

MYRIAN AUGUSTA ARAUJO NEVES DO VALLE

PRODUÇÃO DE HIBRIDOMAS E CLONES PRODUTORES DE ANTICORPOS  
MONOCLONAIS ANTI - NUCLEOSÍDEO TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASE -  
1(NTPDase-1) RECOMBINANTE 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

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

V181p  
2010

Valle, Myrian Augusta Araujo Neves do, 1981-  
Produção de hibridomas e clones produtores de anticorpos  
monoclonais anti - nucleosídeo trifosfato  
difosfolidrolase - 1 (NTPDase-1) recombinante de  
*Trypanosoma cruzi* / Myrian Augusta Araujo Neves do  
Valle. - Viçosa, MG, 2010.  
xxiv, 77f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexo.

Inclui apêndices.

Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. [63]-70

1. Anticorpos monoclonais. 2. *Trypanosoma cruzi*.
  3. Imunologia. 4. Protozoário. 5. Teste imunoenzimático.
- I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 572.8

MYRIAN AUGUSTA ARAUJO NEVES DO VALLE

PRODUÇÃO DE HIBRIDOMAS E CLONES PRODUTORES DE ANTICORPOS  
MONOCLONAIS ANTI - NUCLEOSÍDEO TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASE  
- 1(NTPDase-1) RECOMBINANTE de *TRYPANOSOMA CRUZI*

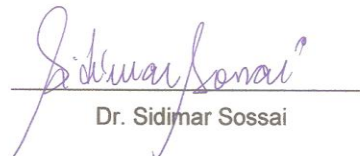
Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Biologia  
Celular e Estrutural, para  
obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

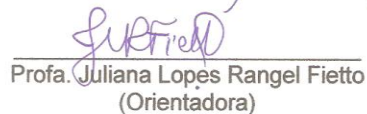
APROVADA: 02 de setembro de 2010.

  
Prof. Abelardo Silva Junior

  
Prof. Luciano Gomes Fietto

  
Prof. Rodrigo Siqueira Batista

  
Dr. Sidimar Sossai

  
Profa. Juliana Lopes Rangel Fietto  
(Orientadora)

*Ao Juliano (in memória),*

*Aos meus pais, Catarina e Affonso  
e meus irmãos Luiz Thobias e Ismael, por todo amor!*

*O Anjo Mais Velho*  
*(O Teatro Mágico)*

"O dia mente a cor da noite  
E o diamante a cor dos olhos  
Os olhos mentem dia e noite a dor da gente"  
Enquanto houver você do outro lado  
Aqui do outro eu consigo me orientar  
A cena repete a cena se inverte  
enchendo a minha alma daquilo que outrora eu deixei de acreditar  
tua palavra, tua história  
tua verdade fazendo escola  
e tua ausência fazendo silêncio em todo lugar  
metade de mim  
agora é assim  
de um lado a poesia o verbo a saudade  
do outro a luta, a força e a coragem pra chegar no fim  
e o fim é belo incerto... depende de como você vê  
o novo, o credo, a fé que você deposita em você e só  
Só enquanto eu respirar  
Vou me lembrar de você  
Só enquanto eu respirar...  
Só enquanto eu respirar...

## AGRADECIMENTOS

Quero tornar público meu reconhecimento e agradecimento a todas as pessoas que conviveram comigo nessa etapa da minha vida e fizeram diferença contribuindo para realização desse trabalho.

Agradeço a Deus e a tudo que eu acredito existir entre o “céu e a terra”.

A minha orientadora, Professora **Dr<sup>a</sup> Juliana Lopes Rangel Fietto**, pela oportunidade, apoio, confiança, pelos ensinamentos, por toda compreensão e exemplo de profissional tão distinta, sempre muito ética e competente, são difíceis as palavras para agradecê-la.

Ao Professor **Dr. Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo**, por sua amizade, pelos ensinamentos que ajudaram no meu crescimento pessoal e profissional e por estar sempre disposto a me ajudar, e permitir o desenvolvimento de parte desse trabalho no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozóarios. Tenho muito respeito e admiração pelo senhor!

Ao Professor **Dr. Leandro Licursi de Oliveira**, pelos ensinamento, por me incentivar com seu exemplo de profissional e ser essa pessoa maravilhosa, sempre disposto a me ajudar sem medir esforços, obrigada por tudo!

A minha co-orientadora, professora **Dr<sup>a</sup> Márcia Rogéria Almeida** e ao Professor **Dr. Abelardo Silva Júnior** pela cooperação e por ter aberto as portas do Laboratório de Infectologia Molecular Animal.

À **Universidade Federal de Viçosa**. Ao **programa de Biologia Celular e Estrutural** de forma carinhosa a secretária **Beth**.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (**FAPEMIG**) pela concessão do financiamento que possibilitou também a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao **Juliano (in memória)** motivo maior que me trouxe até aqui, por todo seu apoio e incentivo para que eu fizesse essa pós-graduação, mas sem ele tive que ter forças para terminar.

Ao meu **pai**, meu exemplo de vida, fé, humildade e amor, obrigada pelas orações fundamentais para meu equilíbrio, pela força, pelas palavras

encorajadoras, por acreditar que sou capaz e por todo carinho, amor e proteção.

A minha **mãe** (amiga e irmã), sempre tão compreensiva e sabia, obrigada por me apoiar em todas as decisões, pelos valiosos conselhos e sua experiência de vida, e por me passar sempre seus princípios e valores, além do seu amor incondicional.

Aos meus irmãos **Luiz Thobias e Ismael**, obrigada pelo amor, carinho, momentos de descontração, pela alegria e paz que vive a vida, amo muito vocês!

A **Sandra Letícia**, minha cunhada querida, irmã de coração, agradeço por fazer parte da minha família, por sua atenção, carinho e amizade.

E a toda minha **família** em especial minha prima Luciene.

A **Fernandinha Cardoso**, pela disponibilidade e boa vontade em me ensinar os primeiros passos no laboratório, sou muito grata a você.

Aos Amigos do Laboratório de Infectologia Molecular Animal, **Isadora, Yasmim Vanessa, Josi, Bruno, Mariana, Luciana, Xênia, Tonieli, Fernanda Miquelito, Ethel, Larissa, Antônio, Thales, Lucas, Francisney Ramon, Ronny, Yaro, Rafael, Pedro, Christiane e Raphael** e de forma especial ao **Rodrigo**, pelas incalculáveis vezes que me ajudou e tornou esse trabalho mais fácil. A **Luana e Felipe** por serem receptivos e me acolherem, e também ao **Matheus**, por me ceder gentilmente a NTPDase-1 de *Leishmania infantum chagasi*. Trabalhar com vocês foi uma experiência incrível, acreditem! Ao **Sr Valdir**, obrigada por deixar nosso ambiente de trabalho sempre organizado, por sua amizade e carinho, sempre pronto a me ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários, **Elisângela, Sidmar e Cíntia**, ao **Karlos** pelas dicas e por me passar um pouco de sua experiência com anticorpos monoclonais. Ao **Marcinho**, pessoa a quem eu sempre recorri na hora do aperto e sempre tinha a solução, obrigada por todo auxílio, por sua experiência e por me ajudar.

A todos os amigos e funcionários do BIOAGRO!

Aos **animais experimentais**, sem os quais seria impossível a realização desse trabalho. Todo meu respeito.

À querida amiga **Emília** por me acolher em Viçosa e em sua casa e por sua amizade desde a nossa infância. Foi mais confortante vir morar em viçosa sabendo que você estava aqui. Obrigada de coração amiga!

A **Aline** pela amizade, companheirismo e por estar ao meu lado n3s momentos mais dif3ceis e nos momentos de descontra33o, por me ouvir horas e horas, pelas risadas, almo3os, lanchinhos e caminhadas na reta. Valeu amiga!

A todas as **amigas** e **agregados** da **Rep3blica Scamanacho** e por onde passei, obrigada pelo conv3vio harm3nico que tivemos.

Aos **amigos das caronas** Vi3osa-Caratinga em especial a **Lorena**, amiga de v3rias viagens durante esse tempo e pra vida toda.

A **Nat3lia Filardi**, por sua amizade, respeito, carinho, cuidado e 3tima conviv3ncia nesses 3ltimos tempos. Foi muito bom e tran3ило dividir apartamento com voc3. Vivemos em paz e harmonia em momentos tensos das nossas vidas. "Aqui mora gente feliz"!

As amigas, **Caca, Cris, Fa, Livet, Michellinha, Line, Talinha, Valeska, Simone** e a querida amiga **Sabrinex!** Algumas distantes geograficamente, mas sempre perto em todos os momentos que precisei.

A todos os amigos que fiz em Vi3osa! E a todos os meus amigos da vida...

E finalmente, mas n3o por 3ltimo, a cidade de **Vi3osa**, apesar da minha forte resist3ncia foi imposs3vel n3o me encantar por essa cidade e me permitir viver coisas que n3o viveria em outra cidade.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	x
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xii
<b>SUMÁRIO</b> .....	vii
<b>RESUMO</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	5
2.1 Doença de chagas.....	6
2.2 Purinoreceptores.....	13
2.3 E-NTPDases.....	16
2.4 Diagnóstico.....	18
2.5 Tratamento.....	20
2.6 Anticorpos Monoclonais.....	22
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	29
3.1 Objetivo geral.....	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
4.1 Locais.....	32
4.2 Animais experimentais.....	32
4.3 Preparação de Células <i>Escherichia coli</i> Competentes.....	32
4.4 Extração de DNA plasmidial.....	33
4.5 Transformação das <i>Escherichia coli</i> .....	33
4.6 Indução da expressão da NTPDase-1 em BL21-DE3 de E. coli.....	34
4.7 Purificação da NTPDase-1 recombinante do <i>T. cruzi</i> e análise em SDS-PAGE.....	34
4.8 Imunização de camundongos.....	36
4.9 Sangria dos animais.....	36
4.10 Dot – ELISA.....	37
4.11 Cultivo de células de mieloma.....	38
4.12 Contagem celular.....	38
4.13 Coleta de linfócitos.....	39
4.14 Titulação do Soro.....	40

4.15 Fusão.....	40
4.16 Coleta do sobrenadante dos híbridomas.....	41
4.17 ELISA indireto para avaliação da produção de anticorpos no sobrenadante dos híbridomas.....	41
4.18 Preparo de macrófagos peritoneais.....	42
4.19 Clonagem dos híbridomas positivos por diluição limitante.....	43
4.20 ELISA-indireto para avaliação dos sobrenadantes dos clones..	44
4.21 Avaliação da especificidade dos anticorpos produzidos no sobrenadante dos clones isolados.....	44
4.22 Congelamento dos clones produtores de anticorpos monoclonais anti-NTPDase-1 de <i>T. cruzi</i> .....	45
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
5.1 Expressão e purificação da NTPDase-1 heteróloga de <i>T. Cruzi</i>	47
5.2 Imunização dos camundongos e titulação do soro hiperimune	48
5.3 Produção dos híbridomas.....	51
5.3.1 Cultivo das células de mieloma e produção dos híbridomas.....	51
5.4 Clonagem dos híbridomas positivos por diluição limitante.....	55
5.5 Avaliação da especificidade dos anticorpos produzidos pelos híbridomas produtores de anticorpos monoclonais anti-NTPDase-1 de <i>T. cruzi</i> .....	58
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>63</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>71</b>
<b>APÊNDICE 1.....</b>	<b>72</b>
<b>APÊNDICE 2.....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>77</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> .....	9
<b>Figura 2</b> - Formas morfológicas do <i>T. cruzi</i> .....	11
<b>Figura 3</b> - Topologia de membrana e propriedades catalíticas das diferentes famílias de ecto-nucleotidases.....	17
<b>Figura 4</b> - Estruturas químicas do Nifurtimox (1) e Benzonidazol (2).....	21
<b>Figura 5</b> - Desenho esquemático das vias de síntese de purinas e pirimidinas, via de novo e via de recuperação.....	24
<b>Figura 6</b> - Desenho esquemático da técnica para a produção de hibridomas e clones secretores de anticorpos.....	26
<b>Figura 7</b> - Cronograma das imunizações e coletas.....	37
<b>Figura 8</b> - Representação esquemática de uma câmara de Neubauer.....	39
<b>Figura 9</b> - Clonagem por diluição limitante.....	44
<b>Figura 10</b> - Purificação dos corpos de inclusão solubilizados contendo a proteína heteróloga E-NTPDase-1 de <i>T. cruzi</i> .....	47
<b>Figura 11</b> - NTPDase-1 de <i>T. cruzi</i> purificada em resina de níquel-agarose.....	48
<b>Figura 12</b> - DOT-ELISA do soro dos camundongos imunizados com a proteína NTPDase-1...50	50
<b>Figura 13</b> - Titulação do soro hiper-imune por DOT-ELISA.....	51
<b>Figura 14</b> - Células de mieloma.....	52
<b>Figura 15</b> – Hibridomas.....	53
<b>Figura 16</b> - Alinhamento entre as seqüências da NTPDase-1 de <i>T.cruzi</i> e NTPDase-1 de <i>L. infantum chagasi</i> (GDPase <i>L. infantum</i> ).....	60

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1** - Ensaio de ELISA indireto.....54

**Gráfico 2** - Relação de clones positivos e negativos para reconhecimento da NTPDase-1 recombinante de *T. cruzi*.....56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Subtipos de receptores P1e P2, ligantes fisiológicos e distribuição em células do sistema imune.....	15
<b>Tabela 2</b> - Porcentagem de hibridomas positivos e negativos utilizando a metodologia de ELISA indireto.....	53
<b>Tabela 3</b> - Método de clonagem por diluição.....	55
<b>Tabela 4</b> - Relação de clones isolados das diluições limitantes e nomenclatura universal de anticorpos monoclonais.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ac: Anticorpos  
ACRs: “Apyrase Conserved Regions”: Regiões Conservadas de Apyrase  
mAb: monoclonal antibody  
ATP: Adenosina 5’ Trifosfato  
ADP: Adenosina 5’ Difosfato  
AMP: Adenosina 5’ Monofosfato  
GDPase: “Guanosine Diphosphatase”  
µg: Microgramas  
µL: Microlitros  
BSA: Albumina do soro bovino  
BIOAGRO: Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária  
Cm<sup>2</sup>: Centímetros quadrados  
*Cut off*: Ponto de corte  
DMSO: Dimetil Sulfóxido  
DO: Densidade óptica  
EIA: *Enzyme immunoassay*  
ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*  
GDPase: “Guanosine Diphosphatase”  
*g*: Unidade de força centrífuga relativa  
HAT: Hipoxantina aminopteridina tiamidina  
HGPRT: Hipoxantina guanina fosforibosiltransferase  
HT: Hipoxantina Tiamidina  
Ig: Imunoglobulina  
IPTG: *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*  
LIMA: Laboratório de Infectologia Molecular Animal  
LBCHV: Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores  
UFV: Universidade Federal de Viçosa  
LB: Meio de cultura *Luria-Bertani broth*  
mL: Mililitros  
NTPDase: Nucleotídeo trifosfato difosfohidrolase  
O.P.D: o-fenildiaminobenzeno  
PEG: Polietilenoglicol  
PCR: Polymerase Chain Reaction

PBS: Tampão fosfato salino

q.s.p.: Quantidade suficiente para

RPMI: Roswell Park Memorial Institute-meio de cultura

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

SFB: Soro Fetal Bovino

SP2/0: Linhagem de células de mieloma

v:v: volume por volume

## RESUMO

VALLE, Myrian Augusta Araujo Neves do, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2010. **Produção de hibridomas e clones produtores de anticorpos monoclonais anti- Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase – 1 (NTPDase-1) recombinante de *Trypanosoma cruzi***. Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto. Co-orientadores: Márcia Rogéria de Almeida Lamego e Sérgio Oliveira de Paula.

O protozoário *Trypanosoma cruzi*, é o agente etiológico da doença de Chagas. As ecto-nucleotidases da família E-NTPDases são enzimas capazes de hidrolisar nucleotídeos tri e/ou difosfatados nos seus produtos monofosfatados. A NTPDase-1 de *T. cruzi* é uma proteína presente na superfície do mesmo, com possibilidade de também ser secretada para o meio extra-celular. Sua função ainda não é totalmente esclarecida, porém dados recentes sugerem fortemente sua participação na infectividade e virulência do parasito sendo considerada um bom alvo para bloqueio da infecção. Devido a dificuldade de diagnóstico na fase crônica, a morbidade causada pela doença e a deficiência do tratamento, é de extrema importância o desenvolvimento de novas e mais eficientes metodologias de diagnóstico e tratamento, sendo, neste caso os anticorpos monoclonais uma poderosa ferramenta. A proposta do presente trabalho foi a produção de anticorpos monoclonais que reconhecessem especificamente a NTPDase-1 de *T. cruzi* em detrimento da NTPDase-1 de *Leishmania infantum chagasi*. Para isso realizou-se a expressão heteróloga da NTPDase-1 em sistema bacteriano (*E.coli* BL-21) e sua purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel-agarose (Ni-NTA). Utilizou-se para as imunizações dos camundongos a proteína obtida, sendo a confirmação e titulação do soro hiperimune realizada por *dot*-ELISA. Linfócitos B dos camundongos imunizados foram fusionados com células de mieloma (SP2/0) para obtenção dos hibridomas, sendo 47,13% de hibridomas secretores de anticorpos anti-NTPDase-1 de *T. cruzi*, os hibridomas foram selecionados pelo método de ELISA indireto. Após a diluição limitante, 49 clones reconheceram a NTPDase-1 recombinante de *T. cruzi* o que representa aproximadamente 27% de clones positivos. Além disso 10 clones reconheceram também a NTPDase-1 de *Leishmania infantum chagasi*. Portanto, isolamos 39 clones que reconheceram especificamente somente a NTPDase-1 recombinante de *T.cruzi*.

## ABSTRACT

VALLE, Myrian Augusta Araujo Neves do, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2010. **Production of hybridomas and clones producing monoclonal anti nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (NTPDase-1) recombinant *Trypanosoma cruzi*.** Adviser: Juliana Lopes Rangel Fietto. Co-advisers: Marcia Rogéria Lamego de Almeida and Sérgio Oliveira De Paula.

The protozoan *Trypanosoma cruzi* is the etiologic agent of Chagas disease. The ecto-nucleotidases E-NTPDase family are enzymes that hydrolyze nucleotide tri- and / or diphosphate monophosphates in their products. The NTPDase-1 *T. cruzi* is a protein present on its surface, with the possibility of also being secreted into the extracellular milieu. Its function is still not completely understood, but recent data strongly suggest its involvement in virulence and infectivity of the parasite is considered a good target for blocking infection. Due to the difficulty of diagnosis in chronic phase, morbidity and disability caused by disease treatment, it is extremely important to developing new and more efficient methods of diagnosis and treatment, in which case the monoclonal antibodies a powerful tool. The purpose of this work was the production of monoclonal antibodies that specifically recognize the NTPDase-1 *T. detriment cruzi* NTPDase-1 *Leishmania infantum chagasi*. For assessing the expression of heterologous NTPDase-1 in bacterial system (*E. coli* BL-21) and its purification by affinity chromatography on nickel-agarose column (Ni-NTA). It was used for the immunization of mice to protein obtained, with the confirmation and titration of hyperimmune serum made by dot-ELISA. B lymphocytes from immunized mice were fused with myeloma cells (SP2 / 0) to obteção hybridoma, and 47.13% of hybridomas secreting anti-NTPDase-1 *T. cruzi*, the hybridoma were selected by ELISA methodo. After limiting dilution, 49 clones recognized the NTPDase-1 recombinant *T. cruzi* which represents approximately 27% of positive clones. In addition 10 clones also recognized the NTPDase-1 *Leishmania infantum chagasi*. Therefore, we isolated 39 clones that specifically recognized only the NTPDase-1 recombinant *T. cruzi*.

# *1 Introdução*

---

Em 1909, Carlos Chagas, pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), comunicou ao mundo científico a descoberta de uma nova doença humana. No ano anterior, Chagas já havia sido capaz de identificar seu agente causal - o protozoário que denominou de *Trypanosoma cruzi*, em homenagem a Oswaldo Cruz - e o inseto transmissor, conhecido como barbeiro (*Triatoma infestans*). A “tripla descoberta” de Chagas, considerada única na história da medicina, constitui um marco na história da ciência e da saúde brasileira.

O *T. cruzi* apresenta em sua superfície várias proteínas que atuam no processo de infecção das células hospedeiras, as E-NTPdases fazem parte desse conjunto de proteínas. Sendo as E-NTPdases uma sub-família de ectonucleotidases, também chamadas de proteínas da família CD39 ou apirases são proteínas transmembrânicas ou solúveis (excretadas) que têm capacidade de catalisar a hidrólise de nucleotídeos no espaço extracelular ou intracelular, dependendo do local de sua ecto-localização (LALIBERTE e BEAUDOIN, 1983). Foi demonstrada por FIETTO e colaboradores (2004) a existência de uma atividade de ecto-nucleotidase presente na superfície externa de diferentes formas do *T. cruzi*. O trabalho foi baseado na demonstração da maior capacidade ecto-ATPásica das formas infectivas (tripomastigotas) e em dados da literatura que correlacionam essa atividade de parasitos com a virulência, sugeriu-se que, também nesse parasito, a virulência e a infectividade poderiam estar relacionadas com uma maior atividade ecto-nucleotidásica.

Os anticorpos são, portanto, uma ferramenta de extrema importância para verificação do papel das NTPdases. Eles são moléculas de glicoproteínas pela qual o sistema imune reconhece antígenos. Anticorpos policlonais são uma mistura de anticorpos produzidos por vários clones de linfócitos B diferentes e têm sido usados como ferramentas importantes de investigação do papel de biomoléculas e processos celulares, como a infecção pelo *T. cruzi* (SANTOS et al., 2009), já os anticorpos monoclonais são produzidos por um único clone de célula B. A técnica de produção de anticorpos monoclonais *in vitro* descrita por KÖHLER e MILSTEIN em 1975 tem como base o fato de que cada linfócito B produz anticorpo de uma única especificidade (ABBAS et al., 2005). Hibridomas são as linhagens celulares produtoras de anticorpos e derivadas de células imortalizadas. Obtidas da fusão de linfócitos B com células de mieloma. A NTPDase-1 de *T. cruzi* já foi mostrada como um fator de

infectividade e virulência do parasito, respectivamente em modelo “*in vitro*” e em infecção experimental em camundongo. Assim a continuidade dos estudos com esta proteína é de grande interesse de nosso grupo de pesquisa, que vem investigando o papel desta proteína na infecção e buscando por novas drogas direcionadas para sua inibição enzimática. Em trabalhos anteriores (FIETTO et al., 2004; SANTOS et al., 2009) foi possível mostrar que a NTPDase-1 ou alguma proteína homóloga a ela é importante para a infecção *in vitro* e *in vivo* (camundongo). Porém a imunolocalização foi feita apenas com antisoro heterólogo policlonal anti-NTPDase de *T. gondii* (FIETTO et al., 2004) e a investigação do papel da NTPDase-1 na infecção *in vitro* foi feita com soro policlonal anti-NTPDase-1 do próprio *T. cruzi* produzido em coelho (SANTOS et al., 2009). Foi mostrado que este soro apesar de não inibir a atividade nucleotidásica da NTPDase-1 recombinante purificada consegue inibir em mais de 50% a infecção *in vitro*, evidenciando um provável papel duplo da NTPDase-1 na infecção. Sendo assim um papel dependente da hidrólise de nucleotídeos que foi mostrado ser inibido em 70% com a adição do inibidor de apirase, suramina e um segundo papel independente da hidrólise evidenciado pelo uso do antisoro policlonal. Para estudar de forma mais específica estes fenômenos pretende-se utilizar da ação de anticorpos monoclonais específicos para a NTPDase-1 e que sejam capazes de distinguir entre estes dois papéis específicos. Os anticorpos monoclonais anti-NTPDase-1 de *T. cruzi* que foram produzidos podem ser utilizados para aumentar a especificidade da detecção da proteína em imunoenaios de localização celular e na purificação da proteína recombinante, através de técnicas de cromatografia de afinidade. Além disto, serão usados como ferramentas extremamente específicas para avaliar a participação da NTPDase-1 no processo de infecção *in vitro*, contribuindo para a elucidação do seu modo de ação como molécula de virulência neste parasito. Neste caso temos como objetivos desse trabalho a seleção de anticorpos monoclonais específicos para reconhecimento da proteína de *T. cruzi*, bem como a seleção de monoclonais que reconhecem a NTPDase-1 de *T. cruzi* em detrimento da NTPDase-1 de *Leishmania infantum chagasi*. Futuramente esses monoclonais serão selecionados pela capacidade de inibir a atividade nucleotidásica da proteína recombinante e monoclonais que sejam capazes de inibir a infecção em células de mamífero sem alterar a atividade enzimática. Assim poderemos estudar especificamente estas

características da NTPDase-1 comprovando sua ação não somente como enzima com atividade nucleotídásica mas como proteína envolvida na adesão/internalização do parasito, já que mostramos recentemente que a inibição enzimática leva a diminuição parcial da infecção (~50%) e a ação de antisoro-policlonal anti-NTPDase-1, incapaz de inibir a atividade enzimática também leva a perda de cerca de 50% da capacidade de infecção *in vitro* (SANTOS .et al., 2009).

## *2 Revisão de Literatura*

---

## 2.1 Doença de chagas

A doença de chagas foi detectada em múmias andinas datando de 4000 a.c., começou a se expandir no final do século XIX, e atingiu seu pico na primeira metade do século XX (MONCAYO, 2003). Em 1909, Carlos Chagas, pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), comunicou ao mundo científico a descoberta de uma nova doença humana. No ano anterior, Chagas já havia sido capaz de identificar seu agente causal, o protozoário que denominou de *Trypanosoma cruzi*, em homenagem a Oswaldo Cruz, e o inseto transmissor, conhecido como barbeiro (CHAGAS, 1909). Na história da medicina essa foi a única “tripla descoberta” e constitui um marco na história da ciência e da saúde brasileira.

Apesar de descrita no início do século XX, pode-se considerar que a doença de Chagas é relativamente nova. Portanto, ainda não foi culturalmente incorporada de forma maciça pela população, e se não há uma cultura de enfermidade, em contrapartida não há cultura da saúde, e com mais de cem anos de descobrimento continua sendo um grave problema de saúde pública, mesmo com tantos esforços utilizados na redução de sua incidência (HUEB, 2006).

De acordo com os dados fornecidos pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2006), a doença de Chagas está distribuída em 18 países, situados em duas zonas ecológicas, o cone sul da América do Sul onde os insetos vetores vivem dentro das moradias humanas (ciclo doméstico), e no norte da América do Sul, América Central e México, onde os insetos vivem tanto dentro quanto fora dos domicílios (ciclos doméstico e silvestre).

A infecção causada pelo protozoário *T. cruzi* é transmitida por insetos hematófagos da subfamília Triatominae, sendo o *Triatoma infestans* considerado o principal vetor no Brasil. No ciclo de vida natural a transmissão se dá via vetor onde os parasitos na sua forma infectante (tripomastigotas metacíclicos) são liberados junto às excretas do inseto durante o repasto sanguíneo. A penetração dos parasitos ocorre através do contato com mucosas ou através de soluções de continuidade da pele, que podem ser produzidas pelo próprio indivíduo pela coceira no local da picada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

DIAS (2007), estima que haja cerca de 12 a 14 milhões de pessoas infectadas na América Latina e cerca de 100 milhões, 25% da população, sob risco de contrair a infecção. A epidemiologia da doença de Chagas no contexto da globalização e iniquidade vem crescendo devido às ocorrências de mudanças antrópicas, particularmente as migrações e invasão de ambientes naturais. Esta doença é prevalente em populações rurais, onde encontram-se milhares de insetos vetores em moradias de pau-a-pique. Houve notável esforço para se eliminar a transmissão domiciliar pelo *T. infestans*, sendo o Brasil considerado livre desta via de infecção pela Comissão Intergovernamental do Cone Sul no ano de 2006 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Entretanto, tal situação não considera importantes aspectos regionais. No nordeste brasileiro, por exemplo, há outras espécies de triatomíneos silvestres que se adaptam muito bem às moradias, atraídos pelas luzes das casas. DIAS-LIMA e SHERLOCK (2000), relataram as espécies mais observadas no Brasil, em primeiro lugar vem o *T. infestans*, principalmente nas regiões Oeste, Sul e Sudeste; em seguida, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma psedomaculata*, *Triatoma sordida*, *Panstrongylus megistus* e o *Panstrongylus lutzi*, na Região Nordeste. Especialmente na Bahia, onde também foram encontradas espécies de *Triatoma pessoai* e *Triatoma melanocephala*, e *Triatoma tibiamaculata*, que parece ser altamente susceptível à infecção pelo *T. cruzi*. Já na Amazônia encontra-se *Triatoma rubrofasciata*, única espécie domiciliada, mas que ainda não desenvolveu hábitos antropofílicos vivendo por enquanto em contato com morcegos e ratos (PRATA, 2001).

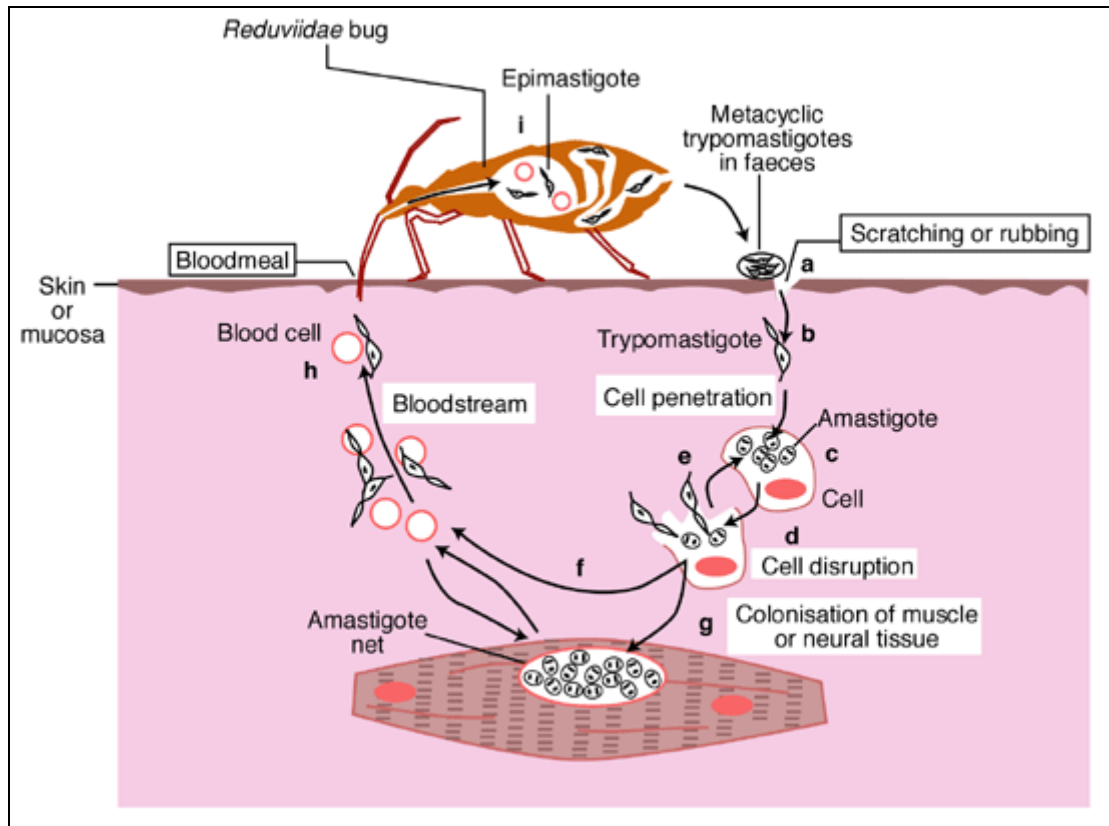
A doença de Chagas é uma enfermidade humana muito relacionada com subdesenvolvimento, o que torna mais crítica a situação de milhões de pacientes chagásicos (MONCAYO, 2003). Os dados mais recentes apontam que a doença de Chagas segue como problema de saúde pública, sobretudo nas grandes cidades para onde convergiram pessoas infectadas pelo parasito, sejam aquelas assintomáticas ou oligossintomáticas, em busca de trabalho ou doentes em busca de tratamento. A doença de Chagas é considerada a quarta causa de morte no Brasil entre as doenças infecto-parasitárias, sendo as faixas etárias acima de 45 anos as mais atingidas. Por isso, não se pode negligenciar a atenção à transmissão e cuidados com pessoas infectadas pelo parasito, estejam elas com manifestações clínicas ou não, mesmo que a transmissão

domiciliar pelo *T. infestans* tenha sido interrompida com sucesso. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Outras maneiras de se transmitir os parasitos são através da transfusão sanguínea, transmissão congênita, acidentes de laboratório, infecção oral e transplantes. Uma outra via teoricamente possível, mas extremamente rara é a transmissão sexual (CARLIER, 2003). A transfusão sanguínea tem um importante papel na transmissão da doença de Chagas, já que testes sorológicos em bancos de sangue de áreas onde a doença é endêmica mostram de 10 a 15% de positividade e, dessa porcentagem, cerca de 10% do sangue contêm parasitos infectivos (AUFDERHEIDE et al., 2004). Estas vias de transmissão não vetorial, tais como a transfusão de sangue, a transmissão congênita e o transplante de órgãos, descritas acima estão relacionadas também a globalização da doença de Chagas. COURA e VIÑAS (2010) destacam a ameaça representada pela recente disseminação do *T. cruzi* para diversas regiões do mundo, como América do Norte, Europa e oeste do Oceano Pacífico, onde não esteve presente até então. A expansão da doença torna-se possível devido ao fluxo de migração populacional e, segundo os autores, além de representar um risco para a saúde pública mundial, revela a urgência da intensificação dos esforços no sentido de ampliar a informação e a vigilância sobre a doença.

O ciclo de vida natural do *T. cruzi*, (Figura 1), ocorre em hospedeiros vertebrados e invertebrados. A multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado é realizada pela forma amastigota, que são formas ovóides, apresentando flagelo muito curto que não emerge para o meio extracelular e cinetoplasto localizado próximo ao núcleo. Os epimastigotas são formas alongadas ou fusiforme com flagelo emergente para o meio extracelular formando uma curta membrana ondulante, com o cinetoplasto localizado próximo e anterior a organela nuclear. Estes são encontrados no intestino médio e posterior dos hospedeiros invertebrados onde se multiplicam ativamente por fissão binária. As formas infectantes para os hospedeiros vertebrados são as tripomastigotas, as quais possuem flagelo que emerge da extremidade posterior e percorre todo o corpo celular do organismo, formando a membrana ondulante e cinetoplasto localizado posterior ao núcleo (DE SOUZA, 2002). As formas morfológicas amastigostas, epimastigotas e tripomastigotas interagem com células do hospedeiro vertebrado e apenas as

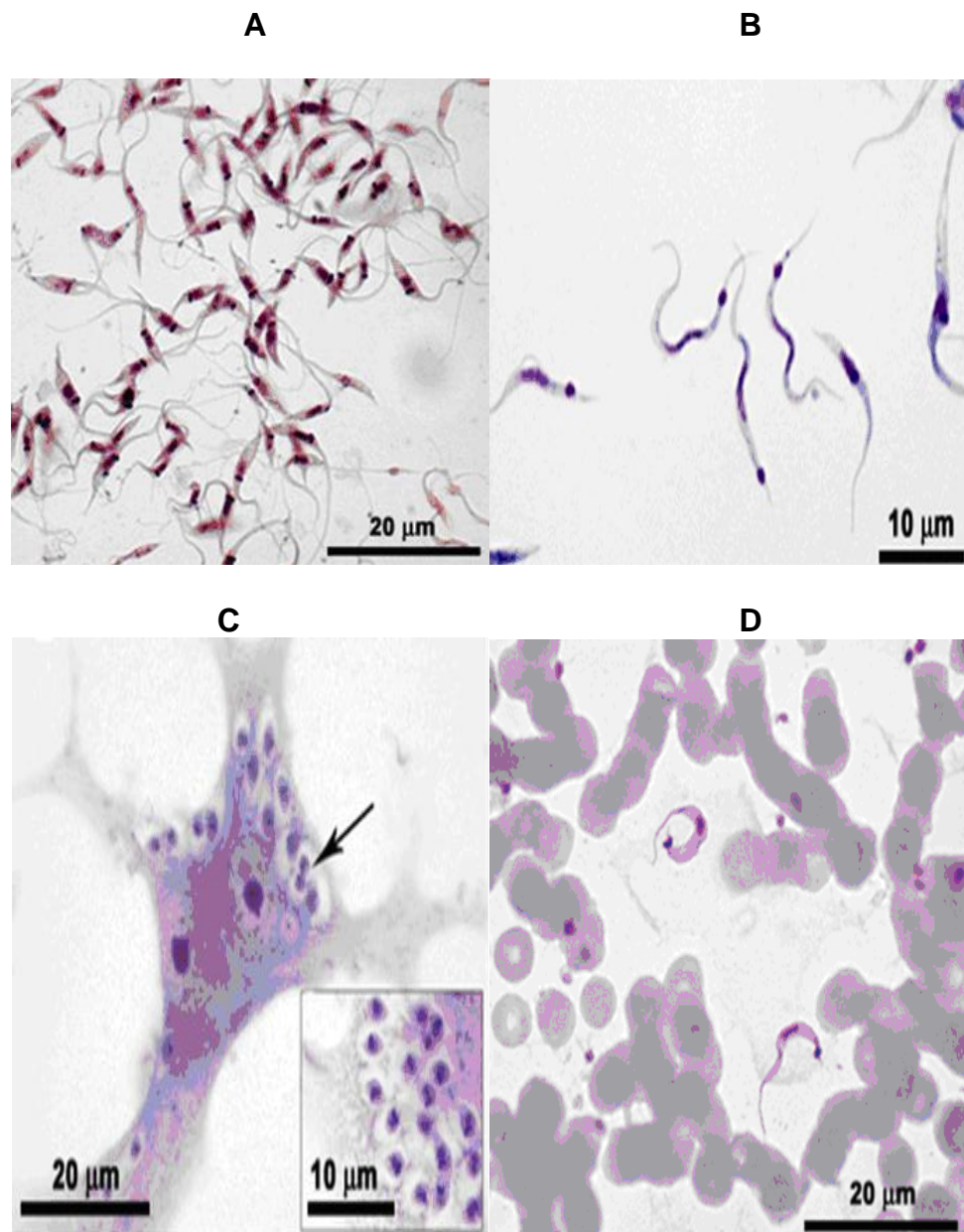
epimastigotas não são capazes de nelas se desenvolverem e multiplicar (Figura 2).



**Figura 1** - Ciclo de vida do *T. cruzi*. Os desenhos representam formas morfológicas vistas nos hospedeiros vertebrados e invertebrados. a) Lesão; b) Formas tripomastigotas; c) Formas amastigotas no interior da célula; d) Ruptura celular; e) Liberação dos tripomastigotas; f) Formas tripomastigotas sanguíneas; g) Colonização do tecido muscular ou tecido nervoso pelas formas infectantes tripomastigotas e amastigotas h) Tripomastigotas sugados pelo inseto; i) Formas epimastigotas no Trato digestivo do inseto (PRATA, 2001).

A doença de Chagas pode ser identificada em sua fase aguda ou crônica. A fase aguda pode ser sintomática ou assintomática. Sendo mais freqüente a forma assintomática. Quando sintomática pode apresentar manifestações locais resultantes da penetração do *T. cruzi* na conjuntiva (sinal de Romana) ou na pele (chagoma de inoculação). As manifestações gerais são febre, edema localizado e generalizado, poliadenia, hepatomegalia, esplenomegalia e, mais raramente, insuficiência cardíaca e meningoencefalite chagásica. A fase crônica também pode ser sintomática ou assintomática. Esta última, também conhecida como forma indeterminada (latente), ocorre após a fase aguda. Os indivíduos infectados sobrevivente, passam por um longo período assintomático (10 a 30 anos) e caracterizam-se por positividade nos exames sorológicos, ausência de sintomas ou sinais da doença,

eletrocardiograma normal, coração, esôfago e colón radiologicamente normais. Do ponto de vista imunológico esta forma parece estar relacionada com a presença constante de anticorpos líticos. Por sua vez, a fase crônica sintomática foi observada em muitos chagásicos que após permanecerem assintomáticos por vários anos, apresentaram sintomas relacionados ao sistema cardiocirculatório (forma cardíaca), digestivo (forma digestiva), ou ambos (forma cardiodigestiva ou mista). Isto ocorre devido a uma mudança na anatomia do miocárdio e do tubo digestivo, podendo ser observado intenso processo inflamatório com danos teciduais nem sempre relacionado com a presença do parasito que se encontra extremamente escasso nesta fase, mostrando o envolvimento do SNA (NEVES *et al.*, 2008). Além disso, observam-se, dentre outras alterações, acometimento do sistema nervoso, alterações neuropsicológicas nos enfermos. Verifica-se, portanto um envolvimento do SNC tanto na fase aguda, quanto na fase crônica (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2008).



**Figura 2** - Formas morfológicas do *Trypanosoma cruzi*. A- Forma tripomastigota metacíclico (derivada de metaciclogênese *in vitro*), B- Forma Epimastigota, C- amastigota, D- Forma tripomastigota anguineo. fonte: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=69>. Acessado em 22 de julho de 2010.

O processo inicial de interação do *T. cruzi* com a célula hospedeira pode ser estudado por etapas: (i) adesão e reconhecimento, (ii) sinalização e (iii) invasão. A adesão é uma etapa que envolve o reconhecimento de moléculas presentes nas duas células envolvidas, o parasito e a célula hospedeira. Várias moléculas nas duas células vêm sendo implicadas como tendo participação no reconhecimento inicial: glicoproteínas, glicolipídeos, proteínas tipo lectina etc. Assim como a adesão os processos de sinalização e invasão de tripomastigotas em células hospedeiras são complexos envolvendo várias vias. Considera-se que formas tripomastigotas entram nas células hospedeiras por três mecanismos: (i) por fagocitose, onde as células emitem pseudópodos e há

participação de filamentos de actina; (ii) endocitose, porém sem emissão de pseudópodos mas com participação de filamentos de actina e (iii) invaginação da membrana, sem participação de filamentos de actina. Este último processo tem sido considerado como um mecanismo ativo de entrada do parasito com gasto de energia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Como citado por SANTOS (2008), e descrito por BURLEIGH e WOOLSEY (2002), a invasão de células de mamíferos pelo *T. cruzi* é crítica para sua sobrevivência no hospedeiro. Assim, sua habilidade em infectar e replicar numa variedade de tipos celulares é uma característica essencial do ciclo de vida nos hospedeiros vertebrados. Para promover a entrada numa ampla gama de células não fagocíticas os tripomastigotas infectivos exploram um arsenal de glicoproteínas de superfície, proteases secretadas e agonistas sinalizantes para, ativamente, manipular as múltiplas vias de sinalização celular que irão culminar na sua interiorização. É importante salientar que somente as formas tripomastigotas, e amastigotas em menor proporção, são capazes de se internalizarem em células de mamíferos e, portanto, serem infectivas para os hospedeiros vertebrados (LEY *et al.*, 1990; CARVALHO e DE SOUZA, 1986).

## 2.2 Purinoreceptores

O conceito de um sistema de sinalização purinérgica, utilizando nucleotídeos e nucleosídeos purínicos como mensageiros extracelulares, foi proposto pela primeira vez há mais de 30 anos (BURNSTOCK, 2002).

Os receptores purinérgicos são caracterizados de acordo com os efeitos farmacológicos em agonistas e antagonistas de nucleosídeos e nucleotídeos extracelulares (BOURS *et al.*, 2006). Estas moléculas mediam funções sinalizadoras rápidas na neurotransmissão, secreção e vasodilatação, e funções de sinalizadoras lentas como regeneração, proliferação e morte celular. É observada em purinoreceptores uma certa plasticidade em condições patológicas e também, frequentemente, um aumento dos componentes purinérgicos parassimpático e simpático (BURNSTOCK, 2002).

Em 1970, BURNSTOCK encontrou provas para o papel do ATP como um neurotransmissor e em 1972 a hipótese dos receptores purinérgicos foi proposta como revisado por BURNSTOCK (2002). Este conceito teve uma considerável resistência por muitos anos, porque tinha se estabelecido o ATP

como uma fonte de energia intracelular envolvido em várias vias metabólicas, e pensava-se que tal ubíqua molécula era improvável de ser envolvida na seletiva sinalização extracelular. No entanto, o conceito é agora amplamente aceito. Posteriormente, foi estabelecido que a ATP é um co-transmissor clássico, tanto no sistema nervoso periférico como central, e que nucleotídeos são poderosos mensageiros extracelulares para células não-neuronais, incluindo sistema exócrino e endócrino, secretor, células endoteliais e ossos, células inflamatórias e do sistema imune ABBRACHIO e BURNSTOCK (2009). Foram definidas duas famílias de receptores P1 e P2 segundo RALEVIC e BURNSTOCK (1998). Os receptores P1 pertencem à superfamília dos receptores do tipo serpentina (sete domínios transmembrana), os quais são subdivididos em receptores do subtipo A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, A<sub>3</sub>, estes subtipos ligam a adenosina com diferentes afinidades (Tabela 1) (BOURS *et al.*, 2006).

ABBRACHIO e BURNSTOCK, (1994) propuseram que existem duas subfamílias de receptores P2, ou seja, receptores P2X, que são canais iônicos, e P2Y, que são receptores acoplados a proteína G. Atualmente, sete subtipos de receptores P2X (P2X<sub>1-7</sub>) e oito subtipos de receptores P2Y (P2Y<sub>1, 2, 4, 6, 11-14</sub>) são claramente reconhecidos, e sua distribuição no organismo e suas propriedades farmacológicas têm sido definidas (SCHICKER, 2009).

O ATP e a adenosina são liberados em locais de inflamação (BOURS *et al.*, 2006). O ATP é envolvido no desenvolvimento da inflamação através de uma combinação de ações: liberação de histamina dos mastócitos, provocando produção de prostaglandinas, e produção e liberação de citocinas das células do sistema imune. Em contrapartida, a adenosina exerce ações anti-inflamatórias (SCHICKER, 2009). Além dos papéis na inflamação, o ATP e a adenosina têm um amplo leque de funções desempenhadas através dos purinoreceptores nas células do sistema imune, incluindo eliminação de patógenos intracelulares por apoptose e fagocitose de macrófagos, indução da liberação de quimiocinas celulares e adesão (BOURS *et al.*, 2006).

A maioria dos receptores mencionados anteriormente tem uma distribuição generalizada em mamíferos. O papel do ATP e da adenosina extracelular na resposta imune e na inflamação dependem da expressão de receptores purinérgicos pelos tipos celulares que são essenciais à resposta inflamatória e resposta imunológica (Tabela 1, BOURS *et al.*, 2006). Estudos mais recentes têm demonstrado que o ATP extracelular tem um efeito direto

sobre a infecção por patógenos intracelulares, modulando o tráfico de membranas em células que contêm vacúolos, os quais abrigam patógenos intracelulares (COUTINHO-SILVA *et al.*, 2007). O ATP extracelular parece então funcionar como um "sinal de perigo" que alerta o sistema imunológico quanto à presença de patógenos intracelulares e dano celular do hospedeiro. Por outro lado os próprios patógenos têm evoluído adquirindo mecanismos para inibir a sinalização do ATP extracelular e seus metabólitos pela sinalização de enzimas. Estas enzimas, chamadas de ecto-nucleotidases têm sido vistas como fatores de virulência destes patógenos (COUTINHO-SILVA *et al.*, 2007).

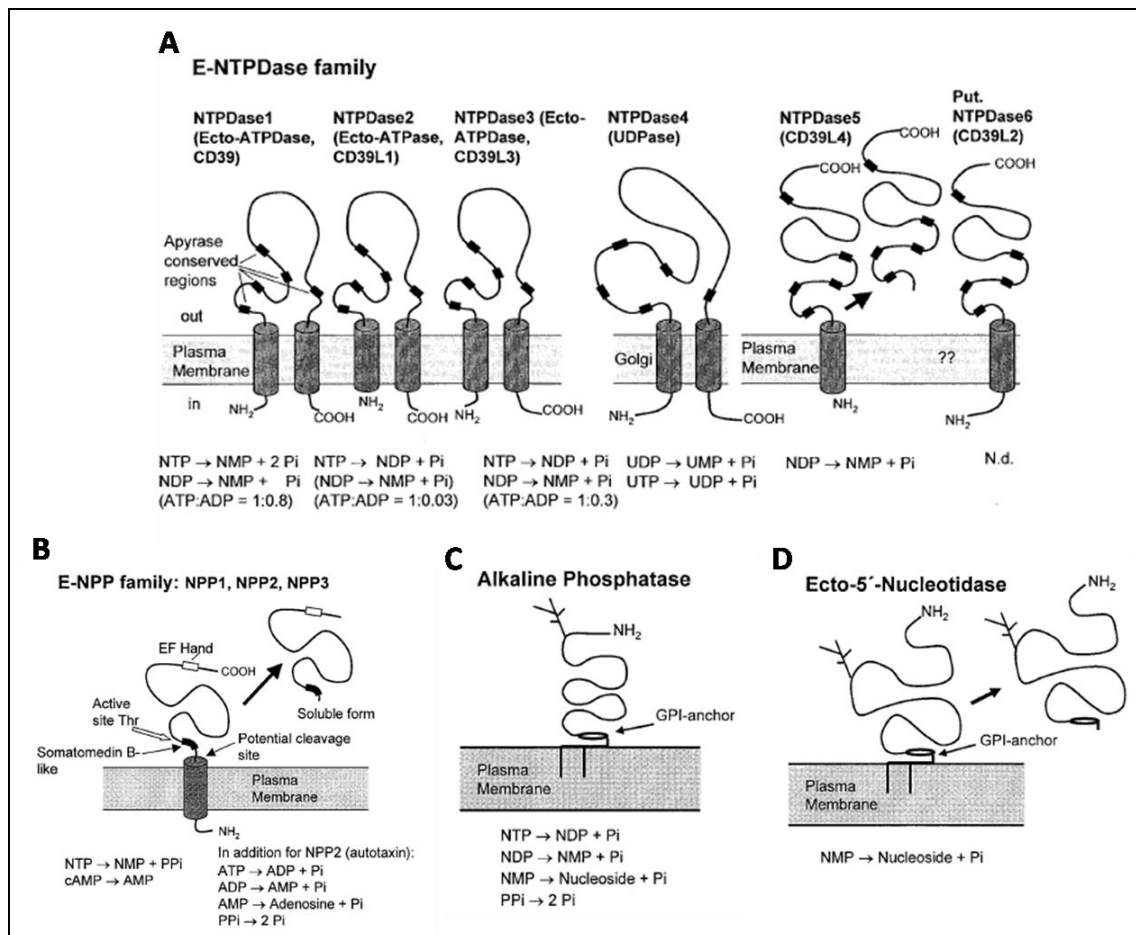
Tabela 1. Subtipos de receptores P1e P2 , ligantes fisiológicos e distribuição em células do sistema imune (adaptado de Bours e Cols., 2006)

<b>Subtipo</b>	<b>Ligantes fisiológicos</b>	<b>Distribuição em células imunes</b>
<b>Receptores P1</b>		
A <sub>1</sub>	Ado (EC <sub>50</sub> : 0.18-0.53 µM) Inosina (EC <sub>50</sub> : 290 µM)	Neutrófilos; monócitos; macrófagos; células dendríticas.
A <sub>2A</sub>	Ado (EC <sub>50</sub> : 0.56-0.95 µM) Inosina (EC <sub>50</sub> : 50 µM)	Neutrófilos; monócitos; macrófagos; células dendríticas; linfócitos T; linfócitos B.
A <sub>2B</sub>	Ado (EC <sub>50</sub> : 16.2-64.1 µM)	Neutrófilos; monócitos; macrófagos; células dendríticas; linfócitos T.
A <sub>3</sub>	Ado (EC <sub>50</sub> : 0.18-0.53 µM) Inosina (EC <sub>50</sub> : 0.03-2.5 µM)	Neutrófilos; monócitos; macrófagos; células dendríticas; linfócitos T.
<b>Receptores P2</b>		
<b>P2X</b>		
P2X <sub>1</sub>	ATP (EC <sub>50</sub> : 0.05-1 µM)	Neutrófilos; monócitos; macrófagos; células dendríticas; linfócitos T; células NK.
P2X <sub>2</sub>	ATP (EC <sub>50</sub> : 1-30 µM)	
P2X <sub>3</sub>	ATP (EC <sub>50</sub> : 0.3-1 µM)	
P2X <sub>4</sub>	ATP (EC <sub>50</sub> : 1-10 µM)	Neutrófilos; monócitos; macrófagos; células dendríticas; linfócitos T; células NK.
P2X <sub>5</sub>	ATP (EC <sub>50</sub> : 1-10 µM)	Neutrófilos; monócitos; macrófagos; células dendríticas; linfócitos T.
P2X <sub>6</sub>	ATP (EC <sub>50</sub> : 1-12 µM)	
P2X <sub>7</sub>	ATP (EC <sub>50</sub> : 100-780 µM)	Neutrófilos; monócitos; macrófagos; células dendríticas; linfócitos T; linfócitos B; células NK.
<b>P2Y</b>		
P2Y <sub>1</sub>	ADP (EC <sub>50</sub> : 8 µM)	Neutrófilos; monócitos; macrófagos; células dendríticas; linfócitos T.
P2Y <sub>2</sub>	UTP (EC <sub>50</sub> : 0.14 µM) = ATP (EC <sub>50</sub> : 0.23 µM)	Neutrófilos; monócitos; macrófagos; células dendríticas; linfócitos T.
P2Y <sub>4</sub>	UTP (EC <sub>50</sub> : 2.5-2.6 µM) > ATP, UDP	Neutrófilos; monócitos; macrófagos; células dendríticas; linfócitos T.
P2Y <sub>6</sub>	UDP (EC <sub>50</sub> : 0.3 µM) > UTP (EC <sub>50</sub> : 6 µM)	Neutrófilos; monócitos; macrófagos; células dendríticas; linfócitos T.
P2Y <sub>11</sub>	ATP (EC <sub>50</sub> : 17 µM)	Neutrófilos; monócitos; macrófagos; células dendríticas; linfócitos T; linfócitos B.
P2Y <sub>12</sub>	ADP (EC <sub>50</sub> : 0.07 µM)	Monócitos; macrófagos; linfócitos T.
P2Y <sub>13</sub>	ADP (EC <sub>50</sub> : 0.06 µM) > ATP (EC <sub>50</sub> : 0.26 µM)	Monócitos; células dendríticas; linfócitos T.
P2Y <sub>14</sub>	UDP-glicose (EC <sub>50</sub> : 0.1-0.5 µM)	Neutrófilos; células dendríticas; linfócitos T.

### 2.3 E-NTPDases

De acordo com LALIBERTE e BEAUDOIN (1983), as E-NTPDases são uma sub-família de ecto-nucleotidases, também chamadas de proteínas da família CD39 ou apirases. São proteínas transmembrânicas ou solúveis (excretadas) que têm capacidade de catalisar a hidrólise de nucleotídeos no espaço extracelular ou intracelular, dependendo do local de sua ecto-localização. Estas enzimas hidrolizam as ligações pirofosfato de nucleosídeos di- e trifosfatados, na presença de cátions divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ ), com liberação de ortofosfato, em um mecanismo seqüencial, no qual o ADP aparece como intermediário. Essas enzimas parecem ser capazes de regular a sinalização purinérgica mediada por nucleotídeos extracelulares, agindo como moléculas de virulência e facilitadoras da infecção por patógenos.

Encontram-se caracterizados oito membros dessa família de enzimas em mamíferos, os quais possuem cinco domínios de seqüências altamente conservadas, denominadas “regiões conservadas de apirase” (ACRs), que são de grande relevância para a atividade catalítica (HANDA e GUIDOTTI, 1996) (Figura 3). As NTPDase1, NTPDase2, NTPDase3 e NTPDase8, parecem ser essenciais no controle da sinalização de receptores purinérgicos do tipo P2, já que se encontram localizados na superfície da membrana plasmática e hidrolisam nucleotídeos em uma concentração tal que são capazes de modular esses receptores (PICHER *et al.*, 1996; SMITH e KIRLEY, 1999; MATEO *et al.*, 1999; LAVOIE *et al.*, 2004; BIGONNESSE *et al.*, 2004). As NTPDases 1, 2, 3 e 8 apresentam dois domínios transmembrana, com o sítio ativo voltado para o meio extracelular (PICHER *et al.*, 1996; BIGONNESSE *et al.*, 2004). Em contraste, as NTPDases 4-7 estão ancoradas nas membranas das organelas intracelulares através de um (NTPDases 5 e 6) ou dois (NTPDases 4 e 7) domínios transmembrana e seus sítios catalíticos estão voltados para o lúmen de compartimentos intracelulares, como o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático (ZIMMERMANN, 2001). Apesar das NTPDases 5 e 6 estarem presentes na superfície da membrana plasmática e ainda serem secretadas como enzimas solúveis após a clivagem proteolítica, seus altos valores de  $K_m$  e baixo valor de atividade específica tornam improvável que essas enzimas regulem a sinalização de receptores P2 em humanos (KUKULSKI *et al.*, 2005).



**Figura 3** - Topologia de membrana e propriedades catalíticas das diferentes famílias de ectonucleotidasas. (A) Família E-NTPDase. As enzimas podem ocorrer como homodímeros. A NTPDase 5 pode ocorrer como uma proteína solúvel (seta). Uma possível NTPDase 6 solúvel, de estrutura primária conhecida está também representada. (B) Família E-NPP. As enzimas podem ocorrer como dímeros e podem se tornar solúveis através de clivagem proteolítica, indicados por setas. (C) Família das fosfatases alcalinas. (D) Família ecto-5'-nucleotidase de mamíferos. A enzima ocorre em dímeros e pode ser liberada da membrana por uma fosfolipase endógena GPI-específica (Zimmermann, 2000).

ASAI *et al.* (1983) descreveram a apirase de *T. gondii*, sendo a primeira apirase descrita em um endoparasita sanguíneo. Como citado por SANTOS (2009) desde então esta enzima tem sido estudada e associada a processos biológicos importantes dentro do contexto das relações parasita-hospedeiro. O *Toxoplasma gondii*, como *T. cruzi*, é um protozoário incapaz de realizar a síntese “*de novo*” de purinas, portanto têm necessidade de captar as purinas do meio externo, que neste caso é constituído do ambiente do hospedeiro (corrente sanguínea e/ou ambiente interno da célula). As apirases além de agirem como fatores de virulência podem ser importantes como componentes da via de salvação de purinas de parasitos tendo esta via sido consideradas como bom alvo para o desenho de novas drogas (El KOUNI, 2003).

Foi demonstrada, por FIETTO *et al.* 2004, a existência de uma atividade de ecto-nucleotidase presente na superfície externa de diferentes formas do *T. cruzi*, baseada na demonstração da maior capacidade ecto-ATPásica das formas infectivas (tripomastigotas) e em dados da literatura que correlacionam essa atividade de parasitos com a virulência. Foi sugerido que, também nesse parasito, a virulência e a infectividade poderiam estar relacionadas com uma maior capacidade ecto-nucleotidásica. Foi isolado também um gene codificante de uma ecto-nucleotidase da família E-NTPDase que foi denominada NTPDase-1. Posteriormente, SANTOS (2009) expressou esta proteína de forma heteróloga, produziu um soro policlonal anti-NTPDase-1 e demonstrou o bloqueio da infecção *in vitro*, após tratamento com o soro policlonal. Demonstrou também que o uso de inibidores de apirases em parasitos, inibia a capacidade infectiva e a virulência para camundongos, comprovando a importância desta enzima para o sucesso e manutenção da infecção. Deste modo a NTPDase-1 foi sugerida como um bom alvo para estudos de novos quimioterápicos, imunoterápicos e como alvo para o diagnóstico da doença de chagas.

## 2.4 Diagnóstico

Segundo LUQUETTI e RASSI (2000) em relação à fase em que a doença se encontra, o diagnóstico da doença de Chagas pode ser realizado através de diferentes estratégias. Um grande número de parasitos circula no sangue no estágio inicial da infecção pelo *T. cruzi* e o diagnóstico pode ser obtido através de exame microscópico direto no sangue periférico. Na fase crônica o diagnóstico se baseia, sobretudo, na detecção da resposta sorológica do hospedeiro, pela presença de anticorpos no soro, através de testes sorológicos sendo os mais utilizados a imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação (HAI) e *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (SCHECHTER *et al.*, 1985; SAÉZ *et al.*, 1997), ou na multiplicação *in vitro* da população de parasitos, através dos métodos de xenodiagnóstico ou hemocultivo (CERISOLA *et al.*, 1962; LUZ *et al.*, 1994), uma vez que os níveis de parasitemia se encontram abaixo dos limites de detecção por microscopia. O xenodiagnóstico é um método bem específico, mas possui uma sensibilidade

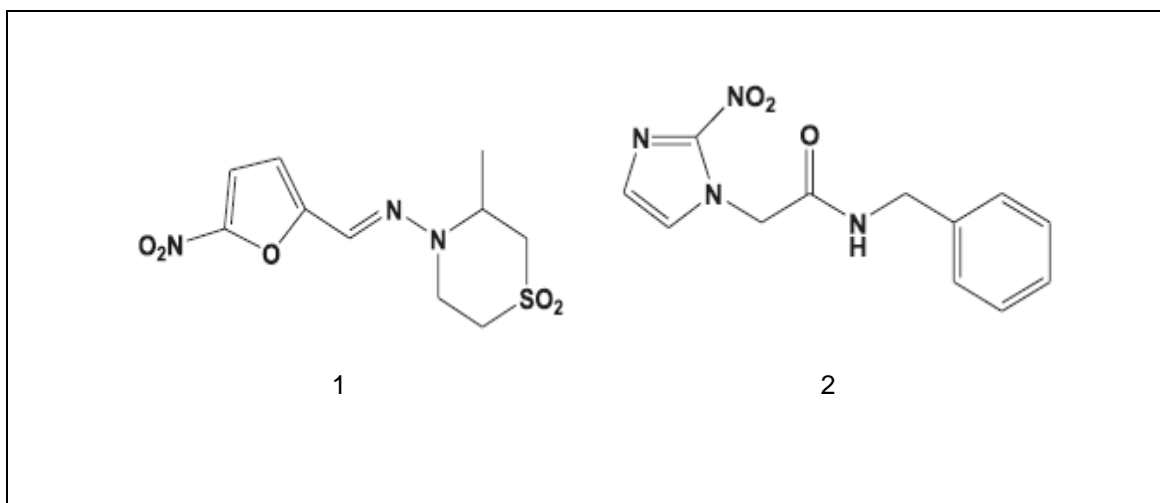
limitada, detectando o parasito em apenas 20 - 60% dos pacientes crônicos soropositivos, dependendo da área endêmica em estudo, e conseqüentemente gerando um número significativo de resultados falso-negativos. A hemocultura não tem sido usada com freqüência no diagnóstico, devido também a sua baixa positividade na fase crônica da infecção. Em relação aos testes sorológicos convencionais, a especificidade dos ensaios tem sido questionada devido à freqüência de infecções com outros tripanosomatídeos que circulam na mesma área geográfica do *T. cruzi* (*Leishmania* spp e *Trypanosoma rangeli*) e são responsáveis pela antigenicidade cruzada e resultados falso-positivos, requerendo assim posterior confirmação por teste parasitológico. Outro problema ligado ao diagnóstico sorológico refere-se ao perfil clínico de um paciente que pode não estar relacionado com a sua resposta humoral, como por exemplo, durante as primeiras semanas de infecção (quando a reação sorológica não é ainda observada) ou após tratamento específico (quando uma resposta imune pode persistir por anos mesmo se o tratamento foi bem sucedido) (NEVES *et al.*, 2008).

Testes de maiores complexidades, como o teste molecular, utilizando *Polymerase Chain Reaction* (PCR) acoplado à hibridização com sondas moleculares, e o *Western blot* (WB), têm apresentado resultados promissores e poderão ser utilizados como testes confirmatórios tanto na fase aguda como nas formas crônicas da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

A necessidade de implantação de um método direto e mais sensível, que permita monitorar a presença do parasito e confirmar a etiologia da doença, devido às limitações na sensibilidade e especificidade dos testes laboratoriais parasitológicos e sorológicos, especialmente quando se trata do diagnóstico de fase crônica, é uma realidade. Segundo CASTRO *et al.* (2002) o ensaio molecular pela PCR é a principal técnica que tem sido testada para a pesquisa do *T. cruzi* diretamente no sangue de pacientes crônicos. Porém, tal teste ainda não foi disponibilizados comercialmente e não é usados além do ambiente de pesquisa. Possui alto custo e a necessidade de sua execução em laboratórios com elevada tecnologia e com espaço exclusivo para a sua realização. Estes fatores limitam o emprego do teste de PCR em situação ambulatorial ou hospitalar, ou mesmo na rotina dos bancos de sangue. Apesar das limitações a PCR pode ser considerada como técnica padrão-ouro para a detecção de parasitos circulantes na doença de Chagas (BRITTO *et al.*, 1995).

## 2.5 Tratamento

Após os 40 anos da introdução dos primeiros fármacos para o tratamento da doença de Chagas, (Nifurtimox, 5-nitrofurano (3-metil-N-[(5-nitro-2-furanil)-metileno]-4-tiomorfolinamina-1,1-dioxida; Bayer 2502) e o Benzonidazol, (N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida)) ainda não foi descoberto um quimioterápico seguro e eficaz. As estruturas químicas do Nifurtimox e benzonidazol estão representadas na Figura 4. Embora o benzonidazol seja o fármaco de primeira escolha para o tratamento da doença de chagas é ainda muito pouco eficaz para cura de pacientes na fase crônica da doença. O benzonidazol atua através do mecanismo de *stress* redutivo, envolvendo modificações covalentes de macromoléculas, como as de DNA, por intermediários nitroreduzores, levando a perda da capacidade de multiplicação do parasito e assim a sua morte (POLAK e RICHLE, 1978). O modo de ação do Nifurtimox envolve a geração de radicais nitroaniônicos pelas nitroreduzases que, na presença de oxigênio, produzem intermediários reativos e, sendo o *T. cruzi* parcialmente deficiente na eliminação desses radicais livres, torna-se susceptível a esses intermediários, ambos têm eficácia limitada no tratamento da fase crônica da infecção, requerem períodos longos de tratamento (60 dias para benzonidazol e até 90 dias para nifurtimox) e têm efeitos colaterais potenciais, incluindo erupções cutâneas, náuseas e insuficiência renal e hepática. O nifurtimox, não disponível no Brasil, também pode causar convulsões e outras desordens do sistema nervoso. Além disso, muitas comunidades rurais pobres em países endêmicos têm pouca infra-estrutura e poucos cuidados com a saúde para que os pacientes terminem seu tratamento, o que reduz a eficácia da droga e aumenta a resistência (DOCAMPO e MORENO, 1986).



**Figura 4** - Estruturas químicas do Nifurtimox (1) e Benzonidazol (2).

O desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da doença de chagas é um mercado pouco atrativo para a indústria farmacêutica privada, uma vez que se trata de uma doença que atinge principalmente os países subdesenvolvidos, sendo, portanto, uma doença negligenciada. De um modo geral, o desenvolvimento de uma quimioterapia antiparasitária ocorre (i) pelo estabelecimento de princípios ativos de plantas utilizadas na medicina popular, (ii) pela investigação de drogas já aprovadas para o tratamento de outras doenças, uma vez que elas já foram submetidas a ensaios clínicos muito dispendiosos, ou (iii) através da determinação de alvo(s) específico(s) identificado(s) em vias metabólicas chave para o parasito (DOCAMPO, 2001).

Como dito anteriormente, uma das maneiras de melhorar as perspectivas para o tratamento da doença de Chagas é modificando as drogas já aprovadas. No Brasil está em processo de criação um comprimido dispersível e uma formulação em dose pediátrica do benzonidazol, que deve estar disponível para o mercado consumidor até o final de 2010. Na Argentina, uma versão em base líquida está em desenvolvimento (WHO, 2010).

A comercialização do Nifurtimox foi interrompida, nos anos 80, primeiro no Brasil e depois na Argentina, Chile e Uruguai (COURA e DE CASTRO, 2002), pois além dessas drogas serem pouco eficazes no tratamento, principalmente na fase crônica da doença, ocorrem vários efeitos colaterais que limitam seu uso na terapêutica (GUEDES *et al.*, 2004).

Além dos avanços significativos obtidos nos aspectos biológicos, genéticos e evolucionários do parasito, o sequenciamento do genoma do *T. cruzi* também contribui com a identificação de diversos alvos biológicos

promissores, sendo a maior parte enzimas (DIAS *et al.*, 2009). Estudos recentes têm identificado alguns potenciais alvos no *T. cruzi*, para desenvolvimento de novas terapias, que incluem o metabolismo de esteróis, o DNA e diferentes enzimas. Da mesma maneira que os fungos, o protozoário *T. cruzi* sintetiza ergosterol, assim, tem sido estudado como alvo quimioterápico as etapas da biossíntese de esteróis que são divergentes em relação à síntese realizada por células de mamíferos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Desde a introdução do nifurtimox e do benzonidazol, somente alopurinol, itraconazol, fluconazol e posaconazol foram submetidos a ensaios clínicos em relação a extensa lista de diferentes classes de compostos que apresentaram atividade *in vitro* e *in vivo* sobre *T. cruzi*. Este fato deve-se, em muitos casos à inexistência de indicação forte do efeito curativo, ao efeito potencial tóxico e/ou teratogênico (em geral somente analisado em modelos *in vitro*), enfatizando a necessidade do desenvolvimento de modelos experimentais mais adequados bem como a padronização de protocolos de ensaio *in vitro* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Apesar da interrupção da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* e todos os esforços realizados no desenvolvimento de novas drogas para seu tratamento, a erradicação ainda não é possível e a Doença de Chagas permanece sendo a doença parasitária que mais mata no continente americano, sem diagnóstico e tratamento adequados, sendo que um em cada três pacientes com doença de Chagas irá desenvolver uma forma fatal da doença (WHO, 2010).

## 2.6 Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos (Ac) são glicoproteínas pela qual o sistema imune reconhece antígenos. No seu estado de repouso cada linfócito B exibe um anticorpo específico em sua superfície. Em qualquer momento existem cerca de  $10^8$  diferentes clones de linfócitos B no corpo, cada um mostrando um anticorpo original. Quando um antígeno entra no organismo e se liga especificamente a apenas algumas dessas células B em repouso, estimulando-as a dividir e a maturar em plasmócitos, estes irão secretar grandes quantidades de imunoglobulina idênticas as imunoglobulinas presentes em sua superfície. Os anticorpos são produzidos então pelos linfócitos B em uma forma

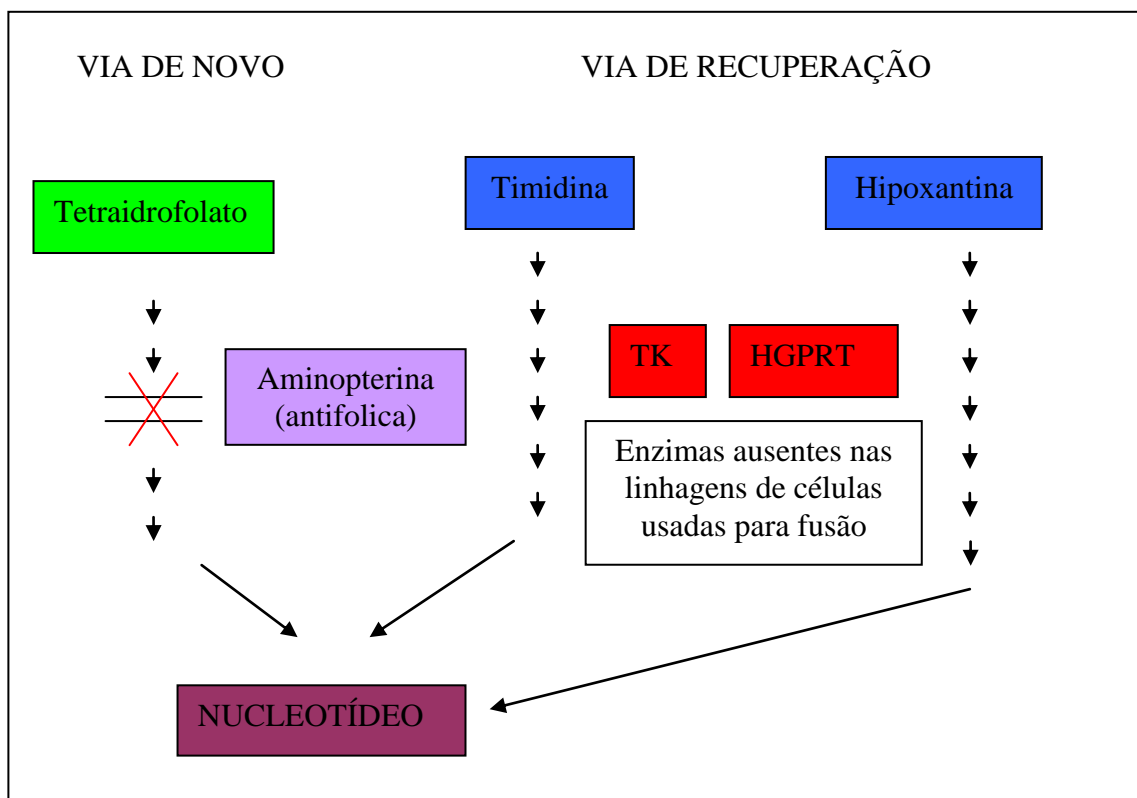
ligada a membrana e também em sua forma a ser secretada, sendo os linfócitos B as únicas células que sintetizam anticorpos. As formas secretadas estão presentes no plasma, nas secreções das mucosas e em menor quantidade no líquido intersticial dos tecidos. Grande parte da resposta inicial de anticorpos ocorre nos tecidos linfóides, principalmente no baço, nos linfonodos e nos tecidos linfóides das mucosas (ABBAS *et al.*, 2005). Anticorpos policlonais são uma mistura de anticorpos produzidos por muitos clones de linfócitos B diferentes e têm sido usados como ferramentas importantes de investigação do papel de biomoléculas e processos celulares, como a infecção pelo *T. cruzi* (SANTOS *et al.*, 2009). Apesar da sua importância como ferramenta de pesquisa o fato de existirem no soro total uma mistura de anticorpos diferentes pode gerar dúvidas quanto à especificidade do evento observado, sendo os anticorpos monoclonais (direcionados para um único epítipo) uma ferramenta muito mais específica para o estudo direcionado de biomoléculas antigênicas.

GEORGES KÖHLER e CÉSAR MILSTEIN (1975) descreveram a técnica de produção de anticorpos monoclonais (mAb) que revolucionou a imunologia e gerou grande impacto na pesquisa. A técnica tem como base o fato de que cada linfócito B produz anticorpo de uma única especificidade (ABBAS *et al.*, 2005). Uma vez que estas são células de vida curta, é necessário imortalizá-las para que se tenha uma contínua produção do anticorpo monoclonal desejado. Para isso realiza-se a fusão celular entre o linfócito B normal e uma célula de mieloma, gerando os hibridomas que são as linhagens celulares produtoras de anticorpos.

Segundo FUNARI *et al.* (2005), as células de mieloma são células plasmáticas caracterizada por proliferação descontrolada na medula óssea com freqüente produção de imunoglobulinas anômalas (proteína M) causando a segunda doença onco-hematológica mais comum no mundo, o mieloma múltiplo. De acordo com GODING (1986) existem várias células de mieloma que são eficazes para produção de hibridomas, sendo essas células obtidas pela indução de defeitos nas vias de síntese de nucleotídeos (ABBAS *et al.*, 2005). As células que não produzem imunoglobulina, e que são sensíveis ao meio HAT (meio de cultura que requer a existência de enzimas capazes de metabolizar a hipoxantina ou a timidina, na presença de um antimetabólito, a

aminopterina) estão disponíveis para pesquisa, sendo estas as P3x63Ag8.653, SP2/0, NS-1, NS-2. (SHULMAN *et al.*, 1978; LITTLE *et al.*, 2000).

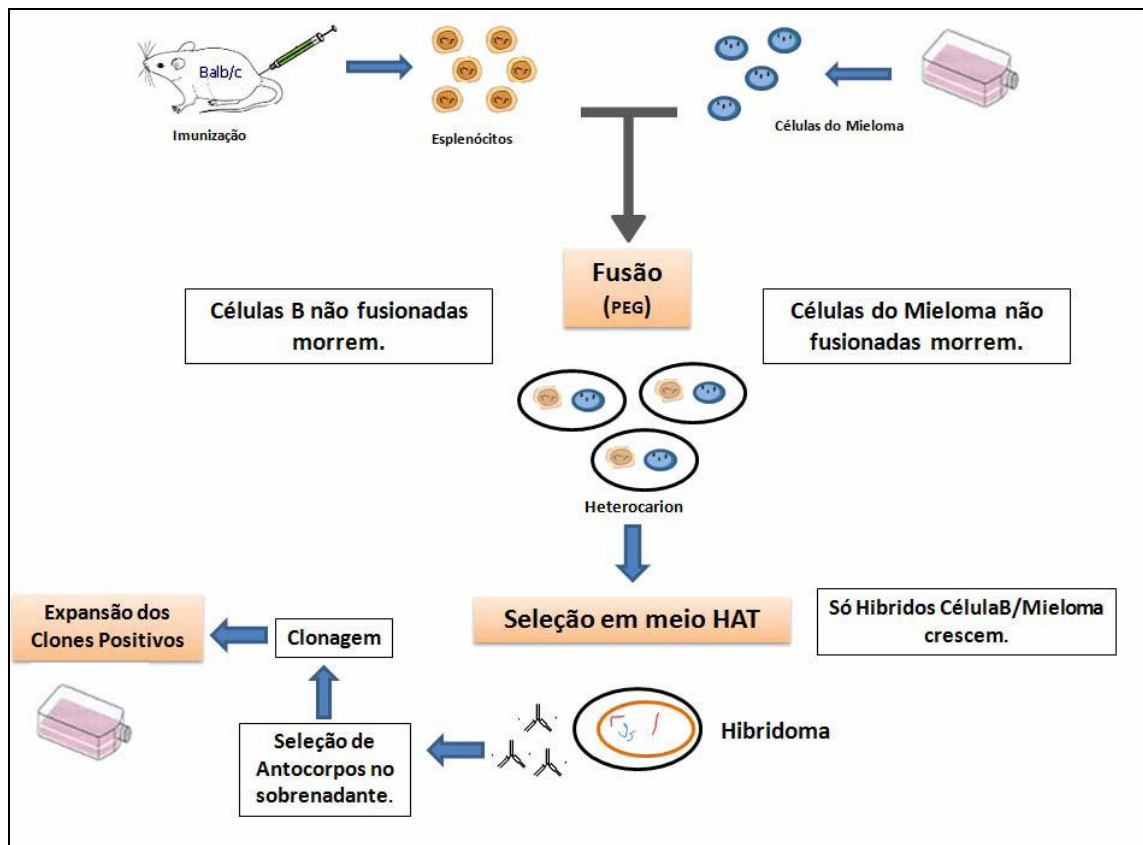
As células animais normais sintetizam nucleotídeos de purina e timidilato ambos precursores do DNA, por uma *via de novo*, que requer tetraidrofolato. Algumas drogas, como a aminopterina, inibem a ativação do tetraidrofolato e impedem a síntese de DNA por essa via. Porém células tratadas com aminopterina podem utilizar a via de recuperação na qual a purina é sintetizada a partir da hipoxantina exógena, por meio da enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT), e o timidilato é sintetizado a partir da timidina, pela enzima timidina quinase (TK) (ABBAS *et al.*, 2005). Estas vias são mostradas na Figura 5.



**Figura 5** - Desenho esquemático das vias da síntese de purinas e pirimidinas, via de novo e via de recuperação, Gómez (2007)-modificado.

A produção de anticorpo monoclonal contra um determinado antígeno, inicia-se com a imunização de um animal, com esse antígeno (ABBAS *et al.*, 2005). Segundo LITTLE *et al.* (2000) a maioria dos roedores (ratos, camundongos) podem ser usados na produção de anticorpos monoclonais, porém os camundongos BALB/c são os animais mais utilizados, devido ao tamanho, manejo fácil, por serem compatíveis com as células de mieloma e por produzirem altos títulos de anticorpos. A dosagem de imunógeno a ser

inoculada nos animais varia de 10 a 50µg de proteína por dose, emulsionados com adjuvante em intervalos de inoculação de duas a quatro semanas (SCHUNK e MACALLUM, 2005). Em seguida, isolam-se células B do baço ou linfonodos do animal imunizado. Estas células são misturadas com células de mieloma (GODING, 1986) e a fusão é possível pela ação do polietilenoglicol (PEG) que age fundindo as membranas de células adjacentes, formando-se uma única célula (HALOW e LANE, 1988). Após 1 a 2 semanas as células B do baço ou linfonodos que não se fundiram sofrem apoptose. As células mielomatosas que não se fundiram também morrem por não possuírem as enzimas necessárias para a sobrevivência no meio de cultura na presença de aminopterina. As células híbridas, por obterem as enzimas das células normais e a imortalidade das células neoplásicas, são as únicas a persistirem no meio de cultura (LIDDELL e CRYER, 1991). Estas células, então, irão se multiplicar, cada uma originando um clone de células híbridas (hibridoma), capazes de fabricar anticorpos com uma única especificidade. Os procedimentos podem ser observados no desenho esquemático da técnica para a produção de hibridomas e clones secretores de anticorpos como mostra GÓMEZ (2007) (Figura 6). Através de métodos imunológicos, a especificidade das imunoglobulinas presentes nos sobrenadantes dos orifícios onde estão os hibridomas pode ser testada, sendo que estes métodos devem ser sensíveis. Devido a pequena quantidade de anticorpos presente no meio de cultura as técnicas de ELISA, dot-ELISA e imunofluorescência são as mais indicadas (LIDDELL e CRYER, 1991). De acordo com COUTINHO (2007) os hibridomas podem ser facilmente congelados, estocados e descongelados vários anos depois sem alterações das suas características.



**Figura 6** - Desenho esquemático da técnica para a produção de hibridomas e clones secretores de anticorpos (GÓMEZ, 2007- Modificado).

Segundo MORALES (1993) e CARDOZO (1998), os anticorpos monoclonais representam um importante instrumento de pesquisa, devido a sua pureza, disponibilidade ilimitada e maior especificidade comparados com os anticorpos policlonais. Além disso, podem ser selecionados para uma produção em grande escala e com boa qualidade para desenvolvimento de testes diagnósticos específicos, mais rápidos e de fácil realização.

Os anticorpos monoclonais (mAbs) são amplamente utilizados no diagnóstico e podem ter aplicações terapêuticas, sendo fundamentais para o diagnóstico de várias doenças que acometem humanos e animais, sobretudo em situações de surto, quando a tomada de decisões adequadas depende de um diagnóstico rápido e confiável (KUNRATH *et. al*, 2004). Uma das vantagens do seu uso no diagnóstico é o fato de reconhecimento do antígeno demonstrar infecção ativa e específica.

Anticorpos monoclonais foram utilizados para detectar antígenos do herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BoHV-1 e BoHV-5) em impressões frescas do cérebro de bezerros acometidos de enfermidade neurológica e em células de cultivo utilizadas na técnica de soroneutralização (SN), permitindo a obtenção dos resultados em 24 horas. A técnica, denominada de soroneutralização

rápida (SNR), apresentou maior sensibilidade, especificidade e precisão em comparação com a SN tradicional e com um ELISA comercial. Esses resultados demonstram que esses mAbs podem ser muito úteis para uso em técnicas rápidas de diagnóstico de infecções suspeitas de BoHV-1 ou de BoHV-5 (KUNRATH *et al.*, 2004).

Além do seu emprego no diagnóstico, os anticorpos monoclonais são amplamente empregados no tratamento de doenças e do câncer. A sua utilização como imunoterápico é uma promissora função destes anticorpos (ELSTROM *et al.*, 2008) e como agentes carreadores de drogas terapêuticas (LIPMAN *et al.*, 2005), como ferramentas em pesquisas da área de saúde, na distinção e caracterização de células morfológicamente idênticas (como linfócitos) em subgrupos funcionais são consideradas umas das mais importantes aplicações dos anticorpos monoclonais (MICELI e PARNES, 1993).

A técnica de cromatografia de imunoafinidade, utilizando-se de anticorpos monoclonais baseia-se no reconhecimento de epítomos antigênicos por anticorpos, sendo essa uma poderosa ferramenta para isolar um determinado composto a partir de amostras complexas com seletividade, facilidade, rapidez e baixo custo, que não é conseguida por outros métodos (DEVENS, 2009)

Tendo em vista a disponibilidade de técnicas cada vez mais eficientes para a obtenção de anticorpos monoclonais e a variedade de métodos que podem utilizá-los faz com que eles estejam disponibilizados para uso terapêutico de rotina como anticorpos dirigidos contra antígenos eritrocitários humanos como: anti-A, Anti-B e Anti-AB utilizados em imunohematologia; anticorpos dirigidos contra proteínas da coagulação humana (emergências hospitalares) e anticorpos contra proteínas humanas (eritropoietina, albumina, imunoglobulina).

A possibilidade de ligar outras moléculas aos anticorpos, tais como marcadores ou substâncias tóxicas, tem aumentado o leque de suas utilidades, tanto diagnósticas como terapêuticas. Em termos de aplicação biológica, uma série de kits de teste de diagnóstico utilizando anticorpos monoclonais estão disponíveis para uma variedade de infecções virais, bacterianas, parasitárias além de testes de gravidez. De acordo com CAMPBELL (1991) e citada por COUTINHO (2005) o uso de anticorpos monoclonais em teste de diagnóstico

pode ser influenciado tanto positiva como negativamente, uma vez que eles reconhecem com especificidade um único epítopo de um patógeno. A influência é positiva no que diz respeito à especificidade do teste que só reconhecerá antígeno que contém aquele epítopo; a influência negativa se dá em relação à sensibilidade do teste, que poderá não ser capaz de reconhecer variantes do mesmo antígeno ou se o epítopo for expresso em pouca quantidade na superfície do patógeno. Por outro lado, um *pool* de anticorpos policlonal, por reconhecer vários determinantes antigênicos, geralmente apresenta um sinal mais forte em testes de diagnóstico, perdendo em especificidade. Uma desvantagem no uso de anticorpos monoclonais em testes de diagnóstico em relação aos anticorpos policlonais ocorre na sua produção, uma vez que o estabelecimento de uma linhagem secretora de anticorpos é muito trabalhosa, especialmente na fase de triagem de hibridomas produtores de anticorpos para clonagem (COUTINHO, 2005).

Na indústria alimentícia os anticorpos monoclonais são importantes na detecção de alimentos adulterados (ZOLA, 1995).

Estudos realizados por TAN *et al.* (2010) mostram que dois anticorpos monoclonais contra a proteína NTPase-II de *Toxoplasma gondii* foram produzidos, e quando se cultivou células cos-7 com taquizoítos pré-tratados com os dois mAbs, o número de parasitas intracelulares por células infectadas diminuiu significativamente em comparação com o controle. Além disso, a incubação de taquizoítos de *T. gondii* com os dois mAbs pode inibir a atividade NTPase indicando que a redução da replicação dos taquizoítos pode ser devido à inibição da NTPase-II pelo mAbs. A imunização passiva indicou que os mAbs transferidos podem prolongar significativamente o tempo de sobrevivência dos camundongos infectados. A NTPase-II é uma proteína que pertence a família das E-NTPases, sendo essas proteínas bons alvos para imunoterapia.

Observamos que os anticorpos monoclonais têm sido largamente empregados, e a sua utilização para desenvolvimento de testes diagnósticos, investigação de moléculas associadas com a virulência do parasito e/ou patogenicidade, e na caracterização de antígenos de parasitos, vem justificar a importância de se produzir mAbs anti-NTPase-1 de *T. cruzi* neste trabalho.

### *3 Objetivos*

---

### 3.1 Objetivo geral

Produzir anticorpos monoclonais anti-NTPDase-1 de *T. cruzi* para serem usados como ferramentas específicas para avaliação da localização subcelular no parasito, do papel desta proteína na infecção *in vitro* pelo *T. cruzi* e em aplicações biotecnológicas como diagnóstico e imunoterapia.

### 3.2 Objetivos específicos

- Purificar a proteína NTPDase-1 de *T. cruzi* recombinante, expressa em sistema heterólogo bacteriano;
- Produzir soro policlonal anti-NTPDase-1 recombinante de *T. cruzi* em camundongo;
- Produzir hibridomas produtores de anticorpos monoclonais anti-NTPDase1 de *T. cruzi*;
- Selecionar anticorpos monoclonais específicos para reconhecimento da proteína NTPDase-1 de *T. cruzi*;
- Selecionar anticorpos monoclonais específicos para reconhecimento da proteína de *T. cruzi* uqe não apresente reação cruzada com a NTPDase-1 recombinante de *Leishmania infantum chagasi*.

## *4 Materiais e Métodos*

---

#### 4.1 Locais

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA); no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV), ambos localizados no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO); e no laboratório de Experimentação Animal localizado no Departamento de Nutrição e Saúde, sendo todos os locais na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa – MG.

#### 4.2 Animais experimentais

Todos os experimentos realizados com animais foram desenvolvidos conforme as normas éticas para a pesquisa com animais, decorrentes do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Viçosa (Anexo A).

Para produção de anticorpos monoclonais utilizou-se no experimento cinco camundongos Balb/C fêmeas com cerca de seis semanas de idade. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa.

Os animais ficaram mantidos em gaiolas com cama de serragem autoclavada, em sala climatizada no laboratório de Experimentação Animal. Foram tratados com ração peletizada, e água filtrada ambos *ad libitum*. Para marcação dos animais utilizou-se ácido pícrico.

Foram utilizados para obtenção de macrófagos peritoniais 7 (sete) camundongos Swiss, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa.

#### 4.3 Preparação de *Escherichia coli* Competentes

Para o preparo de *Escherichia coli* (BL21-DE3RIL), competentes 3 mL de meio LB-líquido (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl, pH 7.5) foram incubadas por 14-16 h sob agitação controlada 180 rpm à 37 °C.

Em seguida, o inóculo foi adicionado em 100 mL de LB sem antibiótico ficando incubadas a 37 °C sob agitação controlada 180 rpm, até que as células atingissem uma densidade óptica (DO<sub>600</sub>) entre 0,6 e 0,8.

Assim que a DO<sub>600</sub> foi atingida as células foram centrifugadas a 1100xg por 8 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 40 mL de uma solução 0,1 M CaCl<sub>2</sub> gelado. Após 1 hora de incubação sobre o gelo foi realizado uma nova centrifugação a 1100 xg por 5 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 1 mL da solução 0,1 M CaCl<sub>2</sub>.

As células competentes foram separadas em alíquotas de 100 µL e estocadas em microtubos de 1,5 mL, contendo 30% de glicerol, e armazenadas a temperatura de -80 °C até utilização nas transformações.

#### 4.4 Extração de DNA plasmidial

A construção do vetor pET21b (Novagen®) com o gene da NTPDase-1 de *T. cruzi* foi realizada por SANTOS *et al.*, 2009. O DNA plasmidial das colônias bacterianas foi extraído utilizando-se o método de lise alcalina, segundo SAMBROOK *et al.* (1987), ou com o kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel), de acordo com as orientações do fabricante. As mini-preparações foram suspensas em 20 µL de água ultra pura estéril.

#### 4.5 Transformação de *Escherichia coli*

Foram adicionados 1 µL de DNA plasmidial a 100 µL das células de *E. coli* competentes. Posteriormente as células foram incubadas por 30 minutos sobre o gelo. Em seguida foi realizada uma nova incubação a 42 °C por 1 minuto e 30 segundos. Novamente as células foram incubadas no gelo por 2 minutos. Foi adicionado 750 µL de meio LB sem antibiótico e incubou-se por 1 h, a 37 °C sob agitação constante (180 rpm). Logo após, foi inoculado 500 µL em 3 mL de meio LB com ampicilina (50 mg/mL). Esse pré-inoculo ficou incubado por 12 horas à 37 °C sob agitação 180 rpm e foi utilizado para indução da NTPDase-1 recombinante de *T. cruzi*.

#### 4.6 Indução da expressão da NTPDase-1 em *E. coli*

Inicialmente, adicionou-se 150  $\mu$ L de do inóculo das células transformadas em 3 mL de meio LB com ampicilina (50 mg/mL), os tubos foram incubados a 37 °C sob agitação (180 rpm)) até que fosse atingida a ( $DO_{600}$ ) entre 0,6 e 0,8.

Após ser atingida essa faixa os conteúdos dos tubos foram vertidos em 600 mL de meio SOC (0,5% de extrato de levedura, 2% de triptona, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl 10 mM de  $MgSO_4$ ). Em seguida, adicionou-se 20 mM de glicose e 10 mM  $MgCl_2$  e incubou novamente a 37 °C sob agitação constante (180 rpm) até que fosse atingida a ( $DO_{600}$ ) entre 0,6 e 0,8.

Então, foi adicionado IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1 thiogalactopyranoside SIGMA<sup>®</sup>) na concentração final de 0,25 mM, incubou-se por 1 hora a 37 °C sob agitação constante (180 rpm). As amostras foram centrifugadas a 12.500  $xg$  por 30 minutos, os sobrenadantes foram descartados e os pellets contendo a NTPDase-1 recombinante foram armazenados à -80.

#### 4.7 Purificação da NTPDase-1 recombinante e análise em SDS-PAGE

O *pellet* obtido na indução foi ressuspensionado em tampão de lise (Tris 50mM pH 8,0; NaCl 100mM; 10mM de EDTA). Para cada 100mL de meio de cultura foi utilizado 4 mL de tampão de lise. Ao tampão de lise foi adicionado os inibidores de protease (aprotinina 1 $\mu$ g/mL; pepsistatina 1 $\mu$ g/mL; leupeptina 1 $\mu$ g/mL) e lisozima (1mg/mL). Após a ressuspensão as amostras foram deixadas no gelo por 30 (trinta) minutos. Em seguida as amostras foram lisadas por sonicação em sonicador Ultrassônico (Misonix<sup>®</sup>). Foram feitas seis sonicações de dez pulsos, cada um por dez segundos, com uma amplitude de vinte por um minuto. Foi realizada uma centrifugação por 15 (quinze) minutos a 12.500  $xg$  a 4°C. O sobrenadante foi reservado e o *pellet* foi utilizado a fim de se purificar a proteína presente nos corpos de inclusão. O *pellet* foi centrifugado por duas vezes com 20 mL de tampão de lavagem I (Tris 50mM pH 8,0; NaCl 500mM; 10mM de  $\beta$ -mercaptoetanol e 2M de uréia) por 20 minutos a 12.500  $xg$  à 4°C. O sobrenadante obtido em cada passo foi coletado para avaliação posterior . O *pellet* foi ressuspensionado em 2mL de tampão "X" (50mM de Tris pH 8,0; 500mM de NaCl; 10mM de  $\beta$ -mercaptoetanol e 8M de

uréia ) e submetido ao processo de purificação em resina de afinidade Níquel-agarose.

A purificação da proteína (presente no Tampão X) foi realizada por afinidade em resina de níquel-agarose de acordo com SANTOS et al.(2009). Inicialmente, a resina foi equilibrada e centrifugada por duas vezes com tampão X, por 5 minutos, 4°C e 12.500 *xg*. O sobrenadante foi descartado e em seguida adicionou-se a proteína presente no tampão X, deixou-se o sistema por uma hora em banho de gelo, para a ligação da proteína à resina, sob agitação constante (180 rpm). Posteriormente, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 1.100 *xg* à 4°C, e o sobrenadante foi armazenado (volume não ligado). Foi adicionado a resina 3 mL de tampão de lavagem II (50mM de Tris pH 8,0; 100mM NaCl; 20mM de imidazol) e em cada uma das lavagens o sobrenadante foi recolhido (lavagens 1, 2 e 3) o procedimento foi repetido por 3 vezes. Em seguida, adicionou-se a resina 2 mL de tampão de eluição (50 mM de Tris pH 8,0; 100 mM NaCl; 250 mM de imidazol), centrifugou-se por 5 minutos a 1.100 *xg* à 4 °C, sendo as alíquotas devidamente coletadas (eluições 1, 2, 3 e 4), esse procedimento foi repetido 4 vezes.

A resina foi lavada por duas vezes com 3 vezes volumes de água ultra pura, centrifugou-se por 5 minutos a 1.100 *xg* e 4 °C Descartou-se o sobrenadante e lavou-se com cinco volumes de guanidina 6M, centrifugou-se por 5 minutos a 1.100 *xg* e 4 °C. Logo após, centrifugou-se com 3 volumes de água ultra pura, por 5 minutos a 1.100 *xg* e 4 °C. Em seguida adicionou-se 3 volumes de solução de etanol a 20% para armazenamento.

As eluições contendo a proteína purificada foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando o reagente da Bio Rad®, onde 100 µL de amostra, foram misturados com 700 µL de água ultra pura e 200 µL de reagente de bradford. A leitura foi realizada a 595 nm em espectrofotômetro *SP-2000 UV* (Spectrum) 10 minutos após a mistura da amostra com o reagente. Com a equação da reta obtida, pela curva padrão da proteína soroalbumina bovina (BSA), foi determinada a concentração das proteínas recombinante purificadas (SOUZA, 2009).

As amostras do processo de purificação em resina de níquel-agarose foram analisadas por gel de SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie de acordo com SAMBROOK (1987).

Todas as eluições foram reunidas e posteriormente separadas em alíquotas de 1 mL em tubos de microcentrifugas, para serem liofilizadas (*liofilizador Edwarts*), sendo que em cada mL continha 20 µg de proteína,, sendo estocadas a -20°C.

#### 4.8 Imunização dos camundongos

Os camundongos Balb/C foram imunizados com o inóculo composto pela proteína NTPDase-1-*T. cruzi* recombinante mais adjuvante de Freund completo e incompleto (Sigma®). Em um total de quatro inoculações. O adjuvante de Freund completo é composto por duas substâncias. Uma é um óleo mineral, que forma um depósito protetor para o antígeno, evitando seu catabolismo rápido. A segunda substância é composta de *Mycobacterium tuberculosis* inativadas por calor. Elas aumentam o nível das linfocinas, fatores de crescimento que estimulam diretamente a atividade de células processadoras de antígenos, causando reação inflamatória localizada no sítio da aplicação.

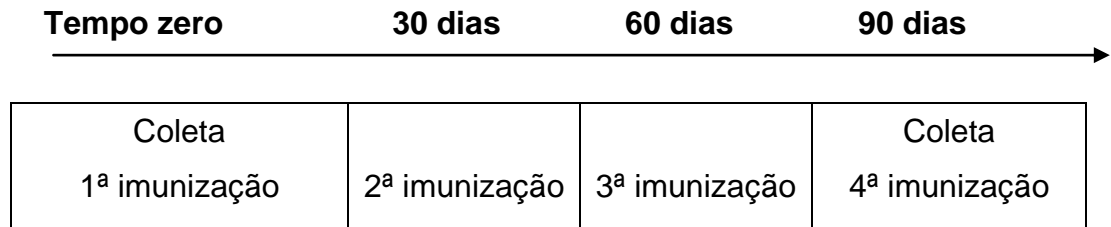
Foi utilizado para cada uma das imunizações 20 µg NTPDase-1 mais 20 µL de adjuvante. Na primeira imunização utilizou-se adjuvante completo de Freund, já na segunda, terceira e quarta imunizações utilizou-se adjuvante incompleto de Freund nas aplicações. A dose aplicada foi de 20 µL. A via intraperitoneal foi à via de escolha para realizar as imunizações, sendo estas realizadas em intervalos periódicos de 30 dias. A quarta imunização foi realizada quatro dias do procedimento de coleta do baço.

#### 4.9 Coleta de sangue

A coleta sanguínea foi realizada de acordo com a técnica utilizada por GOMEZ, 2007. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas de conduta para o uso de animais no ensino, pesquisa e extensão do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (DVT/UFV) e com a aprovação da Comissão de Ética do mesmo.

Primeiramente, os animais foram anestesiados com cetamina associado com xilasina por via intramuscular. Após este procedimento, o sangue periférico foi coletado através do plexo retro-orbital. Os camundongos foram

sangrados antes da primeira e da quarta imunizações. O sangue foi coletado em tubos de microcentrifugas, obtendo cerca de 1 mL de sangue total, deixados por 30 minutos a temperatura ambiente e em seguida centrifugados a 2.000 xg por 5 minutos à 4°C para separação do soro, logo após foram armazenados a -20°C.



**Figura 7** – Cronograma das imunizações e coletas de soro. As imunizações foram realizadas por via intraperitoneal, sendo aplicada 20 µg NTPDase-1-*T.cruzi*, na primeira imunização aplicou-se 20 µg de NTPDase-1-*T.cruzi* misturada com adjuvante completo de Freund, 2ª, 3ª e 4ª imunizações utilizou-se adjuvante incompleto de Freund.

#### 4.10 Dot - ELISA para verificação da presença de anticorpos anti-NTPDase-1 no soro dos camundongos

O Dot-ELISA foi o método utilizado para verificar a efetivação das imunizações com a NTPDase-1 no soro dos camundongos.

O teste foi realizado em placas de 24 orifícios. Os *dots* (discos de nitrocelulose) foram sensibilizados com 0,5 µg de proteína recombinante diluída em 2µL de PBS pH 7,6 (NaCl 8 g/L, KCl 0,2g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24g/L) por *dot*. Após estarem secos, incubou-se os discos doteados com soro dos animais diluído em PBS-Tween 0,5% (200µL/poço) durante 60 minutos. As diluições foram de 1:100; 1:200; 1:400; 1:800. Realizou-se 3 lavagens de 5 minutos cada (200µL/poço), usando PBS-Tween 0,5% sob agitação lateral. Em seguida, incubou-se os *dots* com 200µL/poço de conjugado (anti-IgG de mouse conjugado com peroxidase produzido em coelho, Sigma®) diluído (1:5000) em PBS-Tween 0,5% por 30 minutos. Posteriormente, realizou-se 2 lavagens com PBS-Tween 0,5% e uma terceira lavagem com PBS (200µL/poço). Sendo cada lavagem de 5 minutos. Adicionou-se então substrato (10mg de DAB – Sigma®; 10µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 10mL de Tris-HCl pH 7,6 e 1 mL NiCl<sub>2</sub> 0,3%) no volume de (200µL/poço) e aguardou a revelação. A reação foi parada com 200µL/poço de água ultra pura. Os dots foram lavados 3 vezes com 200µL/poço de água e mantidos a temperatura ambiente até completa secagem.

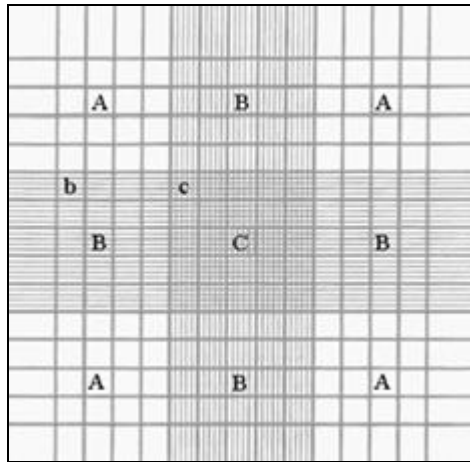
#### **4.11 Cultivo das células de mieloma**

As células de mieloma da linhagem SP2/0 foram obtidas na Escola Paulista de Medicina no ano de 1996 pelo Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV) e cedidas por este para realização do trabalho, estavam na sua 13<sup>a</sup> passagem e foram cultivadas em meio RPMI 1640 com 20% de soro fetal bovino (CULTLAB). As células foram cultivadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> e mantidas em estufa a 37°C, com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, trocando-se o meio de cultivo (5 mL) a cada 48 horas e o repique realizado quando as garrafas estivessem com grande quantidade de células.

O meio de Cultivo RPMI 1640 foi desenvolvido por MOORE (1966) no Roswell park Memorial Institute (MOORE et al., 1967; MOORE et al., 1976), o RPMI 1640 (com glutamina, sem bicarbonato de sódio) é comercializado em pó, sendo uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular. Destinado para a cultura de células humanas e de outros animais. Foi preparado dissolvendo-se lentamente o pó em aproximadamente 900 mL de água tridestilada (15-20 °C) sob agitação constante, acertou-se o pH com HCl 1M para 4. Em seguida, foi acrescentado 2,0g de Bicarbonato de sódio e acertado o pH ~ 7,2 com NaOH 4M, acrescentou-se 1,5 mL de sulfato de gentamicina (SCHERING-PLOUGH) na concentração 40mg/mL e Piruvato de sódio 1%. Logo após completou-se o volume com água tridestilada q.s.p 1000 mL e esterilizou-se o meio por filtração em membranas de 0,22µm, utilizando pressão positiva. O meio ficou estocado à 4 °C em alíquotas de 100 mL e foram pré-aquecidos à 37° em banho-maria antes de serem adicionados as células de mieloma.

#### **4.12 Contagem celular**

As células de mieloma, linfócitos e hibridomas foram contados antes dos procedimentos de fusão, clonagem e congelamento. Para contagem das células viáveis utilizou-se câmara de Neubauer. As células foram contadas por exclusão com azul de tripan tendo mostrado viabilidade próxima a 100%.



**Figura 8** - Representação esquemática de uma câmara de Neubauer. ROUGE, 2002 (modificado)

Para a contagem foi utilizada uma alíquota de 10 $\mu$ L da cultura. As células foram contadas nos quadrantes A. A média das células viáveis contadas é igual ao número de células dos quadrantes. Os resultados das contagens foram obtidos utilizando o seguinte cálculo:

Média das células viáveis contadas (X) = número de células/número de quadrantes A.

$$\boxed{\text{Células por mL} = X \times 10^4 \times \text{fator de diluição}}$$

#### 4.13 Coleta de linfócitos

Dos 5 (cinco) animais com sorologia positiva pelo método de Dot-Elisa apenas 1(um) foi utilizado para retirada do baço e obtenção dos linfócitos.

O camundongo número 2 foi escolhido aleatoriamente. Este foi anestesiado com cetamina associado com xilasina e posteriormente eutanasiado por estiramento cervical. Logo após, os animais foram mergulhados em uma solução de álcool a 70% (v:v) durante 3 minutos para desinfecção. Posteriormente o animal foi retirado do álcool e fixado em prancha de isopor em decúbito dorsal. Em capela de fluxo laminar a pele do abdômem foi rebatida com auxílio de uma pinça e tesoura. O baço foi então retirado e transferido para uma placa de petri contendo 2 mL de RPMI 1640, onde realizou-se a maceração do órgão com bastão de vidro. A suspensão de células foi transferida para um tubo de fundo cônico de 15 mL e centrifugadas a 2000  $xg$  à 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e *pellet*

ressuspendido em 5 mL de solução de lise de hemácias (0,206g de Tris base, 0,77g de NH<sub>4</sub>Cl em 100 mL de água) o conteúdo foi mantido incubado por 2 minutos. Posteriormente foi adicionado 10 mL de meio RPMI e submetido a centrifugação a 2000 *xg* à 4°C por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* resuspendido em 10 mL de meio RPMI 1640. Os esplenócitos foram contados por exclusão com azul de tripan em câmara de Neubauer.

#### 4.14 Titulação do Soro

O Dot-ELISA foi a metodologia utilizada para titulação do soro hiperimune obtido do animal número 2 que foi eutanasiado. Os procedimentos foram os mesmos realizados no item 4.10. A diluição inicial foi de 1:100 e a diluição máxima foi 1:204800.

#### 4.15 Fusão

A suspensão de células de mieloma SP2/0 foi transferida para um tubo de fundo cônico de 15 mL. Essas células foram contadas por exclusão com azul de tripan. Cerca de  $9 \times 10^6$  células/mL foram utilizadas para procedimento de fusão.

As suspensões de esplenócitos (cerca de  $6 \times 10^7$  células/mL) e células de mieloma foram misturadas. Em seguida centrifugou-se a mistura a 500 *xg*, a 25°C por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e gotejou-se 1 mL de polietilenoglicol (PEG) 50% estéril. Homogeneizou-se por 1 minuto. Logo após gotejou-se 1 mL de meio RPMI-1640 sem soro, pré aquecido à 37 °C, esse procedimento foi realizado mais uma vez. Centrigugou-se a 500 *xg* e a 25°C por 5 minutos. O *pellet* foi resuspendido com os hibridomas recém formados em 40 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino (RPMI 1640 completo). Os hibridomas foram distribuídos em 4 placas de 96 poços, foi adicionado 100 µL/poço da suspensão de hibridomas, incubou-as em estufa a 37°C com atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%.

Após 1 dia de incubação, foi adicionado 100 µL/poço de meio RPMI 1640 completo com HAT (Para cada 100mL de meio RPMI 1640 completo adiciona-se 2 mL de meio HAT). Os hibridomas foram mantidos trocando-se 100 µL do meio a cada 48 horas, sendo esse procedimento repetido por 15

dias. No 15º dia o meio de cultivo foi trocado por meio RPMI 1640 completo com HT, as células foram mantidas com HT durante as 3 trocas de meio seguintes e a partir da quarta troca foi usado apenas RPMI 1640 completo.

#### **4.16 Coleta do sobrenadante dos híbridomas**

Após 30 dias da fusão, em intervalos periódicos de 7 (sete) dias foi coletado 100µL/poço de sobrenadante das placas de cultivo. Esses sobrenadantes foram armazenados em placas de 96 orifícios e posteriormente congelados à -20°C, até a realização do ELISA para a detecção de anticorpos anti-NTPDase -1 *T. cruzi*.

#### **4.17 ELISA indireto para avaliação da produção de anticorpos no sobrenadante dos hibridomas**

Para avaliação da produção de anticorpos no sobrenadante dos hibridomas foi utilizado o teste imunoenzimático (ELISA).

As microplacas para elisa de 96 poços (Nunc Immuno 96 MicroWell™ Plates MaxiSorp™) foram sensibilizadas com 0,5 µg/poço de proteína recombinante diluídas em 100 µL de tampão carbonato 0,1M pH 9,6 (0,795g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 1,465g Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>; H<sub>2</sub>O q.s.p 500 mL), por 12 horas a 4 °C.

As placas foram lavadas 4 vezes com solução de lavagem (PBS 1X; 0,05% Tween 20) e bloqueadas com solução de bloqueio a 90 minutos com BSA 3%.

Passado esse período as placas foram novamente lavadas por 2 vezes com solução de lavagem. Em seguida as placas foram incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente, sob agitação, com 100 µL/poço de sobrenadante dos hibridomas.

Logo após serem lavadas 4 vezes, incubou-se com 100 µL/poço do anticorpo secundário (anti-IgG de mouse conjugado com peroxidase produzido em coelho, Sigma) diluídos em solução de diluição (BSA 1% em PBS 1X), por 90 minutos à temperatura ambiente sob agitação. Posteriormente, as placas foram lavadas 4 vezes e foi adicionada a solução reveladora [10 mL de tampão citrato fosfato 0,1M; pH 5; 4mg de O.P.D. (o-Phenylenediamine - C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>, 98%, MW 108,14 - Agros Organics); 5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %] 100 µL/poço da solução. A

reação foi incubada por 15 minutos à 37 °C protegida da luz. Parou-se a reação de desenvolvimento da cor com 32 µL/poço de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 M.

A presença de anticorpos foi determinada através da leitura da absorvância a 490 nm (DO490nm) em leitora de microplaca *Thermo Plate* (TP-Reader). Como controle negativo foi utilizado meio RPMI 1640 completo, o mesmo usado para manutenção das células, foram utilizados 4 poços por placa. E o ponto de corte (Cut off) entre positivo e negativo para resposta sorológica foi determinado pelo valor da média dos controles negativos adicionados de dois desvios padrão (95%).

#### **4.18 Preparo de macrófagos peritoneais**

Para que as multiplicações dos clones fossem eficientes foram utilizados macrófagos alimentadores durante o processo de cultivo desses como realizado por KALKS, 2008. O preparo dos macrófagos peritoneais foi realizado como descreveu GÓMEZ, 2007. Foram utilizados 7 (sete) camundongos para esse procedimento.

Para a coleta das células peritoneais, os camundongos foram anestesiados com cetamina associado com xilasina e posteriormente eutanasiados por estiramento cervical sendo logo após mergulhados em uma solução de álcool a 70% (v:v) durante 3 minutos para desinfecção.

Os animais foram retirados do álcool e colocados em prancha de isopor e transferidos para capela de fluxo, devidamente esterilizadas, os animais foram então fixados.

A pele do abdômen foi rebatida, com auxílio de pinça e tesoura autoclavados. Depois de rebatida a pele, injetou-se, na cavidade peritoneal, 5 mL de uma solução de dextrose 10% em meio RPMI 1640 gelado com auxílio de uma seringa.

O abdômen do animal foi massageado com a ponta dos dedos, com as mãos protegidas por luvas, por aproximadamente quatro minutos, posteriormente o meio injetado foi coletado e mantido em tubos de centrifuga no gelo. Os tubos foram centrifugados a 2.000 xg, por cinco minutos, a 4°C, desprezando o sobrenadante.

Os pellets correspondentes aos macrófagos foram ressuspensos em meio 70 mL de meio RPMI 1640 (Sigma, EUA), 10% SFB (Cultilab, Brasil) e

distribuído em sete placas de 96 orifícios, 100 µL/poço. As placas foram incubadas em estufa, a 37 °C, com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, até a realização da diluição limitante.

#### **4.19 Clonagem e ELISA para detecção dos clones positivos**

O procedimento de clonagem foi realizado como descrito por RYAN no protocolo da empresa CORNING®.

Os poços que apresentaram-se positivos na avaliação do sobrenadante dos hibridomas foram homogeneizados com auxílio de uma micropipeta, a fim de que as células ficassem suspensas no meio. Para fins de contagem foi retirado 10 µL de meio para contagem celular.

As clonagens foram realizadas 2 vezes, sendo que na primeira vez as placas não estavam preparadas com uma camada de macrófagos.

Coletou-se 200 µL da cultura dos poços (F5; F11; G3; G5; G11; H5; H8) da placa 3 e colocou-os no poço A1 de cada placa. As placas foram previamente preparadas com uma camada de macrófagos, assim já continham 100 µL/poço de meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal, exceto no poço A1.

A diluição foi realizada da seguinte maneira, do poço A1 retirou-se 100 µL da cultura e transferiu para o poço B1, homogeneizou e transferiu-se 100 µL para o poço C1, procedeu-se dessa maneira até o poço H1, desprezando-se os 100 µL restantes para que todos os poços contivessem o mesmo volume. Em seguida, adicionou-se 100 µL/poço de RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal à coluna 1. Com auxílio de uma micropipeta multicanal realizou-se as diluições seriadas, homogeneizou-se e retirou-se 100 µL/poço da coluna 1 e transferindo para coluna 2, após homogeneização transferiu-se 100 µL/poço da coluna 2 para coluna 3 e assim até a coluna 12. Para avaliação da produção de anticorpos no sobrenadante das clonagens foi realizado o mesmo protocolo descrito no item 4.16.

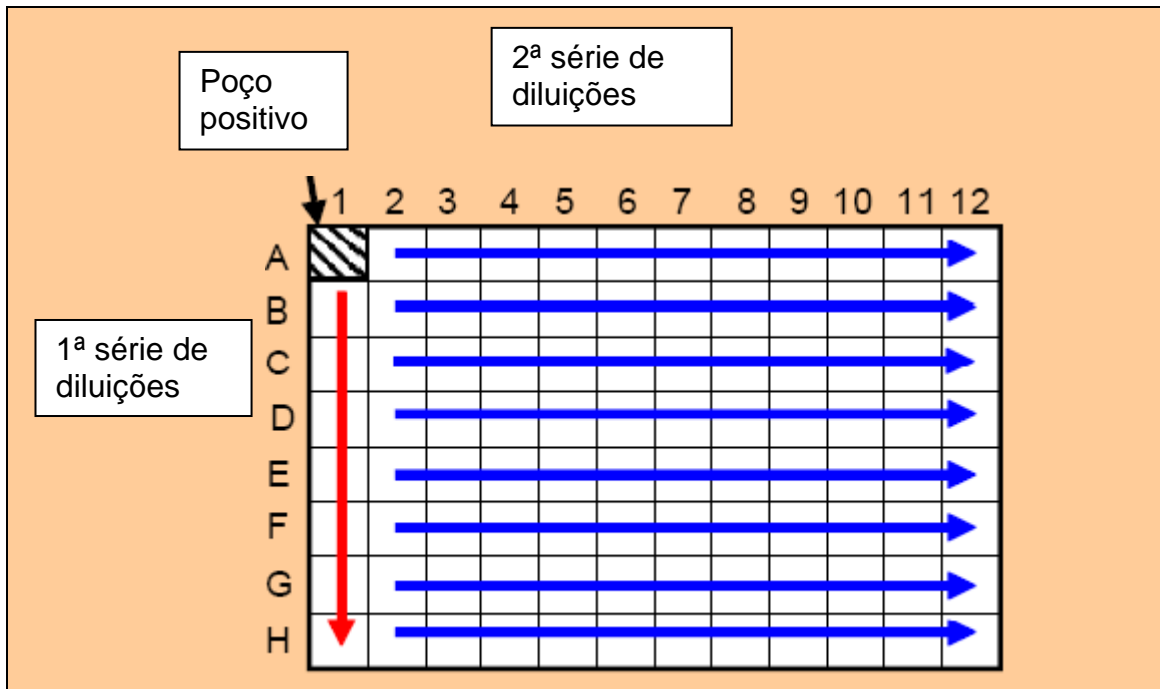


Figura 9 - Clonagem por diluição limitante, RYAN(CORNING)–modificado.

#### 4.20 Avaliação da especificidade dos anticorpos produzidos no sobrenadante dos clones isolados

A fim de se avaliar a especificidade dos anticorpos purificados realizou-se ELISA-indireto, sendo o protocolo seguido de acordo com o item 4.15 diferindo apenas na proteína sensibilizada na placa que foi a NTPDase-1 de *Leishmania infantum chagasi*. Utilizou-se para sensibilização da placa 0,5 µg da proteína recombinante por poço. A proteína foi produzida e cedida por Matheus Silva Bastos, dados não publicados da dissertação de mestrado.

#### **4.21 Congelamento dos clones produtores de anticorpos monoclonais anti-NTPDase-1 de *T. cruzi***

Os clones obtidos após o procedimento de clonagem por diluição limitante, foram secretores de anticorpos anti-NTPDase-1 de *T. cruzi*, e com bom crescimento celular foram ressuspensos e colocados em criotubos. A estes foram adicionados o mesmo volume de soro fetal bovino com 10% de DMSO (solução crioprotetora). Os criotubos foram devidamente fechados e rotulados, sendo em seguida transferidos para um banho de gelo e logo após colocados no freezer a -20° até seu congelamento. Posteriormente foram estocados à -80°C.

---

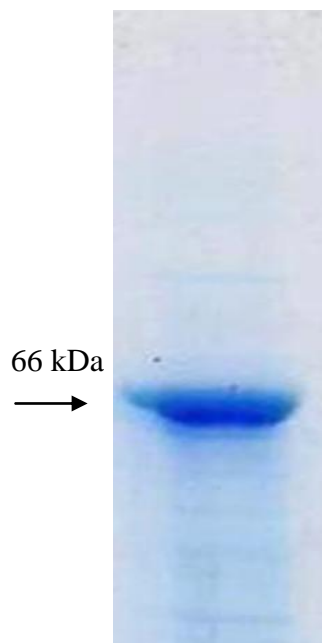
## *5 Resultados e Discussões*

Nesse trabalho foi realizada a produção de anticorpos monoclonais anti-NTPDase-1 de *T. cruzi*. e avaliada a especificidade por reatividade cruzada ou não com a NTPDase-1 de *Leishmania infantum chagasi* (PEREIRA, 2010).

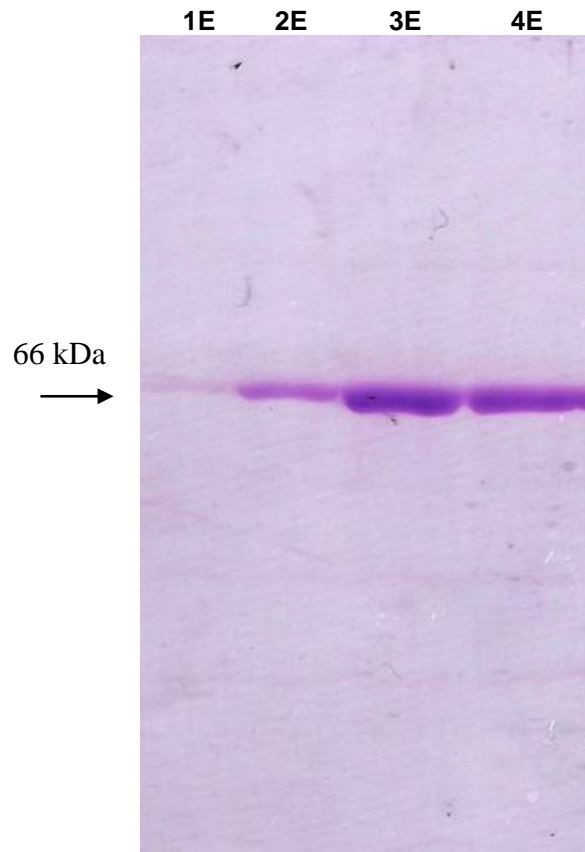
### 5.1 Expressão heteróloga e purificação da NTPDase-1 de *T. Cruzii*

Para realizar as imunizações com a NTPDase-1, esta inicialmente foi expressa em sistema heterológico bacteriano e purificada de acordo com SANTOS *et al.*, 2009.

A banda de 66 kDa presente no gel SDS-PAGE 15% (Figura 10 e 11) corresponde a proteína recombinante NTPDase-1 expressa em sistema heterológico bacteriano adicionada de 6 histidinas na região carboxi-terminal, usada para a purificação em resina de afinidade níquel-agarose (Ni-NTA Sigma®). A proteína presente nas eluições foram liofilizadas e armazenadas a -20°C para utilização nas imunizações, ELISA e Dot-Elisa.



**Figura 10** - Purificação dos corpos de inclusão solubilizados contendo a proteína heteróloga E-NTPDase-1 de *T. cruzi*. Uma amostra de 15  $\mu$ L da proteína em tampão X foi aplicada na canaleta. A visualização das bandas do gel de SDS-PAGE 15% deu-se pela coloração com Azul de Coomassie.



**Figura 11** - NTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi* purificada em resina de níquel-agarose. 1E: Primeira eluição; 2E: Segunda Eluição; 3E: Terceira Eluição; 4E: Quarta Eluição. SDS-PAGE 15%, corado com Azul de Coomassie. Foi aplicado em cada canaleta 1 µg de amostra.

Através do gel de SDS-PAGE 15%, pode se avaliar a qualidade da expressão e purificação, estando eficiente.

## 5.2 Imunização dos camundongos e titulação do soro hiperimune

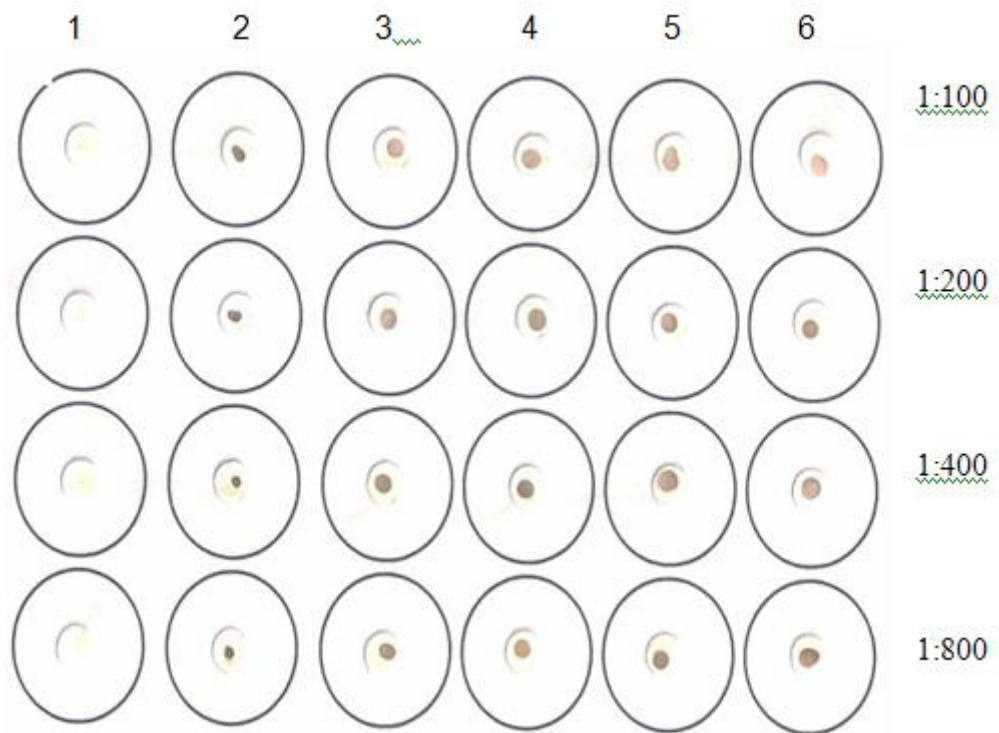
As imunizações foram realizadas aplicando-se o antígeno (NTPDase-1 *T. cruzi*) juntamente com substâncias que ativam o sistema imunológico de forma não específica, forte e prolongada, denominadas de adjuvantes, adjuvante de Freund.

Para avaliar a eficácia das imunizações foi realizado o ensaio de Dot-Elisa com os soros dos animais coletados após a terceira imunização.

Os imunógenos possuem características particulares de indução de resposta, sendo que um bom imunógeno deve induzir uma resposta humoral primária, e uma resposta secundária forte. Constatou-se que a NTPDase-1 *T. cruzi* é antigênica, pois ao se avaliar as amostras dos soros dos cinco animais imunizados com a proteína estas apresentaram-se positivas para as diluições

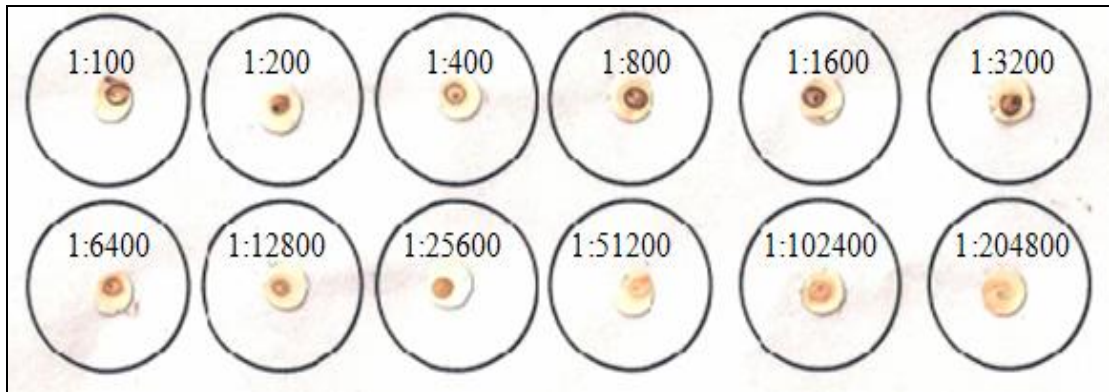
realizadas (1:100; 1:200; 1:400; 1:800) (Figura 10). Demonstrou-se dessa forma que os 5 animais responderam as imunizações com uma boa resposta imune humoral e estando o resultado de acordo com SALES-JÚNIOR (2003) que relatou em seu trabalho o pico máximo de produção de IgGs totais logo após a terceira inoculação. Realizou-se também a titulação do soro do animal número 2 que foi utilizado para a esplenectomia. Como controle foram utilizados os soros dos animais antes das imunizações (Figura 12). O Título de anticorpos do soro foi considerado como sendo a máxima diluição realizada sem reação cruzada, 1:204800.

A utilização de camundongos para a produção de anticorpos monoclonais é vantajosa, pois são animais de fácil manuseio quando comparados a animais maiores normalmente utilizados no preparo de soros policlonais (coelhos entre outros). Anticorpos policlonais são inconstantes, no sentido de que as características dos anticorpos purificados refletem o exato momento no qual o sangue foi retirado do animal e cada nova retirada de amostra ou imunização requer um novo procedimento de padronização de uso do determinado lote de amostras.

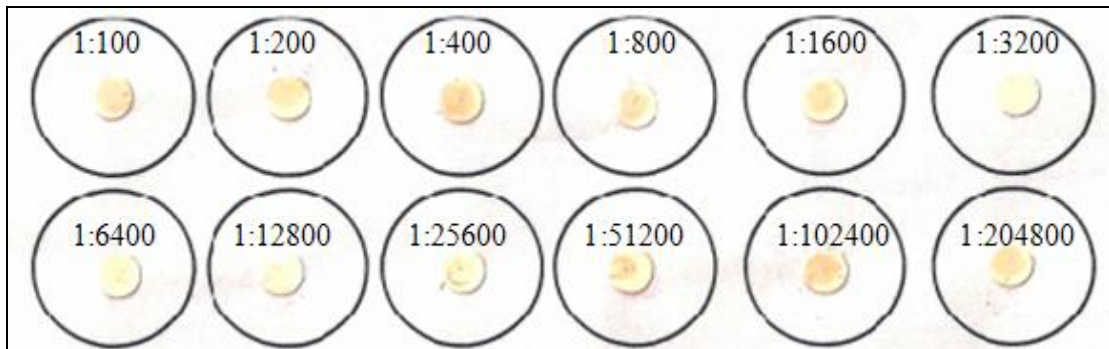


**Figura 12** - DOT-ELISA do soro dos camundongos imunizados com a proteína NTPDase-1 de *T. cruzi* Coluna 1) Mix do soro pré-imune dos camundongos (controle negativo); Colunas 2, 3, 4, 5 e 6) Soro dos animais 1, 2, 3, 4, e 5 respectivamente, após a terceira imunização. Nas diluições de 1:100; 1:200; 1:400; 1:800. Título igual ou maior a 800.

## A) Soro hiper –imune



## B) Soro pré-imune

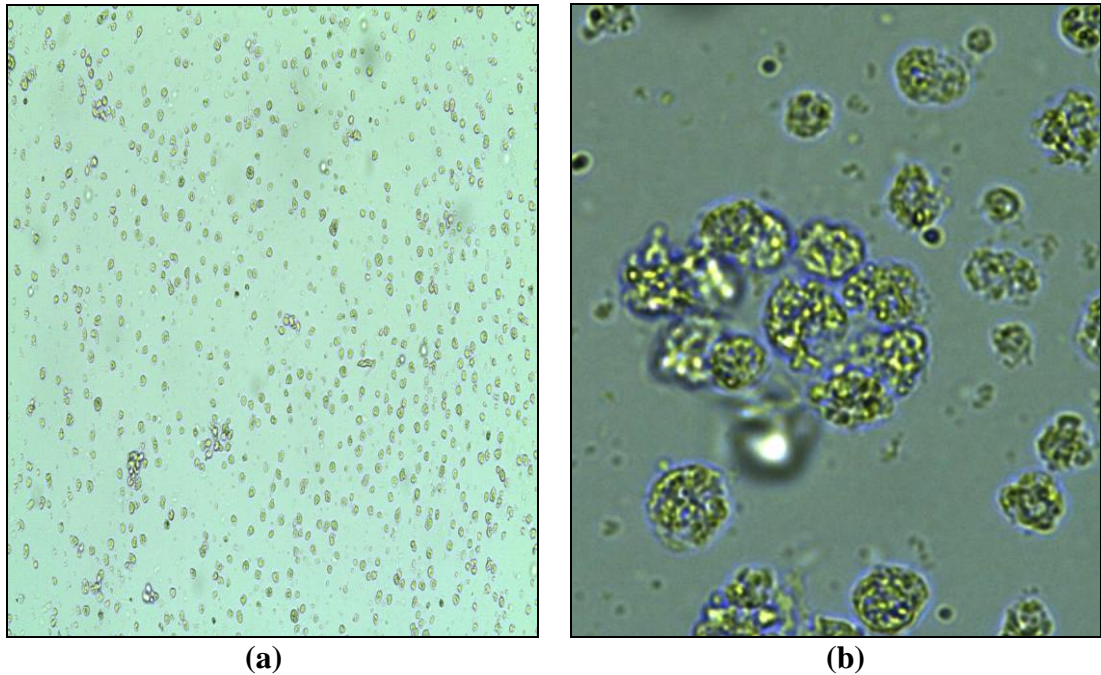


**Figura 13** – Titulação do soro hiper-imune por DOT-ELISA. DOT-ELISA da titulação do soro hiper-imune do camundongo BALB/c imunizados com a proteína NTPDase-1 de *T. cruzi* e titulação do mix do soro pré-imune dos camundongos BALB/c obtidos antes das primeiras imunizações. Foram realizadas um total de 12 diluições 1:100; 1:200; 1:400; 1:800; 1:1600; 1:3200; 1:6400; 1:12800; 1:25600; 1:51200; 1:102400; 1:204800. Título igual ou maior a 204800.

### 5.3 Produção dos híbridomas

#### 5.3.1 - Cultivo das células de mieloma e produção dos híbridomas

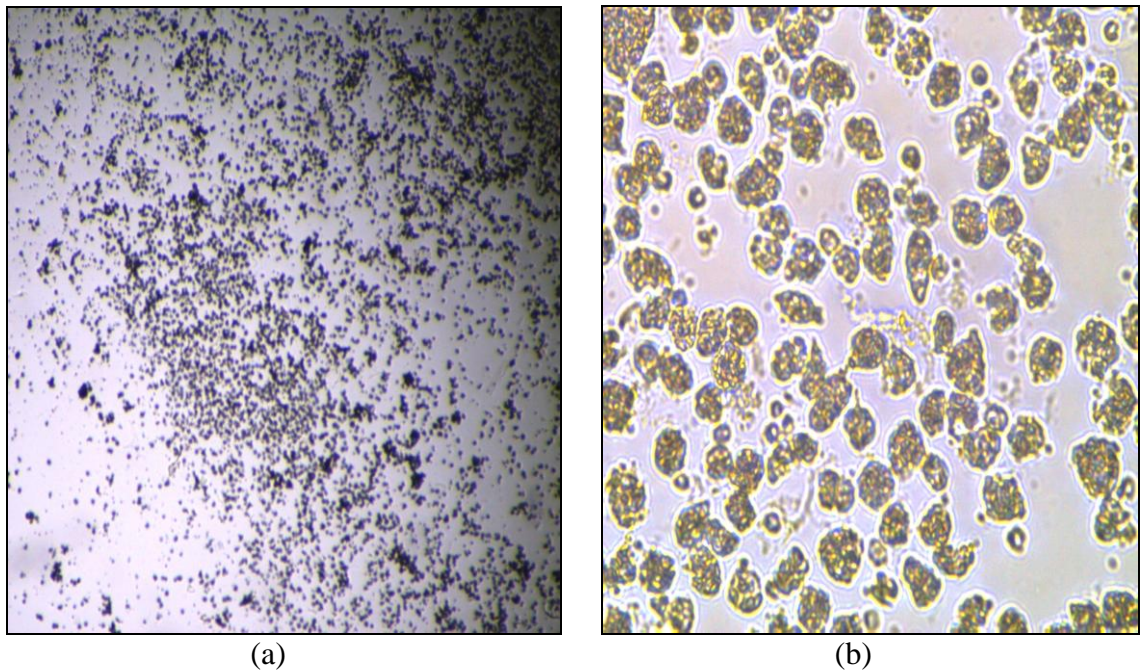
As células de mieloma da série plasmocitária não secretoras de imunoglobulinas (SP2/0) (SHULMAN *et al.*, 1978) cultivadas em meio RPMI 1640 apresentaram-se com um bom crescimento celular alcançando um número de células suficientes para o procedimento de fusão. Na Figura 14 estão representadas fotografias do cultivo dessas células em aumento de 10x (a) e 40x (b), observadas em microscópio invertido.



**Figura 14** - Células de mieloma. Cultivo de células de mieloma em meio RPMI 1640 com 20% de soro fetal bovino. (a) Células de mieloma em aumento de 10x; (b) Células de mieloma em aumento de 40x, observadas em microscópio invertido.

Como todos os animais imunizados com a NTPDase-1 apresentaram uma boa produção de anticorpos como comprovado nos experimentos de Dot-ELISA para verificação do título dos soros hiper-imune, a escolha do animal para coleta do baço e obtenção dos esplenócitos para formação dos hibridomas foi aleatória, sendo este o animal 2.

Observou-se o crescimento celular dos hibridomas produzidos que foram cultivados nas 4 placas de 96 orifícios cada e numeradas de 1 a 4. Vários poços apresentaram crescimento celular satisfatório (Figura 15). E avaliou-se pela metodologia de ELISA indireto o sobrenadante dos poços, sendo que 47,13% dos hibridomas verificados produziram anticorpos anti-NTPDase-1, como se verificou na Tabela 2.

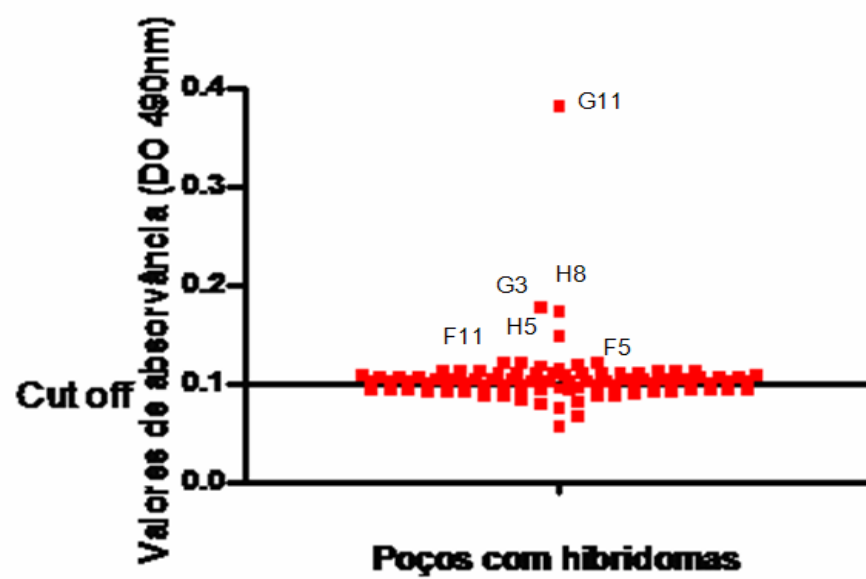


**Figura 15 - Hibridomas.** Fotos das células de hibridomas cultivadas em meio HAT-RPMI com 20% de soro fetal bovino no 30º dia. (a) Aumento de 4x. (b) Aumento de 40x. Observados em microscópio invertido.

**Tabela 2** - Comparação por porcentagem entre o número de hibridomas positivos e negativos utilizando a metodologia de ELISA indireto.

Placas	1	2	3	4	Total
Hibridomas					
Positivos	78,12%	30,20%	66,66%	7,29%	47,13%
Negativos	21,88%	69,80%	33,33%	92,70%	52,87%

À título de ilustração, os dados completos dos hibridomas da placa 3 está detalhadamente mostrado no gráfico 1, onde pode-se observar que os poços F5; F11; G3; G5; G11; H5; H8 são os poços positivos que apresentaram os maiores valores entre os demais e além disso apresentaram boa expansão celular cobrindo bem o poço. Apresentar valores de absorvância acima do Cut off e crescimento celular cobrindo todo poço foram os critérios utilizados para a escolha destes para realização do procedimento de clonagem por diluição limitante a fim de se obter um clone proveniente de uma única célula. Sendo que os critérios de seleção foram os mesmos utilizados por GÓMES, 2007.



**Gráfico 1-** Ensaio de ELISA indireto. Gráfico com os valores de absorvância do sobrenadante de cultivo do hibridomas. Cut off=0.1

#### 5.4 Clonagem por diluição limitante dos hibridomas positivos

Para o procedimento de clonagem por diluição limitante as placas foram preparadas com macrófagos peritoneais com 2 dias de antecedência. A utilização da monocamada de macrófagos demonstrou ser necessária, uma vez que as diluições foram realizadas em placas com e sem a presença destas. Verificou-se que as células não se expandiram na ausência de monocamadas como relatado também por SOUZA, 1999 e KALKS, 2008.

De acordo com DEVENS, 2009 o cultivo de células que secretam fatores de crescimento apropriados nas placas que receberão os clones, previamente à sua distribuição melhora as condições de expansão celular, na clonagem a partir de uma única célula. Estas culturas são geralmente preparadas a partir de esplenócitos, macrófagos, tímócitos ou fibroblastos. Estas células favorecem a ambientação do hibridoma, permitindo seu crescimento com maior facilidade.

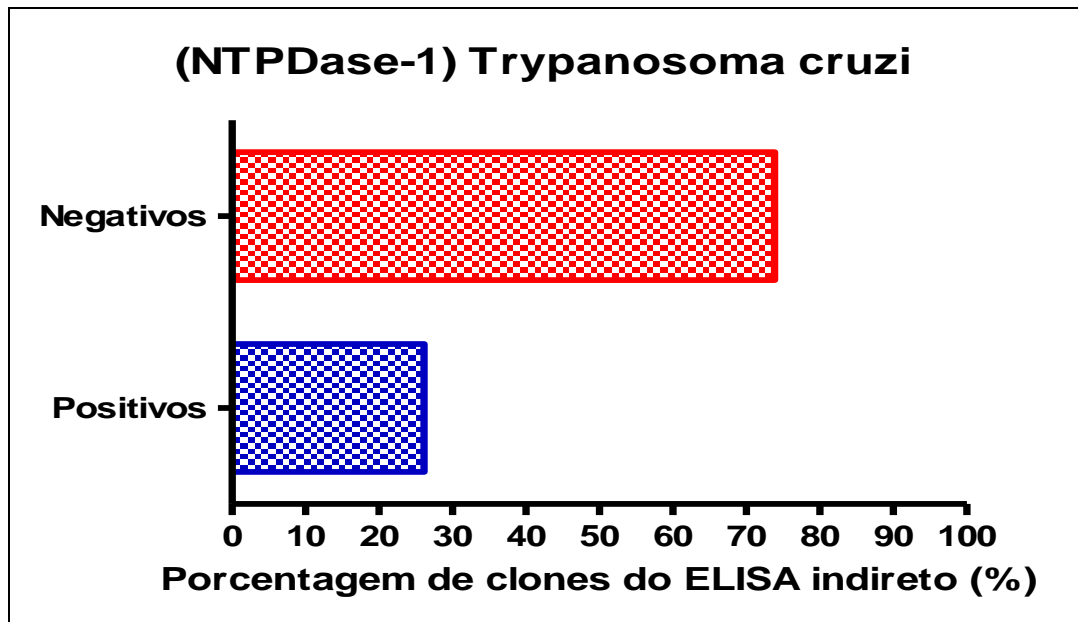
Em torno de 10000 células foram adicionadas aos poços A1 para realização das diluições limitantes (1:2) e o número de células prováveis em cada poço se encontram na tabela 3.

**Tabela 3** - Número de células que provavelmente se encontrariam em cada poço caso fossem adicionadas 10000 células no poço A1 e posteriormente feita a clonagem por diluição limitante.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
Poços	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	5000	2500	1250	625	313	156	78	39	20	10	5	2
B	2500	1250	625	313	156	78	39	20	10	5	2	1
C	1250	625	313	156	78	39	20	10	5	2	1	1
D	625	313	156	78	39	20	10	5	2	1	1	0
E	313	156	78	39	20	10	5	2	1	1	0	0
F	156	78	39	20	10	5	2	1	1	0	0	0
G	78	39	20	10	5	2	1	1	0	0	0	0
H	39	20	10	5	2	1	1	0	0	0	0	0

O sobrenadante das placas; 3-F5; 3-F11; 3-G3; 3-G5; 3-G11; 3-H5; 3-H8 que se realizou diluição limitante foram avaliados pelo ensaio de ELISA indireto, os valores das absorvâncias se encontram nas Tabelas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 presentes no Apêndice 1. Selecionou-se como clones produtores de anticorpos monoclonais os poços positivos que apresentaram uma DO490nm acima do ponto de corte (média dos controles negativos acrescidos de 2 desvio padrão) e também de serem os poços com a probabilidade de ter 0 ou 1 célula, de acordo com a tabela 3. Os anticorpos produzidos por estes clones foram então considerados como anticorpos monoclonais anti-NTPDase-1 de *T. cruzi*. Na

tabela 4 se encontra os anticorpos monoclonais isolados para NTPDase-1 de *T. cruzi*, por diluição limitante nomeados de acordo com a nomenclatura universal (PETERS e BAUMGARTEN, 1992). A nomenclatura para os clones foi baseada no número de fusão (1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>,...), na placa do hibridoma, colunas (números, de 1 ao 12) e linhas (letras, de A até H) presentes nas placas de 96 poços e na placa da diluição limitante. Os resultados das absorvâncias obtidas pela metodologia de ELISA indireto se encontram no apêndice 2. De acordo com estes resultados foram obtidos 49 clones produtores de anticorpos monoclonais anti-NTPDase-1 que equivalem a aproximadamente 27% de clones positivos no teste de diluição limitante (Gráfico 2).



**Gráfico 2** - Relação de clones positivos e negativos a NTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi*. Resultados obtidos pelo método de ELISA indireto, as placas foram sensibilizadas com 0,5µg de proteína recombinante por poço. DO 490 nm.

**Tabela 4** - Relação de clones isolados das diluições limitantes e nomenclatura universal dos anticorpos monoclonais.

Clones	Nomenclatura Ac
3F5 H7	MAB<ENTPDase1TC>1.65.91
3F5 G8	MAB<ENTPDase1TC>1.65.80
3F5 H8	MAB<ENTPDase1TC>1.65.92
3F5 D10	MAB<ENTPDase1TC>1.65.46
3F5 D11	MAB<ENTPDase1TC>1.65.47
3F5 D12	MAB<ENTPDase1TC>1.65.48
3F5 E12	MAB<ENTPDase1TC>1.65.60
3F5 F11	MAB<ENTPDase1TC>1.65.71
3F5 F12	MAB<ENTPDase1TC>1.65.72
3F11 H7	MAB<ENTPDase1TC>1.71.91
3F11 G8	MAB<ENTPDase1TC>1.71.80
3F11G10	MAB<ENTPDase1TC>1.71.82
3F11G11	MAB<ENTPDase1TC>1.71.83
3F11 E9	MAB<ENTPDase1TC>1.71.57
3F11 12B	MAB<ENTPDase1TC>1.71.24
3G3 F8	MAB<ENTPDase1TC>1.75.68
3G3 G8	MAB<ENTPDase1TC>1.75.80
3G3 G11	MAB<ENTPDase1TC>1.75.83
3G3 H6	MAB<ENTPDase1TC>1.75.90
3G3 H7	MAB<ENTPDase1TC>1.75.91
3G3 H8	MAB<ENTPDase1TC>1.75.92
3G3 H9	MAB<ENTPDase1TC>1.75.93
3G5 B12	MAB<ENTPDase1TC>1.77.24
3G5 D11	MAB<ENTPDase1TC>1.77.47
3G5 D12	MAB<ENTPDase1TC>1.77.48
3G5 F8	MAB<ENTPDase1TC>1.77.68
3G5 F9	MAB<ENTPDase1TC>1.77.69
3G5 F10	MAB<ENTPDase1TC>1.77.70
3G5 F11	MAB<ENTPDase1TC>1.77.71
3G11D7	MAB<ENTPDase1TC>1.83.43
3G11D10	MAB<ENTPDase1TC>1.83.46
3G11D11	MAB<ENTPDase1TC>1.83.47

---

3G11F12	MAB<ENTPDase1TC>1.83.72
3G11 G12	MAB<ENTPDase1TC>1.83.84
3G11 H7	MAB<ENTPDase1TC>1.83.91
3H5 F8	MAB<ENTPDase1TC>1.89.68
3H5 G8	MAB<ENTPDase1TC>1.89.80
3H5 F9	MAB<ENTPDase1TC>1.89.69
3H5 F10	MAB<ENTPDase1TC>1.89.70
3H5 C11	MAB<ENTPDase1TC>1.89.35
3H5 E11	MAB<ENTPDase1TC>1.89.59
3H5 H11	MAB<ENTPDase1TC>1.89.95
3H8 G8	MAB<ENTPDase1TC>1.92.80
3H8 F9	MAB<ENTPDase1TC>1.92.69
3H8 E10	MAB<ENTPDase1TC>1.92.58
3H8 F10	MAB<ENTPDase1TC>1.92.70
3H8 G10	MAB<ENTPDase1TC>1.92.82
3H8 H10	MAB<ENTPDase1TC>1.92.94
3H8 G11	MAB<ENTPDase1TC>1.92.83
3H8 G12	MAB<ENTPDase1TC>1.92.84

---

MAB (anticorpo monoclonal), ENTPDase1(), TC (*Trypanosoma cruzi*), 1º nº: a fusão realizada, 2º nº: posição na placa de 96 poços do hibridoma, 3º nº posição na placa de 96 poços do clone . A contagem na placa é de forma contínua por linhas de 1 a 96

---

### 5.5 Avaliação da especificidade dos anticorpos produzidos pelos clones produtores de anticorpos monoclonais anti-NTPDase-1 de *T. cruzi*.

A avaliação da especificidade foi realizada através do ensaio de ELISA indireto com o sobrenadante dos poços positivos das placas (3-F11; 3-F5; 3-G3; 3-G5; 3-G11; 3-H5; 3-H8) que se realizou diluição limitante (apêndice 2) e se encontram os monoclonais produtores de anticorpos anti-NTPDase-1 de *T. cruzi*. As placas foram sensibilizadas com 0,5 µg de NTPDase-1 de *Leishmania infantum chagasi* sendo que 10 clones apresentaram valores acima do cut off o que representa aproximadamente 21% dos clones, sendo portanto positivos também para a NTPDase-1 de *Leishmania infantum chagasi*. Os resultados das absorvâncias obtidas pela metodologia de ELISA indireto para avaliação da especificidade se encontram no apêndice 3. Tanto a NTPDase-1 de *T. cruzi*

quanto a de *L. Chagasi* apresentam regiões homólogas que pode em síntese justificar essas reações cruzadas conforme observado na Figura 16, as regiões conservadas de apirase podem ser as seqüências reconhecidas na reação cruzada por estes anticorpos, uma vez que a especificidade da produção de anticorpos é obtida devido ao fato de uma única célula reconhecer apenas um epítopo, pois todos os seus receptores são idênticos. Estes, se localizam na superfície dos linfócitos maduros. Para que isto seja possível, existem processos que garantem que apenas um tipo de receptor seja sintetizado em cada célula, mantendo assim, a especificidade. Devido aos anticorpos poderem reconhecer estas regiões relativamente pequenas dos antígenos, ocasionalmente, podem achar epítomos similares em outras moléculas, ocorrendo a chamada reação cruzada (DEVENS, 2009).

Para este trabalho foi importante isolarmos tanto os mAbs específicos para a NTPDase-1 de *T. cruzi* quanto aqueles que reconhecem de forma cruzada a NTPDase-1 de *L. infantum chagasi*, já que estes poderão ser aplicados futuramente em diferentes situações.



## *6 Conclusões*

---

A NTPDase-1 de *T. cruzi* foi purificada de forma eficiente.

A imunização dos camundongos com a NTPDase-1 de *T. cruzi* permitiu a produção de um soro policlonal anti- NTPDase-1 de *T. cruzi*.

Houve a produção de hibridomas secretores de anticorpos policlonais que reconheceram a NTPDase-1 de *T. cruzi*.

Houve a seleção de clones secretores de anticorpos monoclonais anti-NTPDase-1 de *T. cruzi*, os quais se identificaram positivos através de ELISA indireto; bem como a seleção de clones secretores de anticorpos monoclonais que também reconheceram a NTPDase-1 de *Leishmania infantum chagasi*.

Temos como perspectivas a seleção dos anticorpos monoclonais anti-NTPDase-1 de *T. cruzi* que serão usados como ferramentas específicas para avaliação da localização subcelular no parasito, do papel desta proteína na infecção *in vitro* pelo *T. cruzi*. E utilizá-los em aplicações biotecnológicas como produção de kits de imunodiagnóstico e imunoterapia.

---

*7 Referências Bibliográficas*

ABBAS A.K, LINCHTMAN A.H, POBER, J.S. Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: ELSEVIER, 2005. 580p.

ABBRACCHIO, M. P. e G. BURNSTOCK. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? Pharmacol Ther, v.64, n.3, p.445-75. 1994.

ABBRACCHIO, M. P., G. BURNSTOCK, *et al.* Purinergic signalling in the nervous system: an overview. Trends Neurosci, v.32, n.1, Jan, p.19-29. 2009.

ASAI, T.; O'SULLIVAN, W. J.; TATIBANA, M. A potent nucleoside triphosphate hydrolase from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. Purification, some properties, and activation by thiol compounds. *J. Biol. Chem.*, Vol. 258, Issue 11, 6816-6822. 1983.

AUFDERHEIDE, A. C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GURL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS, L. E. Jr.; FORNACIARI, G.; ALLISON, N. M. (2004). A 9.000-year record of Chagas disease. Proc Natl Acad Sci USA 101, 2034–9

BIGONNESSE F.; LE´VESQUE, S. A.; KUKULSKI, F. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. Biochemistry.43: 5511Y9. 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method quantatin of microgram quantites of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Analytical biochemistry, v.72, p.248-254. 1976.

BRITTO, C.; CARDOSO, M.A.; VANNI, C.M.M.; HASSLOCHER-MORENO, A.; XAVIER, S.S.; OELEMANN, W.; SANTORO, A.; PIRMEZ, C.; MOREL, C.M.; WINCKER, P. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosisand treatment evaluation. Parasitology, 110, 241-247. 1995

BOENISCH, T. (Ed.) Immunochemical Staining Methods, 3ª ed., Califórnia: Dako, 2001.

BOURS, M. J., E. L. Swennen, *et al.* 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 quantatin of microgram quantites of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Anal biochemistry, v.72, p.248-254. 1976.

BURLEIGH, B. A. WOOLSEY, A. M. Cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion cellular. Microbiology. V.4 (11), p.701-711, 2002.

BURNSTOCK, G. Potential therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signaling. Clinical Medicine, v. 2 n 1 Jan/Feb, p 45-53, 2002

CARLIER, Y. T., F. "Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control." Rev Soc Bras Med Trop, v.36, n.6, p.767-71. 2003.

CAMPBELL, A.M.; Monoclonal and immunosensor technology. Amsterdam: Elsevier, 1991.

CARDOZO, R.M. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra o vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas. 69f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1998.

CARVALHO, T.U.; DE SOUZA, W. Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. ver. Inst. Méd. Trop. São Paulo. V.28 (4), p.205-212, 1986.

CASTRO A.M., LUQUETTI AO, RASSI A, RASSI GG, CHIARI E, GALVÃO LMC. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Res 88: 894-900. 2002.

CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. . Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.1, p.159-218. 1909.

CERISOLA J.A., CHABEN M.F., LAZZARI J.O. 1962. Test de hemaglutinación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Prensa Méd Argent 49: 1761-1767.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. OUTLOOK Chagas Diseases, Nature. 2010.

COURA, J.R.; DE CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo CRUZ. V.97(1), P.3-24,2002.

COUTINHO, M. L. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra LipL32, uma proteína de membrana externa de leptospiros patogênicas.. 43f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul. 2005.

COUTINHO-SILVA, R., C. MONTEIRO DA CRUZ, *et al.* The role of P2 receptors in controlling infections by intracellular pathogens. Purinergic Signal, v.3, n.1-2, Mar, p.83-90. 2007.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Current Pharmaceutical Design. V.8, p.269-285, 2002.

DEVENS, B.A. Produção de hibridomas e clones para obtenção de anticorpos monoclonais anti-*Neospora caninum* Nc-1 (Apicomplexa, Sarcocystidae). 2009. 73f. Dissertação (mestrado). Viçosa: UFV.

DIAS, J. C. P. Globalization, inequity and Chagas disease. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 23 Sup 1:S13-S22, 2007.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O.H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Quím. Nova.*, vol.32, n.9, pp. 2444-2457, 2009.

DIAS-LIMA, A. C.; SHERLOCK, J. A. Sylvatic vectors invading houses and risk of emergence of cases of Chagas disease in Salvador State of Bahia, Northeast Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 95 p. 611, 2000.

DOCAMPO, R.; MORENO, S.N.J. Free radical metabolism of antiparasitic agents. *Fed. Proceed.* V.45, p.2471-2476, 1986.

DOCAMPO, R. 2001. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Design* 7: 1157-1164.

ELSTROM RL, MARTIN P, LEONARD JP., New biologic agents and immunologic strategies, *Hematology/oncology clinics of North America*, 2008

EL KOUNI, M. H. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. *Pharmacol Ther.* (3):283-309. 2003.

FIETTO, J. L. R.; DEMARCO, R.; NASCIMENTO, I. P.; CASTRO, I. M.; CARVALHO, T. M. U.; SOUZA, W.; BAHIA, M. T.; ALVES, M. J M.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. (2004). Characterization And Immunolocalization Of An NTP-Diphosphohydrolase Of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 316 (2): 454-460

FUNARI, M. F. A.; GUERRA, J. C. C.; FERREIRA, E; PASTERNAK, J.; BOROVIK, C. L.; KANAYAMA, R. H.; NOZAWA, S. T.; MENDES C E. A. BRITO, A. C. M.; FAULHABER, M. H. W. ; BACAL, N. S. Multiple Myeloma: 50 cases diagnosed by flow cytometry. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 27(1):31-36. 2005.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=69>. Acessado em 22 de julho de 2010.

GUEDES, P.M.M.; URBINA, J.A.; DE LANA, M.; AFONSO, L.C.C.VELOSO, M.; TAFURI, W.L.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; CHIARI, E.; BAHIA, M.T. Activity of the new triazole Derivative Albaconazole against *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* in Dog Hosts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. V.48(11), p.4286-4292, 2004.

GODING J. W. *Monoclonal antibodies: Principles and Practice*. London: Academic Press Limited, 315p. 1986.

- GÓMEZ, S. Y. M. Produção de clones secretores de anticorpos (IgG) contra o vírus da doença infecciosa bursal. 2007. 68f. Dissertação (mestrado). Viçosa: UFV.
- HANDA, M.; GUIDOTTI, G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohidrolase (apirase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). Biochem Biophys Res Commun v. 218, p. 916-23, 1996.
- HARLOW, E., LANE, D. Antibodies, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA, 1988, 726p.
- HARLOW E, LANE D. Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- HUEB, M.F.D. Doença de Chagas: indicadores cognitivos de transtornos orgânico cerebral, de uso de álcool e qualidade de vida. 2006. 153f. Tese (doutorado). Ribeirão Preto: USP.
- KALKS, K. H. M. Produção de anticorpos monoclonais anti-SBm7462®. 2008. 45f. Monografia. Viçosa: UFV
- KÖHLER G, MILSTEIN C, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Journal of Immunology, 1975.
- KUKULSKI, F.; LE´VESQUE, S. A.; LAVOIE, E. G.; LECKA, J.; BIGONNESSE, F.; KNOWLE, A. F.; ROBSON, S. C.; KIRLEY, T. L.; SE´VIGNY, J. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. Purinergic Signalling 1: 193–204. 2005.
- KUNRATH, C. F.; VOGEL, F. S. F.; OLDONI, I.; FLORES, E. F.; DEZENGRINI, R. W. R.; TORRES, F. D.; PAN, K. A. Soroneutralização e imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais no diagnóstico rápido de infecções pelo herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BHV-1 e BHV-5). Ciência Rural, Santa Maria, v.34, n.6, p.1877-1883, nov-dez, 2004.
- LALIBERTE, J. F; BEAUDOIN, A. R.. Sequential hydrolysis of the gamma- and beta-phosphate groups of ATP by the ATP diphosphohidrolase from pig pancreas. Biochim Biophys Acta, v.742, n.1, Jan 12, p.9-15. 1983.
- LAVOIE, E. G.; KUKULSKI, F.; LE´VESQUE, S. A. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohidrolase-3. Biochem Pharmacol 67: 1917Y26. 2004.
- LEY, V.; ROBBINS, E.S.; NUSSENZWEIG, V.; ANDREWS, N> W. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. Journal Experimental Medicine. V.171 (2), p.401-403, 1990.
- LIDDELL, J. E.; CRYER, A. A practical guide to monoclonal antibodies. In: John Wiley e Sons (Ed). 1991, 188 p.

LIPMAN, N. S; JACKSON, L. R.; TRUDEL, L. J.: WEIS-GARCIA, F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information. ILAR Journal. V.46, p.258-268, 2005.

LITTLE M.; KIPRIYANOV, F.; LE GALL F.; MOLDENHAUER G..Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. Immunol. Today, v.21 p.364- 370. 2000.

LUQUETTI A.O., RASSI A. Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo Trypanosoma cruzi. In: Z Brener, Z Andrade, M Barral-Neto (eds), Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas, 2. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 344-378. 2000.

LUZ, Z.M.P., COUTINHO, M.G., CANÇADO, J.R., KRETTLI, A.U. Hemocultura: Técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop 27: 143-148. 1994.

MATEO, I.; HARDEN, T. K.; BOYER, J. L. Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase. Br J Pharmacol 128:396Y402. 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível: <http://www.fiocruz.br/chagas>. Acessado em 30/ Jun/2010.

MILSTEIN C., Monoclonal antibodies, Sei Am. 1980; 243: 56-64

MICELI, M. C.; PARNES, J.R. The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. Adv Immunology, v.53, p.59-122. 1993.

MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.98, n.5, p.577-91, Jul. 2003.

MOORE, G. E; GENER, R. E.; FRANKLIN, H. A. Culture of normal human leukocytes. JAMA. v.199, p.519-524, 1967.

MOORE, G. E.; WOODS, L. K. Culture media for human cells – RPMI 1634, RPMI 1640 and GEM 1717. Tissue Culture Association Manual. V3, p.503-508, 1976.

MORALES, J.C. Técnicas de diagnóstico en virología. Ediciones Díaz de Santos, Madrid España, p.79–103. 1993.

NEVES, David Pereira. Parasitologia Humana. 11. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

NRC [National Research Council]. Monoclonal Antibody Production. Washington DC: National Academy Press, 1999.

PETERS, J.H.; BAUMGARTEN, H.; Monoclonal antibodies. Springer-Verlag, Berlin, 487 p., 1992.

PICHER, M.; SEVIGNY, J.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; BEAUDOIN, A. R. Hydrolysis of P2-purinoceptor agonists by a purified ectonucleotidase from the bovine aorta, the ATP-diphosphohydrolase. Biochem Pharmacol 51: 1453Y60. 1996.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. The Lancet Infectious Diseases, 1, 92-100, 2001.

POLAK, A; RICHLE, R. Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative benznidazole. Ann. Trop. Med. Parasitol. V.72(1), p.45-54, 1978.

RALEVIC, V; BURNSTOCK, G. Receptores for purines and pyrimidines, Pharmacological Reviews. V.50(3), p.413-492, 1998.

ROUGE, M. (2002). Counting Cells with a Hemacytometer. Disponível: <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/semeneval/hemacytometer.html>. Acessado em 25 de junho de 2010.

SALES-JUNIOR P.A. Utilização de microesferas biodegradáveis PLGA como sistema de liberação para a vacina sintética SBm7462 no controle do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): modelo experimental em camundongos. 2003, 94f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SAMBROOK, J., FRITSCH, MANIATIS E. F., and, T. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Pr. 1987.

SANTOS, R. F. Caracterização e avaliação da atividade ecto-nucleotidásica do *Trypanosoma cruzi* sua relação com a ainfetividade in vitro. 2008. 128. Dissertação (mestrado) Ouro Preto:UFOP.

SANTOS, R. F., M. A. Possa, *et al.* Influence of Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence. PLoS Negl Trop Dis, v.3, n.3, p.e387. 2009.

SAÉZ-ALQUÉZAR A., LUQUETTI A.O., PEREIRA J.B., MOREIRA E.F., GADELHA M.F.S., GARCIA-ZAPATA M.T., ARRUDA A.H.S. (1997). Estudo multicêntrico: avaliação do desempenho de conjuntos diagnósticos de hemaglutinação indireta, disponíveis no Brasil, para o diagnóstico sorológico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Rev Patol Trop 26: 343-374.

SCHECHTER M., LUQUETTI A.O., REZENDE J.M., RASSI A., MILES M.A. Further evaluation of lectin affinity purified glycoprotein (GP90) in the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 79: 637-640. 1985.

SCHICKER, K.; HUSSL S.; CHANDAKA G.; KOSENBURGER K.; YANG J.; WALDHOER M.; SITTE H.H.; BOEHM S. A membrane network of receptors and enzymes for adenine nucleotides and nucleosides. Biochimica et Biophysica Acta p. 325–334, 2009.

SCHUNK, M. K.; MACALLUM G. E. Applications and optimization of immunization procedures. ILAR Journal. V.46, n.3, p.241-257, 2005.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A.P.; TOLEDO-MONTEVERDE, D.; MORAES-MARTINS, G. MAJESKI-COLOMBO M.; MESSEDER, J.C. ANTONIO V.E. Human neuroinfection by *Trypanosoma cruzi*. Rev. Neurocienc. p. 310-315. 2008

SHULMAN, M., WILDE, C. D., KOHLER, G. A better cell line for making hybridomas secreting antibodies. Nature, v. 276, p.269-270, 1978.

SMITH, T. M.; KIRLEY, T. L. Site-directed mutagenesis of a human brain ecto-apyrase: Evidence that the E-type ATPases are related to the actin/heat shock 70/sugar kinase superfamily. Biochemistry 38: 321Y8. 1999.

SOUZA, R. F. Expressão Heteróloga, Purificação e avaliação do uso da E-NTPDase (GDPase) de *leishmania major* cmo Antígeno Recombinante no Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. 2009. 75f. Dissertação (mestrado). Viçosa: UFV.

TAN, F., HU X. Monoclonal antibodies against nucleoside triphosphate hydrolase-II can reduce the replication of *Toxoplasma gondii*. Parasitol Int, v.59, n.2, Jun, p.141-6. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chaga: the disease. 2006. Disponível em: <http://who.int/ctd/chagas/disease.htm>. Acessado em 29 maio 2010.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol; 362(4-5):299-309. 2000.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. Drug Development Research.52: 44-56. 2001.

ZOLA, H.; Introduction. In:ZOLA, H. Monoclonal Antibodies: The Second Generation. Oxford: BIOS Scientific Publ., p.205, 1995.

*Apêndices*

---

## APÊNDICE 1

### Resultados ELISA indireto para NTPDase-1 *Trypanosoma cruzi*

**Tabela 1** - Resultado do teste de ELISA-indireto para avaliação do sobrenadante da placa 3-F5. Poços sensibilizados com 0,5 µg de NTPDase-1 *T. cruzi*. Densidade óptica obtida a 490 nm.

Poço	DO	Resultado
H7	0,103	Positivo
G8	0,098	Positivo
H8	0,096	Positivo
D10	0,096	Positivo
D11	0,093	Positivo
F11	0,098	Positivo
D12	0,095	Positivo
E12	0,105	Positivo
F12	0,093	Positivo
<b>Média Controles Negativos</b> 0,0885	<b>Desvio padrão</b> 0,000707	<b>“Cut-off”</b> 0,089

**Tabela 2** - Resultado do teste de ELISA-indireto para avaliação do sobrenadante da placa 3-F11. Poços sensibilizados com 0,5 µg de NTPDase-1 *T. cruzi*. Densidade óptica obtida a 490 nm.

Poço	DO	Resultado
H7	0,095	Positivo
G8	0,096	Positivo
E9	0,098	Positivo
G10	0,097	Positivo
G11	0,097	Positivo
B12	0,099	Positivo
<b>Média Controles Negativos</b> 0,0915	<b>Desvio padrão</b> 0,000707	<b>“Cut-off”</b> 0,092

**Tabela 3** - Resultados do teste de ELISA-indireto para avaliação do sobrenadante da placa 3-G3. Poços sensibilizados com 0,5 µg de NTPDase-1 *T. cruzi*. Densidade óptica obtida a 490 nm.

Poço	DO	Resultado
H6	0,100	Positivo
H7	0,098	Positivo
F8	0,103	Positivo
G8	0,156	Positivo
H8	0,098	Positivo
H9	0,096	Positivo
G11	0,191	Positivo
<b>Média Controles Negativos</b> 0,0875	<b>Desvio padrão</b> 0,002121	<b>“Cut-off”</b> 0,091

**Tabela 4** - Resultado do teste de ELISA-indireto para avaliação do sobrenadante da placa 3-G5. Poços sensibilizados com 0,5 µg de NTPDase-1 *T. cruzi*. Densidade óptica obtida a 490 nm.

Poço	DO	Resultado
F8	0,096	Positivo
F9	0,107	Positivo
F10	0,101	Positivo
D11	0,090	Positivo
F11	0,105	Positivo
B12	0,092	Positivo
D12	0,101	Positivo
<b>Médias Controle Negativos</b> 0,0845	<b>Desvio padrão</b> 0,000707	<b>“Cut-off”</b> 0,085

**Tabela 5** - Resultado do teste de ELISA-indireto para avaliação do sobrenadante da placa 3-G11. Poços sensibilizados com 0,5 µg de NTPDase-1 *T. cruzi*. Densidade óptica obtida a 490 nm.

Poço	DO	Resultado
D7	0,111	Positivo
H7	0,095	Positivo
D 10	0,093	Positivo
D11	0,085	Positivo
F12	0,084	Positivo
G12	0,085	Positivo
<b>Média Controles Negativos</b> 0,079	<b>Desvio padrão</b> 0,001414	<b>“Cut-off”</b> 0,081

**Tabela 6** - Resultado do teste de ELISA-indireto para avaliação do sobrenadante da placa 3-H5. Poços sensibilizados com 0,5 µg de NTPDase-1 *T. cruzi*. Densidade óptica obtida a 490 nm.

Poço	DO	Resultado
F8	0,117	Positivo
G8	0,113	Positivo
F9	0,105	Positivo
F10	0,103	Positivo
C11	0,101	Positivo
E11	0,104	Positivo
H11	0,100	Positivo
<b>Média Controles Negativos</b> 0,084	<b>Desvio padrão</b> 0,002828	<b>“Cut-off”</b> 0,089

**Tabela 7** - Resultado do teste de ELISA-indireto para avaliação do sobrenadante da placa 3-H8. Poços sensibilizados com 0,5 µg de NTPDase-1 *T. cruzi*. Densidade óptica obtida a 490 nm.

Poço	DO	Resultado
G8	0,100	Positivo
F9	0,095	Positivo
E10	0,098	Positivo
F10	0,103	Positivo
G10	0,156	Positivo
H10	0,098	Positivo
G11	0,096	Positivo
G12	0,092	Positivo
<b>Média Controles Negativos</b> 0,088	<b>Desvio padrão</b> 0,001414	<b>“Cut-off”</b> 0,090

## APÊNDICE 2

### Resultados ELISA indireto para NTPDase-1 *Leishmania infantum chagasi*

**Tabela 12** - Resultado do teste de ELISA-indireto para avaliação do sobrenadante. Poços sensibilizados com 0,5 µg de NTPDase-1 *L. chagasi*. Densidade óptica obtida a 490 nm.

Placa	Poço	DO	Resultado
3-F5	D10	0,072	Positivo
3-G5	D11	0,073	Positivo
3-G5	F11	0,068	Positivo
3-H5	F9	0,078	Positivo
3-H5	F10	0,068	Positivo
3-H8	E10	0,076	Positivo
3-H8	F10	0,079	Positivo
3-H8	G10	0,084	Positivo
3-H8	H10	0,081	Positivo
3-H8	F9	0,105	Positivo
	<b>Médias Controle Negativos</b> 0,064	<b>Desvio padrão</b> 0,002121	<b>“Cut-off”</b> 0,068

*Anexo*

---

## Anexo A

### CERTIFICADO

A Comissão de Ética do DVT / UFV certifica que o processo n.º 50/2009, intitulado “Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra NTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi*” coordenado pela Professora Juliana Lopes Range Fietto do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular está de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em 18/8/2009.

### CERTIFICATE

The Ethic Committee of DVT / UFV certify that the process number 50/2009, named “Production and characterization of monoclonal antibodies against NTPDase-1 from *Trypanosoma cruzi*” is in agreement with the Medical Veterinary Professional Ethics Code, with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and with actual Brazilian legislation. This Departmental Commission on August 18, 2009 approved this process.

Viçosa, 18 de agosto de 2009

  
\_\_\_\_\_  
Presidente da Comissão de Ética  
Depto. de Veterinária / UFV