo plasmídeo, totaliza aproximadamente 68 kDa.

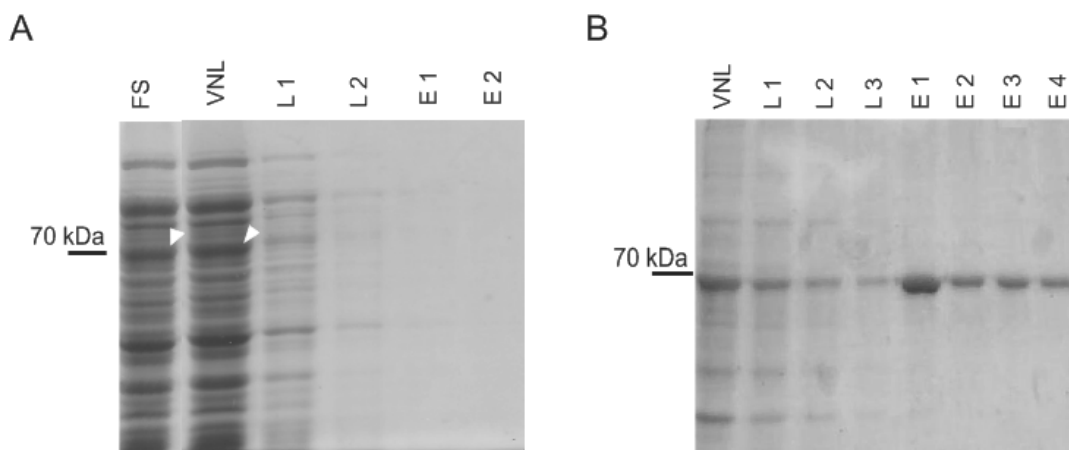


Figura 4: Purificação da sNTPDase-1 de *T. cruzi* em resina de níquel. Os pellets de indução foram lisados e centrifugados para separar a fração solúvel e a fração insolúvel (corpos de inclusão). A fração solúvel (FS) foi purificada em condições nativas (A). Os corpos de inclusão foram previamente semi-purificados e então purificados em condições desnaturantes (B). VNL é o volume que não interagiu com a coluna (volume não ligado). L1-L3 são as lavagens. E1-E4 são as eluições. Cabeças de seta brancas indicam a posição da NTPDase-1 na FS e no VNL. A indicação de 70 kDa representa a banda do marcador de peso molecular (não mostrado). Foram aplicados 15 μ L de cada fração em cada canaleta.

Devido ao fato de a proteína solúvel não ser capaz de se ligar à resina de afinidade, e de a proteína estar abundante nos corpos de inclusão, utilizamos essa fração para a obtenção da NTPDase-1. A etapa de purificação na resina, após a semi-purificação dos corpos de inclusão, não mostrou alteração significativa nos ensaios de atividade nucleotidásica sobre ATP (dados não mostrados). Sendo assim, optamos por utilizar a proteína semi-purificada, para os demais testes de atividade enzimática, eliminando etapas e ainda assim obtendo a NTPDase-1 com um grau de pureza satisfatório para os ensaios propostos (figura 5). Obviamente, no caso de futura cristalização é necessário maior cuidado em relação ao estado nativo homogêneo da amostra protéica.

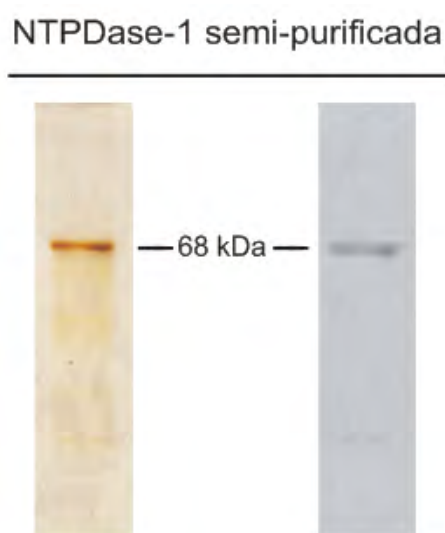


Figura 5: Semi-purificação da NTPDase-1 de *T. cruzi*. Após as lavagens, os corpos de inclusão foram solubilizados em tampão contendo 8M de uréia e ressuspensos em 20 mL de tampão para renaturação, conforme descrito em materiais e métodos. Foram aplicados 15 μ L de cada fração em cada canaleta. O gel a esquerda foi corado pelo método da prata e o gel da direita foi corado por coomassie-blue.

A sNTPDase-1 foi parcialmente caracterizada por nosso grupo (dados não publicados). A enzima foi capaz de hidrolisar, preferencialmente e com eficiência semelhante, GDP e UDP, seguidos por GTP e UTP, cerca de duas vezes menos e também com eficiência semelhante. O ATP e o ADP foram hidrolisados com menor eficiência pela enzima. Apesar disso, o Km para o ATP foi significativamente menor que para o UDP, sugerindo que a enzima possui maior afinidade por ATP. Devido a isso e à sua importância na sinalização purinérgica, esses dois nucleotídeos foram utilizados para os ensaios de atividade realizados neste trabalho. Também foram realizados ensaios de atividade ATPásica quanto ao pH e ao co-fator, mostrando que para esta enzima o pH ótimo é próximo de 8,0, e seu co-fator é o magnésio. Neste trabalho, todos os tampões foram ajustados para as preferências observadas para a sNTPDase-1.

5.2. Teste do método de dosagem de proteína

A fim de obter uma dosagem de proteínas totais o mais fiel possível, foram comparados três métodos muito utilizados na literatura, são eles: BCA, UV₂₈₀ e Bradford. Para este teste foi usada como padrão soroalbumina bovina pura, aplicada em gel SDS-PAGE 10% na quantidade absoluta de 1 µg. A NTPDase-1 purificada foi quantificada pelos três métodos e uma alíquota de 1 µg de cada dosagem foi aplicada no mesmo gel, sendo a intensidade das bandas comparadas após coloração com coomassie blue (figura 6). De acordo com o resultado obtido, os métodos do BCA e UV₂₈₀ superestimaram a concentração de proteína, enquanto o método de Bradford foi o que mais se aproximou do controle (BSA) e, portanto, este foi escolhido para continuidade deste trabalho.

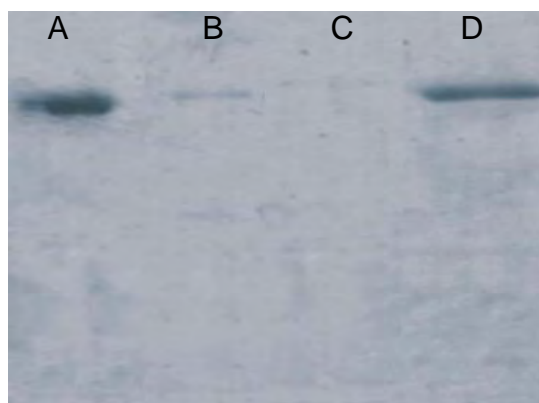


Figura 6: Dosagem comparativa de proteína. NTPDase-1 semi-purificada foi dosada por diferentes métodos de dosagem de proteína total. Em cada canaleta foi aplicado 1 μ g segundo cada método. (A) 1 μ g BSA (controle). (B) 1 μ g de TcNTPdase dosada por UV₂₈₀. (C) 1 μ g de TcNTPdase dosada por BCA. (D) 1 μ g de TcNTPdase dosada por Bradford. As amostras foram analisadas em gel SDS-PAGE 10%, corado com coomassie blue.

5.3. Estudo da homogeneidade e oligomerização da TcNTPDase-1 semi-purificada dos corpos de inclusão

A proteína semi-purificada, foi desalinizada para retirada da uréia (figura 7), e o pico de proteína foi recolhido e submetido à separação em cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 10/300GL (GE Healthcare®). Três corridas padrão foram realizadas e depois sobrepostas a fim de se relacionar o tamanho de proteínas conhecidas com o volume de retenção na coluna (figura 8A). Em seguida a amostra de TcNTPDase-1 desalinizada foi aplicada na mesma coluna de exclusão molecular. Foram observados dois picos principais, com retenção em aproximadamente 8mL e 14/15mL, respectivamente (figura 8B). O primeiro pico (fração 06), que apresentou a maior concentração de proteína, possui, segundo a curva padrão, pelo menos 600kDa, podendo representar um agregado protéico ou mesmo um oligômero da NTPDase-1. O segundo pico (fração 10/11) apresentou volume de retenção esperado para o monômero com 68 kDa, próximo aos 14,37mL apresentados para a albumina (67 kDa), apresentando ainda um “ombro” que pode corresponder a um dímero. Os outros picos, a julgar pelo tamanho pequeno em kDa, são peptídeos possivelmente provenientes de degradação ou contaminantes.

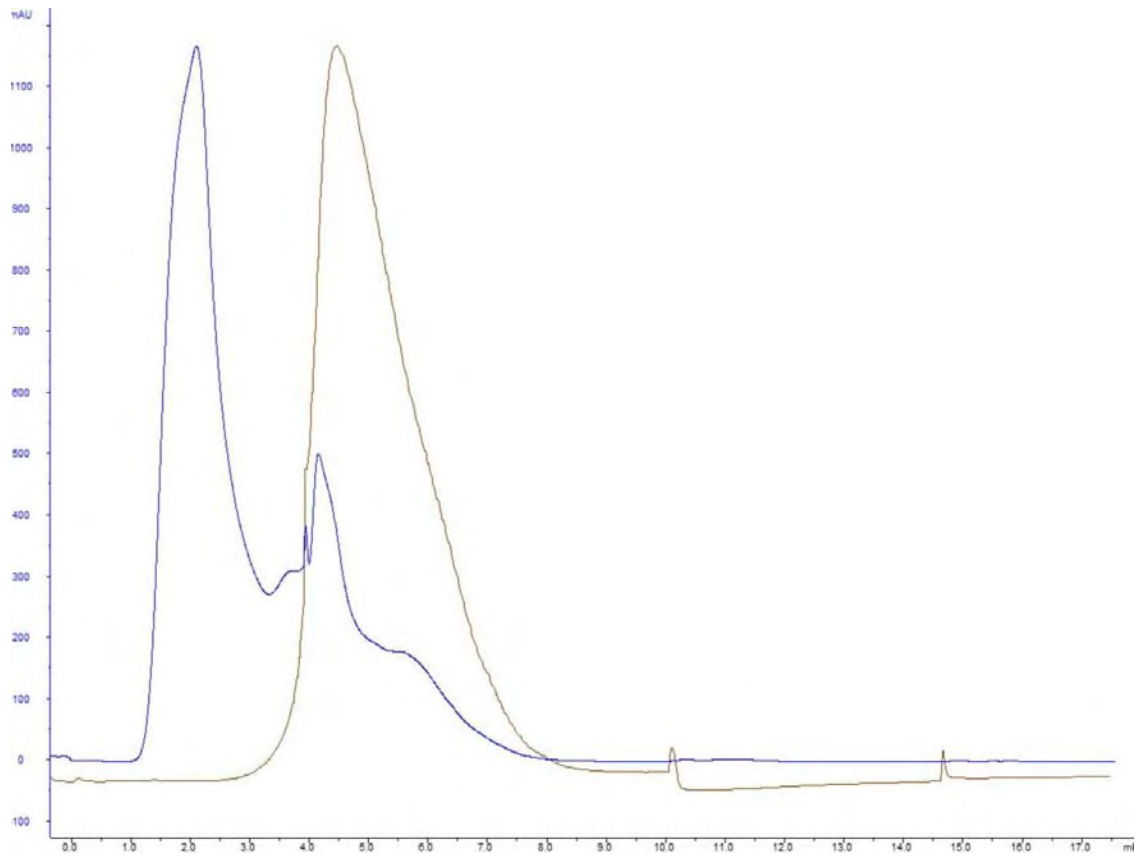
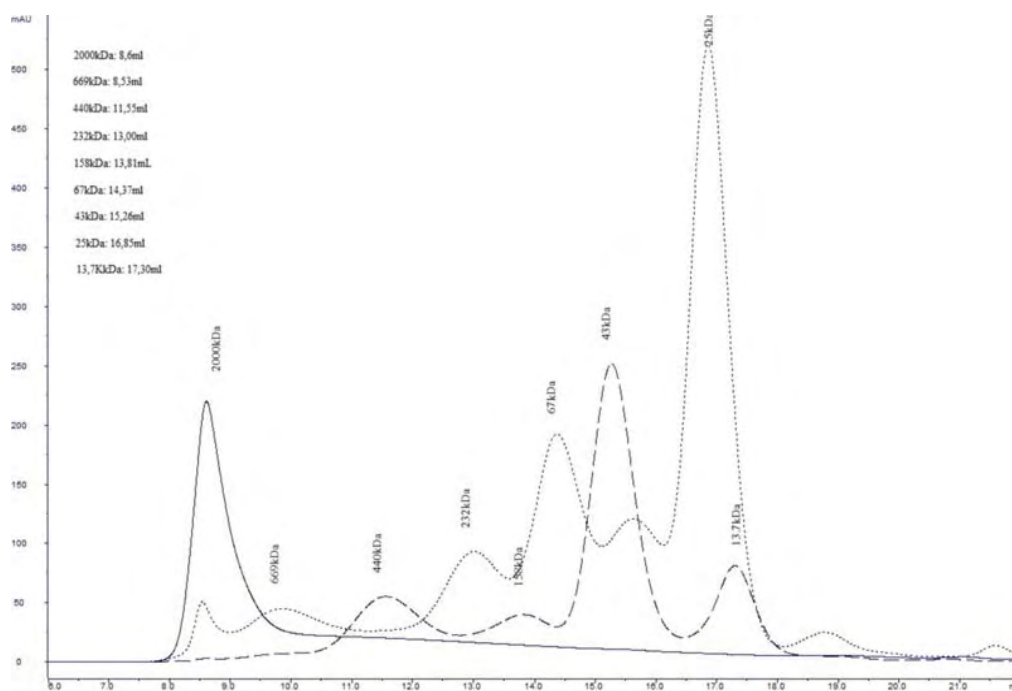


Figura 7: Cromatograma de exclusão molecular para desalinização da amostra de TcNTPDase-1 semi-purificada e renaturada a partir dos corpos de inclusão. Os corpos de inclusão solubilizados e renaturados em solução contendo ainda 400 mM de uréia foram submetidos à desalinização. A linha azul corresponde à leitura em mAU, correspondente ao pico protéico. A linha marrom corresponde à condutância, mostrando que o segundo pico corresponde à uréia.

A



B

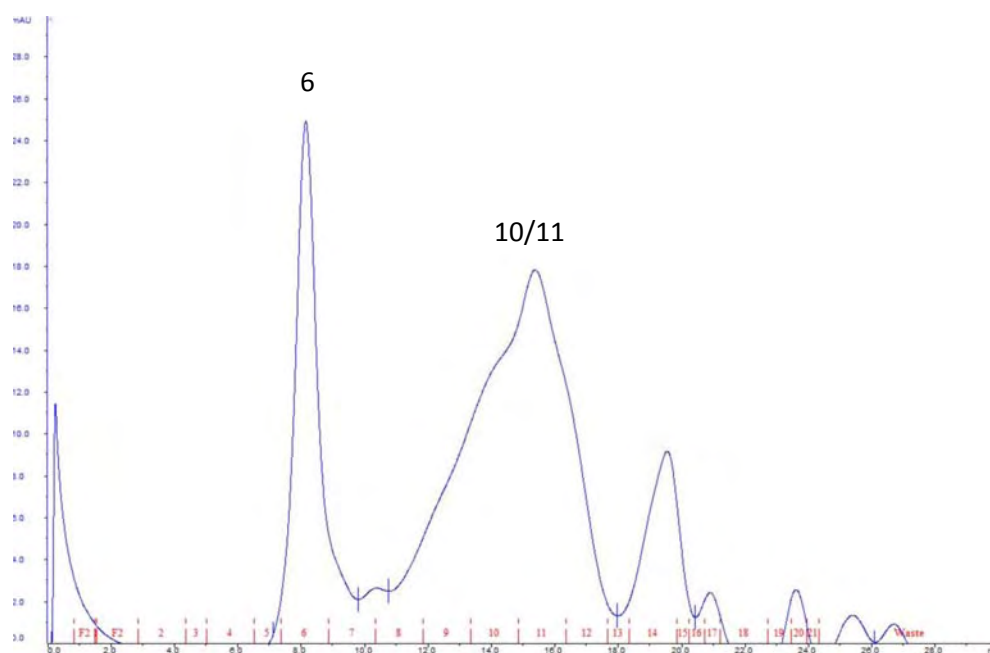


Figura 8: A) Curva de calibração da Superdex 200 10/300GL. B) Cromatografia de exclusão molecular da NTPDase-1 semi-purificada desalinizada. Para a curva padrão, foram realizadas três corridas cromatográficas separadas com proteínas fornecidas pelo fabricante, de acordo com o manual de calibração da coluna. Os cromatogramas foram depois sobrepostos para construção da curva de calibração. Foram aplicados 500 mL do pico da desalinização. As frações da coleta estão representadas em vermelho.

No processo de dessalinização seguido de cromatografia de exclusão molecular, as amostras foram muito diluídas sendo posteriormente concentradas em Speedvac (Eppendorf®). Ainda assim, não foi possível quantificar o conteúdo protéico das mesmas com nenhuma das técnicas utilizadas neste trabalho (BCA, UV280, Bradford) ou visualizá-las em SDS-PAGE 10%. Apesar disso, foi possível medir suas atividades nucleotídicas sobre UDP (figura 9). A amostra da fração 06 a princípio não apresentou atividade, porém, após a adição de 20mM de DTT apresentou atividade significativa. Podemos sugerir com isso que os oligômeros ou aglomerados não são ativos, e que, a ação do DTT desfaz essas estruturas, liberando enzima ativa no meio. A amostra da fração 10/11, possivelmente composta de monômeros e dímeros, apresentou atividade inicialmente, porém na presença de 20mM de DTT essa atividade diminuiu, sugerindo que a ação deste agente redutor tenha alterado a estrutura terciária do monômero, ou desfeito dímeros ativos. É válido lembrar que, pelo fato de não termos conseguido dosar o conteúdo protéico das amostras, os valores de atividade estão mostrados por volume de amostras e não em atividade específica, o que impede a comparação entre diferentes amostras e só devem ser comparados entre mesmas amostras, ou seja, amostra com ou sem DTT.

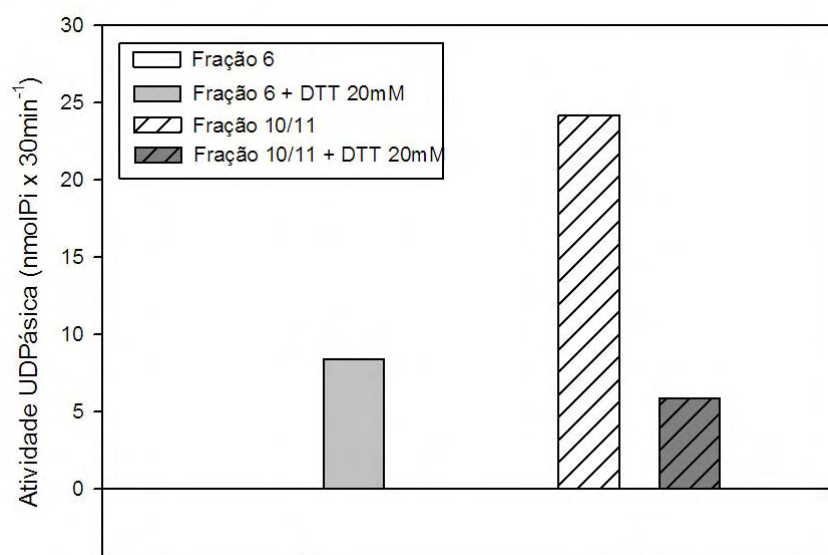


Figura 9: Atividade nucleotídica (UDPásica) dos picos coletados da exclusão molecular. A atividade foi realizada nas mesmas condições descritas em matérias e métodos, com exceção da quantidade de proteína que, neste caso, foi padronizado o volume de amostras ao invés da concentração. As amostras continham ou não, 20mM de DTT. O ensaio foi realizado em triplicata.

5.4. Estabilidade da NTPDase-1 heteróloga

A fim de otimizar os ensaios de atividade enzimática, avaliamos a estabilidade da proteína purificada a partir dos corpos de inclusão, mas não passada na separação por cromatografia de exclusão molecular, por 20 dias, em diferentes temperaturas de armazenamento, -22°C , 4°C e 22°C (figura 10). A melhor temperatura foi a de 4°C , na qual a proteína apresentou maior estabilidade, mantendo-se ativa por mais tempo. A atividade foi crescente até o 5º dia, mantendo-se por 6 dias, com pico máximo inidicando o tempo necessário para sua renaturação aparentemente máxima desta condição, mas não necessariamente a máxima possível ou completa, visto que como mostra a análise anterior (Figuras 8 e 9), parte da proteína parece ainda permanecer na forma oligomerizada ou aglomerada após a renaturação dos corpos de inclusão.

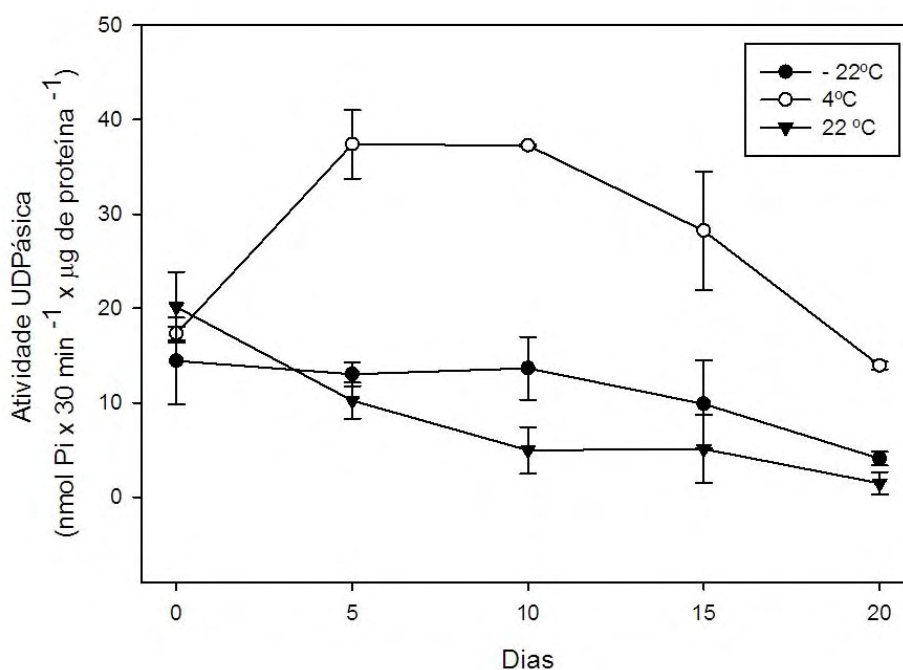


Figura 10: Estabilidade da TcNTPDase-1 renaturada a partir dos corpos de inclusão e mantida armazenada em diferentes temperaturas. A proteína dos corpos de inclusão, após ser desnaturada em 8M de uréia, foi vagarosamente adicionada gota a gota de tampão contendo 50mM de Tris pH 8,0 e 0,5M de NaCl para renaturação. Depois disso, cada uma de três amostras foi armazenada nas três diferentes temperaturas. Antes de cada atividade, todas as amostras eram mantidas no gelo por 5 minutos. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

5.5. Ensaio de atividade nucleotídica na presença de análogos de adenina como possíveis inibidores da TcNTPDase-1

Este trabalho faz parte da equipe do IBENQMeDI (Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças Infecciosas), INCT coordenado pelo Dr. Glaucius Oliva com sede principal no Instituto de Física de São Carlos, que tem como prioridade o desenvolvimento de drogas para serem usadas como quimioterápicos em doenças infecciosas. Como parte desta proposta, iniciamos ensaios de inibição com análogos sintéticos de adenina, como possíveis inibidores da NTPDase-1. Isso é interessante, pois a adenina faz parte de nucleotídeos aos quais a TcNTPDase-1 é capaz de hidrolizar, o ATP e ADP (Santos et al., 2009), portanto análogos de adenina podem atuar como inibidores da enzima. Antes do teste de inibição da atividade nucleotídica em si, foi preciso avaliar se o DMSO, solvente presente na ressuspensão dos compostos, poderia interferir nos ensaios. A figura 11 mostra a atividade ATPásica relativa da TcNTPDase-1 na presença de crescentes concentrações de DMSO. Foram feitas curvas padrão para todas as concentrações de DMSO utilizadas, e nenhuma interferência foi observada no método. Com isso, concluímos que o DMSO, apesar de não interferir de forma concentração-dependente, foi capaz de ativar a enzima, como já observado para a atividade ATPásica *in vivo* do *T. cruzi* (Fietto et al., 2004).

As biomoléculas em geral encontram-se estabilizadas por solvatação e, durante a catálise enzimática, a água é expulsa do sítio ativo, levando a formação de um bolso hidrofóbico onde ocorrerá a reação com o substrato (Nelson & Cox, 2006). Estudos da estrutura de uma NTPDase mostram que, durante o estado de transição, as cargas negativas que se desenvolvem pelo ataque nucleofílico de uma molécula de água são estabilizadas por complexação do cátion metálico divalente (cofator) e por uma série de pontes de hidrogênio formadas a partir dos radicais aminoacídicos (Zebisch et al., 2008). O DMSO possui um grande poder de solvatação, além de ser muito higroscópico, formando complexos com moléculas de água (Fuchs et al., 1962). Pode ser que isso favoreça o estado de transição, potencializando a atividade da enzima.

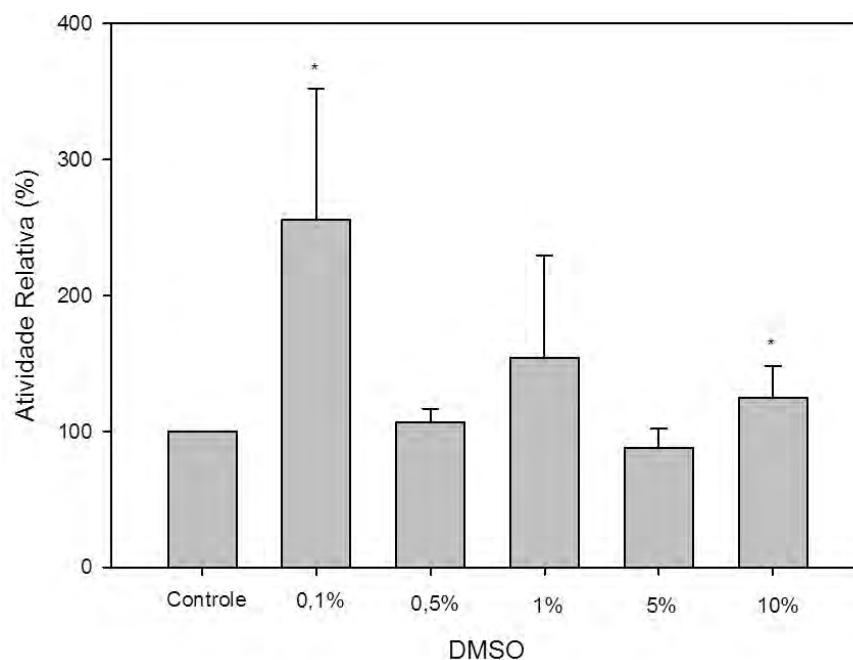


Figura 11: Ensaio de atividade ATPásica na presença de DMSO. O ensaio de atividade foi realizado de acordo com matérias e métodos. Foram utilizadas três amostras diferentes, e cada ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados apresentados representam no mínimo quatro ensaios e estão representados como atividade relativa em comparação com cada controle de cada experimento. (*= $p < 0,05$).

Para os ensaios de inibição foram utilizados 11 compostos, entre eles a adenina (comercial), 7 análogos sintéticos da adenina e 3 intermediários de síntese (figuras 12 e 13). Os ensaios com os análogos foram realizados em microplacas de 96 poços. Para cada ensaio havia um controle de atividade, contendo somente os constituintes usuais do tampão e nucleotídeo (não mostrado), e um controle da atividade na presença de DMSO, na mesma concentração presente na reação com os análogos (reação controle). Duas condições foram testadas para avaliar o tipo de inibição exercida. Na primeira condição foram utilizadas as mesmas concentrações para substrato e análogos (figura 14). Na segunda condição foi utilizada uma concentração 25x maior de substrato (figura 15). Foi observada inibição somente na primeira condição, o que nos leva a concluir que provavelmente o efeito inibidor consiste de uma

inibição competitiva, como é esperado. O composto APBen inibiu completamente a atividade da enzima, e o composto APBenBr e a Adenina inibiram 93% e 73% respectivamente. Os dados de inibição competitiva ainda são preliminares e necessitam de confirmação, mas a princípio são bastante promissores.

Alguns fatores, porém, devem ser considerados quando analisados os valores de atividade enzimática. A dosagem de proteína é indireta, e não necessariamente corresponde a realidade, portanto, o valor considerado para os ensaios inclui proteínas contaminantes, visto que a proteína foi semi-purificada, e também proteínas mal dobradas não ativas podem influenciar o resultado, visto que a preparação de proteína utilizada é proveniente de corpos de inclusão, e sofreu desnaturação e renaturação durante o processo de semi-purificação. Como foi mostrado nas figuras 8 e 9, a mostra não é em si totalmente homogênea, havendo aparentemente o monômero ativo e também oligômeros ou aglomerados inativos. Seria então interessante avaliar os mesmos inibidores sobre somente os monômeros isolados.

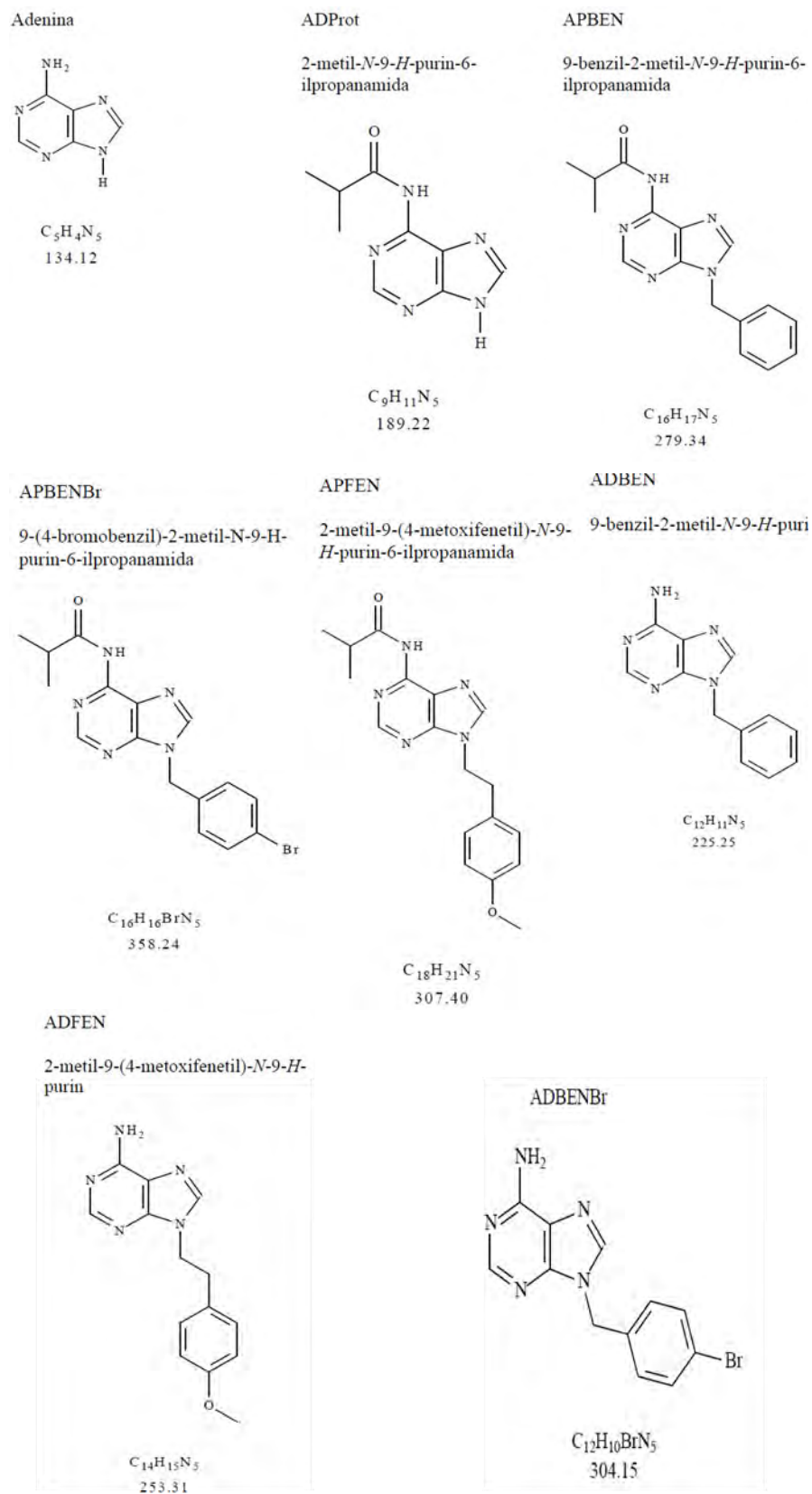


Figura 12: Estrutura dos análogos de adenina. Os análogos foram sintetizados e gentilmente cedidos pelo grupo da Dra. Arlene Gonçalves Correa.

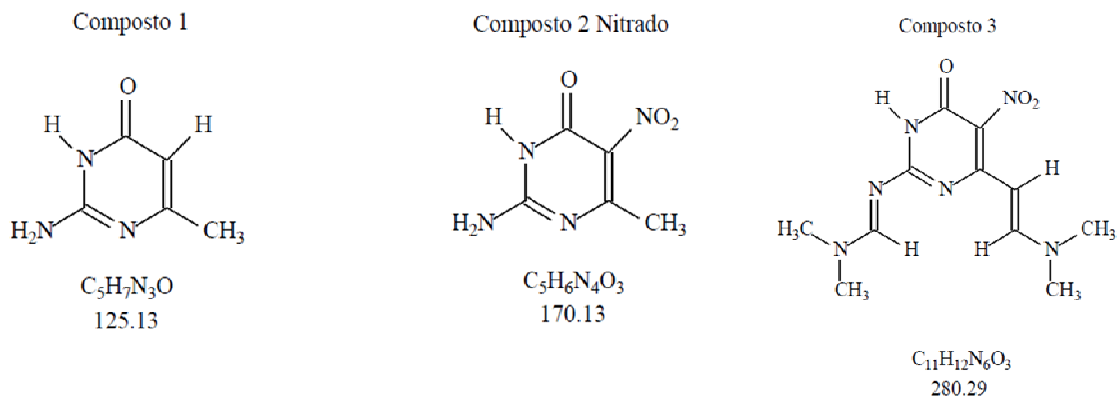


Figura 13: Estrutura dos compostos intermediários de síntese dos análogos de adenina.

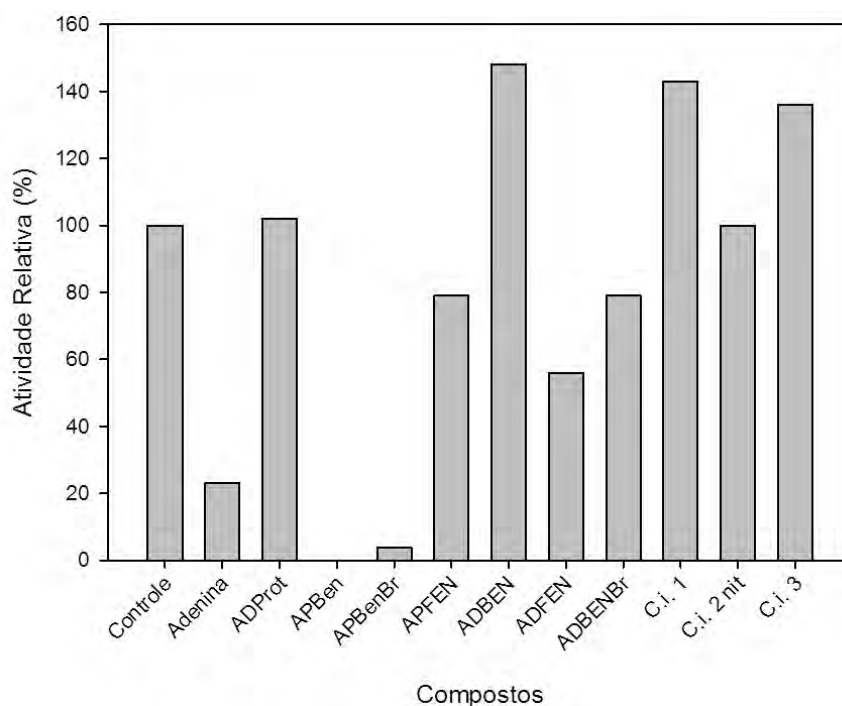


Figura 14: Ensaio de inibição da atividade nucleotídica sobre ATP da TcNTPDase-1, em concentração igual de inibidor e substrato. A determinação da atividade enzimática foi realizada pela medida da hidrólise de $[\gamma^{32}P]ATP$, por ser um método mais sensível. Foi utilizado $100 \mu M$ de $[\gamma^{32}P]ATP$ e $100 \mu M$ de cada um dos compostos. Cada reação continha somente um composto. O controle continha 1% DMSO, mesma concentração presente nas outras reações.

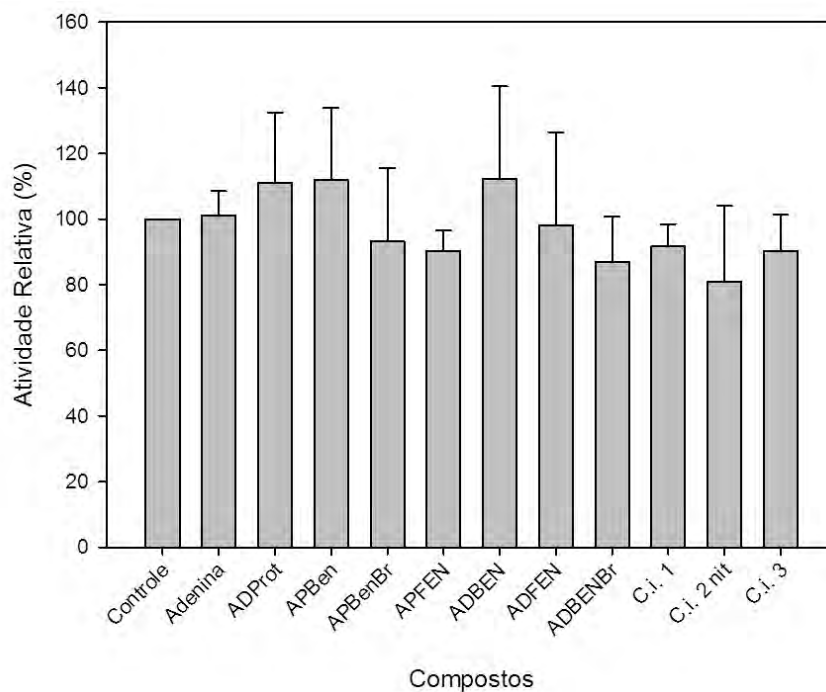


Figura 15: Ensaio de inibição da TcNTPDase-1 em alta concentração de substrato e baixa concentração dos possíveis inibidores. A determinação da atividade enzimática foi realizada pela medida da hidrólise de UDP por verde malaquita. Foi utilizado 2,5 mM de UDP e 100 μ M de cada um dos compostos. Cada reação continha somente um composto. O controle continha 1% DMSO, mesma concentração presente nas outras reações. Os ensaios foram feitos em triplicata.

5.6. Produção de anticorpos policlonais anti-NTPDase-1

Os anticorpos foram produzidos conforme descrito nos materiais e métodos. O Dot Blotting mostrou que a produção de anticorpos reconheceu de forma satisfatória a proteína de *T. cruzi*, com título de 1:160.000 (figura 16). Outros ensaios ainda serão realizados para verificar se o anticorpo produzido é capaz de reconhecer outras NTPDases.

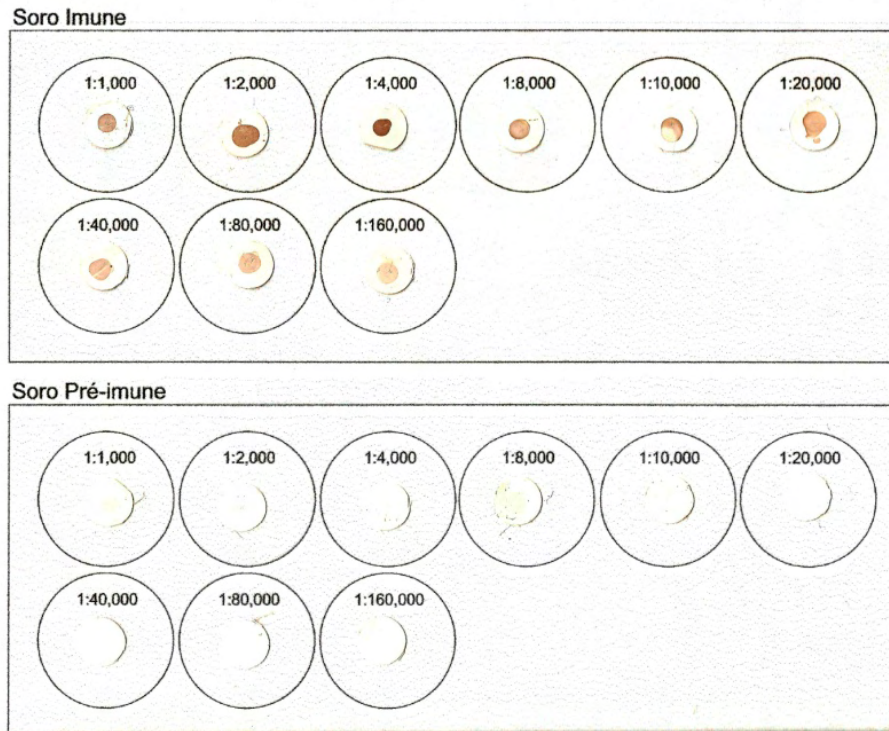


Figura 16: Dot Blotting do soro policlonal produzido em coelho. Foram realizadas três imunizações, intradérmicas, com 200µg/500µL de proteína, com intervalos de 21 e 15 dias, respectivamente. O soro imune (figura superior) foi coletado no sétimo dia após a terceira imunização. O soro pré-imune (figura inferior), coletado antes da primeira imunização, foi utilizado como controle.

6. Conclusões e Perspectivas

Como conclusões temos que:

- A sNTPDase-1 recombinante nativa não expõe a cauda hexa-his;
- O Bradford foi o método mais indicado para a dosagem de proteínas totais;
- A temperatura de armazenamento influencia na atividade nucleotidásica da proteína semi-purificada, ao longo do tempo;
- O soro policlonal anti-sNTPDase-1 é capaz de reconhecer a proteína em uma diluição de até 1:160.000;
- A proteína está presente no purificado, em diferentes estados de oligomerização.
- A proteína oligomerizada não é ativa;
- O DMSO pode potencializar a atividade nucleotidásica da NTPDase-1
- A NTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi* pode ser inibida por adenosina e análogos, e que essa inibição parece ser do tipo competitiva

O nosso laboratório adquiriu recentemente um aparelho FPLC para otimizar a purificação de proteínas. Padronizações das diferentes cromatografias disponíveis estão em andamento. Na intenção de padronizar a purificação da sNTPDase-1 de fração solúvel por cromatografia de afinidade, foram desenhados primers para a clonagem da NTPDase-1 solúvel em pET 16b, que apresenta fusão N-terminal de uma cauda de hexahistidina, com sítio de clivagem por fator Xa. Com a proteína pura, iremos realizar sua cristalização em diferentes situações como, presença de análogos não hidrolisáveis, inibidores, co-fator e etc., de forma a conhecer melhor a estrutura da proteína e onde e como ela interage com essas moléculas. Com esse conhecimento em mãos poderemos avançar no desenho racional de drogas. Ao mesmo tempo, realizamos a busca por inibidores de apirase. Iremos avaliar o efeito dos melhores candidatos a inibidores sobre o parasito, na infecção *in vitro* e na infecção em camundongos, visando selecionar novos alvos para teste na quimioterapia da Doença de Chagas.

Existem diversos relatos na literatura da participação das NTPDases na virulência, infecção, ou mesmo evasão de parasitos (Silverman *et al.*, 1998;

Sansom *et al.*, 2007). Pretendemos determinar em que fase da infecção a NTPDase-1 atua, se na adesão, invasão da célula, proliferação ou saída do vacúolo parasitóforo. Para isso utilizaremos anticorpos monoclonais (em fase de produção pelo nosso grupo) e/ou inibidores específicos.

Os tripanosomatídeos em geral, com exceção de *T. cruzi* apresentam pelo menos duas apirases em seu genoma. Em um trabalho ainda não publicado do nosso grupo, um anticorpo anti-CD39 reconheceu em extrato de epimastigotas, uma proteína de peso molecular diferente da NTPDase-1. Por estes motivos, acreditamos que *T. cruzi* possa ter também, outra apirase em seu genoma. Para confirmar essa hipótese, pretendemos utilizar os anticorpos policlonais produzidos para realizar ensaios de imunoprecipitação, entre outros, na tentativa de encontrar essa proteína, ou outras proteínas que interajam com a NTPDase-1.

7. Referências Bibliográficas

Abbracchio, M. P. e G. Burnstock. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol*, v.78, n.2, Oct, p.113-45. 1998.

Abbracchio, M. P. e S. Ceruti. P1 receptors and cytokine secretion. *Purinergic Signal*, v.3, n.1-2, Mar, p.13-25. 2007.

Amato Neto, V. e J. Pasternak. [Chagas disease centenary]. *Rev Saude Publica*, v.43, n.2, Apr, p.381-2. 2009.

Andrade, Z. A. Immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.94 Supl 1, p.71-80. 1999.

Areas, A. P., M. L. Oliveira, C. R. Ramos, M. E. Sbrogio-Almeida, I. Raw e P. L. Ho. Synthesis of cholera toxin B subunit gene: cloning and expression of a functional 6XHis-tagged protein in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, v.25, n.3, Aug, p.481-7. 2002.

Atkinson, B., K. Dwyer, K. Enjyoji e S. C. Robson. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. *Blood Cells Mol Dis*, v.36, n.2, Mar-Apr, p.217-22. 2006.

Benchimol-Barbosa, P. R. Further comments on oral transmission of Chagas' disease in Brazil: Epidemiology, geographical distribution and viability of the infective parasite. *Int J Cardiol*, Jan 8. 2009.

Bours, M. J., E. L. Swennen, F. Di Virgilio, B. N. Cronstein e P. C. Dagnelie. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther*, v.112, n.2, Nov, p.358-404. 2006.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

Braun, N., S. Fengler, C. Ebeling, J. Servos e H. Zimmermann. Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. *Biochem J*, v.351 Pt 3, Nov 1, p.639-47. 2000.

Burleigh, B. A. e N. W. Andrews. A 120-kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca²⁺-signaling factor for mammalian cells. *J Biol Chem*, v.270, n.10, Mar 10, p.5172-80. 1995a.

Burleigh, B. A. e N. W. Andrews. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu Rev Microbiol*, v.49, p.175-200. 1995b.

- Burleigh, B. A. e N. W. Andrews. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Microbiol*, v.1, n.4, Aug, p.461-5. 1998.
- Burnstock, G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev*, v.24, n.3, Sep, p.509-81. 1972.
- Burnstock, G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev*, v.58, n.1, Mar, p.58-86. 2006.
- Chagas, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.1, n.2, p.60. 1909.
- Cohn, C. S. e M. Gottlieb. The acquisition of purines by trypanosomatids. *Parasitol Today*, v.13, n.6, Jun, p.231-5. 1997.
- Coura, J. R. [Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease]. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.39 Suppl 3, p.113-7. 2006.
- De Almeida Marques-Da-Silva, E., J. C. De Oliveira, A. B. Figueiredo, D. De Souza Lima Junior, C. M. Carneiro, J. L. Rangel Fietto e L. C. Crocco Afonso. Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. *Microbes Infect*, v.10, n.8, Jul, p.850-7. 2008.
- De Souza, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int Rev Cytol*, v.86, p.197-283. 1984.
- De Souza, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des*, v.8, n.4, p.269-85. 2002.
- Docampo, R. e S. N. Moreno. The role of Ca²⁺ in the process of cell invasion by intracellular parasites. *Parasitol Today*, v.12, n.2, Feb, p.61-5. 1996.
- Dombrowski, K. E., Y. Ke, K. A. Brewer e J. A. Kapp. Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function. *Immunol Rev*, v.161, Feb, p.111-8. 1998.
- Fietto, J. L., R. Demarco, I. P. Nascimento, I. M. Castro, T. M. Carvalho, W. De Souza, M. T. Bahia, M. J. Alves e S. Verjovski-Almeida. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun*, v.316, n.2, Apr 2, p.454-60. 2004.
- Fuchs, R., G. E. Mccrary e J. J. Bloomfield. Mechanisms of Nucleophilic Displacement in Aqueous Dimethyl Sulfoxide Solutions. *J. Am. Chem. Soc*, v.83, n.20, October 1, p.4. 1962.
- Guedes, P. M., J. A. Urbina, M. De Lana, L. C. Afonso, V. M. Veloso, W. L. Tafuri, G. L. Machado-Coelho, E. Chiari e M. T. Bahia. Activity of the new

triazole derivative albaconazole against Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi in dog hosts. *Antimicrob Agents Chemother*, v.48, n.11, Nov, p.4286-92. 2004.

Handa, M. e G. Guidotti. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun*, v.218, n.3, Jan 26, p.916-23. 1996.

Herbert Zimmermann. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Development Research*, v.52, n.1-2, p.44-56. 2001.

Kaczmarek, E., K. Koziak, J. Seigny, J. B. Siegel, J. Anrather, A. R. Beaudoin, F. H. Bach e S. C. Robson. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. *J Biol Chem*, v.271, n.51, Dec 20, p.33116-22. 1996.

Kegel, B., N. Braun, P. Heine, C. R. Maliszewski e H. Zimmermann. An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacology*, v.36, n.9, Sep, p.1189-200. 1997.

Lemos, A. P., C. E. Peres-Sampaio, H. Guimaraes-Motta, J. L. Silva e J. R. Meyer-Fernandes. Effects of naturally occurring polyols and urea on mitochondrial F0F1ATPase. *Z Naturforsch C*, v.55, n.5-6, May-Jun, p.392-8. 2000.

Maioli, T. U., E. Takane, R. M. Arantes, J. L. Fietto e L. C. Afonso. Immune response induced by New World Leishmania species in C57BL/6 mice. *Parasitol Res*, v.94, n.3, Oct, p.207-12. 2004.

Moreno, S. N., J. Silva, A. E. Vercesi e R. Docampo. Cytosolic-free calcium elevation in Trypanosoma cruzi is required for cell invasion. *J Exp Med*, v.180, n.4, Oct 1, p.1535-40. 1994.

Pinsky, D. J., M. J. Broekman, J. J. Peschon, K. L. Stocking, T. Fujita, R. Ramasamy, E. S. Connolly, Jr., J. Huang, S. Kiss, Y. Zhang, T. F. Choudhri, R. A. Mctaggart, H. Liao, J. H. Drosopoulos, V. L. Price, A. J. Marcus e C. R. Maliszewski. Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. *J Clin Invest*, v.109, n.8, Apr, p.1031-40. 2002.

Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*, v.1, n.2, Sep, p.92-100. 2001.

Ralevic, V. e G. Burnstock. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*, v.50, n.3, Sep, p.413-92. 1998.

Rassi, A., Jr., A. Rassi e J. A. Marin-Neto. Chagas disease. *Lancet*, v.375, n.9723, Apr 17, p.1388-402. 2010.

Sambrook, J., E. F. Fritsch e T. Maniatis. *Molecular cloning. A laboratory manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989

Sanchez, R., A. Franco, M. Gacto, V. Notario e J. Cansado. Characterization of *gdp1+* as encoding a GDPase in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol Lett*, v.228, n.1, Nov 7, p.33-8. 2003.

Sansom, F. M., H. J. Newton, S. Crikis, N. P. Cianciotto, P. J. Cowan, A. J. D'apice e E. L. Hartland. A bacterial ecto-triphosphate diphosphohydrolase similar to human CD39 is essential for intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol*, v.9, n.8, Aug, p.1922-35. 2007.

Sansom, F. M., S. C. Robson e E. L. Hartland. Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions. *Microbiol Mol Biol Rev*, v.72, n.4, Dec, p.765-81, Table of Contents. 2008.

Santos, R. F., M. A. Possa, M. S. Bastos, P. M. Guedes, M. R. Almeida, R. Demarco, S. Verjovski-Almeida, M. T. Bahia e J. L. Fietto. Influence of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase Activity on *Trypanosoma cruzi* Infectivity and Virulence. *PLoS Negl Trop Dis*, v.3, n.3, p.e387. 2009.

Schicker, K., S. Huszl, G. K. Chandaka, K. Kosenburger, J. W. Yang, M. Waldhoer, H. H. Sitte e S. Boehm. A membrane network of receptors and enzymes for adenine nucleotides and nucleosides. *Biochim Biophys Acta*, v.1793, n.2, Feb, p.325-34. 2009.

Schofield, C. J., J. Jannin e R. Salvatella. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol*, v.22, n.12, Dec, p.583-8. 2006.

Schulte Am Esch, J., 2nd, J. Sevigny, E. Kaczmarek, J. B. Siegel, M. Imai, K. Koziak, A. R. Beaudoin e S. C. Robson. Structural elements and limited proteolysis of CD39 influence ATP diphosphohydrolase activity. *Biochemistry*, v.38, n.8, Feb 23, p.2248-58. 1999.

Silverman, J. A., H. Qi, A. Riehl, C. Beckers, V. Nakaar e K. A. Joiner. Induced activation of the *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase leads to depletion of host cell ATP levels and rapid exit of intracellular parasites from infected cells. *J Biol Chem*, v.273, n.20, May 15, p.12352-9. 1998.

Stanchev, D., M. Blosa, D. Milius, Z. Gerevich, P. Rubini, G. Schmalzing, K. Eschrich, M. Schaefer, K. Wirkner e P. Illes. Cross-inhibition between native and recombinant TRPV1 and P2X(3) receptors. *Pain*, v.143, n.1-2, May, p.26-36. 2009.

Tafuri, W. L. [Pathogenesis of Chagas' disease]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v.29, n.4, Jul-Aug, p.194-9. 1987.

Tardieux, I., M. H. Nathanson e N. W. Andrews. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca²⁺ transients. *J Exp Med*, v.179, n.3, Mar 1, p.1017-22. 1994.

Taussky, H. H. e E. Shorr. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J Biol Chem*, v.202, n.2, Jun, p.675-85. 1953.

Tyler, K. M. e D. M. Engman. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol*, v.31, n.5-6, May 1, p.472-81. 2001.

Vasconcelos, E. G., S. T. Ferreira, T. M. Carvalho, W. Souza, A. M. Kettlun, M. Mancilla, M. A. Valenzuela e S. Verjovski-Almeida. Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. Immunological cross-reactivities with potato apyrase and *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. *J Biol Chem*, v.271, n.36, Sep 6, p.22139-45. 1996.

Who. Chagas disease: control and elimination. *Sixty-third world health assembly*, April 22. 2010.

Who/Trs. Control of Chagas Disease. *Report of a WHO Expert Committee*. 2009.

Zebisch, M. e N. Strater. Structural insight into signal conversion and inactivation by NTPDase2 in purinergic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.105, n.19, May 13, p.6882-7. 2008.

Zimmermann, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, v.362, n.4-5, Nov, p.299-309. 2000.