

LUANA CELINA SERAPHIM CUNHA

IMUNOLOCALIZAÇÃO DA NUCLEOSÍDEO TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASE
1 (NTPDASE-1) DE *Trypanossoma 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

LUANA CELINA SERAPHIM CUNHA

IMUNOLOCALIZAÇÃO DA NUCLEOSÍDEO TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASE
1 (NTPDASE-1) DE *Trypanossoma 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: 15 de março de 2010.

Prof. Clovis Andrade Neves
(Coorientador)

Profa. Dra. Jacenir Reis dos Santos
Mallet

Prof. Leandro Licursi de Oliveira

Prof. José Roberto Meyer Fernandes

Profa. Juliana Lopes Rangel Fietto
(Orientadora)

PRÓLOGO

O que escrevo, não representa necessariamente o que estou disposto a assumir como meu, particular, pessoal, individual. É a possibilidade de ser outro sem realmente o ser, ou de não o ser, essa é a beleza, essa é a poética.

Uma **analogia** é uma relação de equivalência entre duas outras relações. E a linguagem um conjunto de relações sintáticas. O **análogo poético** seria então inventar novas equivalências entre essas relações sintáticas.

Portanto esse livro é para aqueles que se dispõem a inventar, a sonhar, e a tentar ter um espírito-livre... e não para o homem-comum. O homem-comum demonstra dificuldades para perceber os limites entre o que deseja e o que fora induzido a querer. Entenda-se por espírito-livre, sem conotações metafísicas, apenas o poder de escolher, de assumir suas responsabilidades, sem atribuí-las a uma doutrina pronta.

O espírito-livre não prospera em ambientes prontos, acabados, fechados. Ele necessita apenas deste instante, este agora, e de suas experiências para assumir suas responsabilidades. O espírito-livre é um experimentalista por natureza. A sua filosofia não ensina a pensar como ele, mas sim a pensar por si só.

Penso que estamos preparados para começar...

Rafael Figueira

À minha família, em especial aos meus pais - Maria Perpétua Seraphim e José Mário Cunha, alicerces da minha formação pessoal e profissional, e ao meu querido irmão André Luiz (Dedé) pela amizade e cumplicidade em todos os momentos.

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

A elaboração de uma dissertação de mestrado é um produto coletivo embora sua redação, responsabilidade e estresse seja predominantemente individual. Várias pessoas contribuíram para que este trabalho chegasse a bom termo. A todas elas registro minha imensa gratidão!

À energia suprema, criadora do universo, pelo dom da vida, por estar aqui e poder encher de ar os pulmões.

À minha família, sobretudo aos meus pais, por ter proporcionado minha formação não só acadêmica, mas também pessoal.

Ao povo brasileiro por ter custeado meus estudos, desde os primeiros anos.

À Universidade Federal de Viçosa, pelo ensino público e de qualidade.

Ao Pesquisador Carlos Chagas, o desbravador de um caminho que hoje muitos pesquisadores brasileiros estão seguindo, mirando-se no seu exemplo único e admirável de cientista, e formador de investigadores para lidar com problemas que atingem a gente brasileira.

À professora Juliana L. R. Fietto, exemplo de pesquisadora. Obrigado por fazer do meu aprendizado não um trabalho, mas um contentamento. Por me ajudar a descobrir o que fazer de melhor e, assim, fazê-lo cada vez melhor. Obrigado por afastar o medo das coisas que pudesse não compreender, levando-me, por fim, a compreendê-las.

Ao professor Clóvis Andrade Neves, meus irrestritos agradecimentos, pelos ensinamentos, disponibilidade e amizade desses anos todos.

Ao professor Leandro Licursi de Oliveira, meus abertos agradecimentos, pelas idéias sempre bem vindas, pela atenção e solicitude em ajudar sempre.

À Professora Maria Terezinha Bahia, meus sinceros agradecimentos por ter aberto as portas do seu laboratório e me acolhido como um dos seus.

Ao professor Sérgio Oliveira de Paula pelo suporte técnico, e ao Robertinho, facilitador do processo.

À Pesquisadora Jacenir Reis dos Santos Mallet, pessoa muito simpática, de coração bom, sempre disposta a ajudar.

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

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

À pesquisadora Simone Freitas, por me apresentar o IOC, ser o pombo correio dessa dissertação.

Ao Felipe, parceiro de trabalho, com quem compartilhei os entraves, percalços e também as glórias desse projeto.

Ao Ramon, pelo conhecimento adquirido na prática no Laboratório de Doença de Chagas, e as cervejas no fim do expediente.

Ronny, por ceder gentilmente GDPase.

Felipe Lemos pela assistência técnica.

Ao Ivo pela pelas ajudas nas coletas, e cultivos, nem tenho palavras, Obrigadão!

Aos amigos do LIMA, pela “proximidade” do convívio, experiências compartilhadas no dia a dia...

Ao amigo Senhor Valdir, peça fundamental para o funcionamento do LIMA, pelas discussões futebolísticas da segunda-feira.

À Kiki, por ter cruzado meu caminho, pela paciência, pelos ensinamentos do mundo, carinho, e o imensurável companheirismo.

À amiga Mariana Lanna, por todos esses anos de amizade, pelos galhos quebrados durante essa caminhada acadêmica, todas as risadas compartilhadas.

Aos meus amigos, por existirem e fazer da minha vida mais divertida.

Enfim... A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	2
2.1. Doença de Chagas.....	2
2.2. <i>Trypanossoma cruzi</i>	4
2.3. As Ecto-NTPDases.....	11
2.4. Nucleotídeos extracelulares.....	14
2.5. Purinoreceptores.....	17
2.6. Metabolismo de purinas e atividade ATPásica em endoparasitas.....	21
3. Objetivos.....	26
3.1. Objetivos gerais.....	26
3.2. Objetivos específicos.....	26
4. Materiais e Métodos.....	27
4.1. Animais.....	27
4.2. População de <i>T. cruzi</i>	27
4.3. Cultivo de células VERO.....	27
4.4. Infecção de células VERO.....	28
4.5. Coleta de tripomastigotas e obtenção de epimastigotas e amastigotas.....	28
4.6. Obtenção da NTPDase-1 recombinante.....	30
4.7. Produção do antisoro policlonal anti-NTPDase 1 de <i>T. cruzi</i>	30
4.8. Produção da resina de afinidade acoplada á NTPDase-1.....	30
4.9. Purificação dos anticorpos IgG anti-NTPDase1 de <i>T. cruzi</i>	31
4.10. Determinação do Título dos anticorpos purificados.....	32
4.11. Imunodeteção por <i>Western blot</i> da NTPDase-1.....	33
4.12. Imunodeteção da NTPDase-1 por <i>Western blot</i> em extrato de tripomastigota e epimastigota de <i>T. cruzi</i>	33
4.13. Imunolocalização da NTPDase-1 nas três formas evolutivas <i>T. cruzi</i>	34

4.14. Ensaio de imunofluorescência em epimastigotas.....	34
5. Resultados e Discussão.....	36
5.1. Purificação da NTPDase-1 heteróloga de <i>T. cruzi</i>	36
5.2. Purificação e titulação dos anticorpos específicos.....	38
5.3. Avaliação da especificidade do pool de anticorpos purificados.....	39
5.4. Imunodeteção de NTPDase-1 de <i>T. cruzi</i> em extrato total de tripomastigota de primeira passagem usando soro policlonal e os anticorpos purificados.....	41
5.5. Imunodeteção NTPDase -1 <i>T. cruzi</i> em extrato total de epimastigota com soro policlonal e o anticorpos purificados e anti CD39 humano.....	43
5.6. Imunolocalização da NTPDase1 em parasito vivos não permeabilizados.....	50
5.7. Imunofluorescência de epimastigota permeabilizados.....	61
6. Considerações Finais.....	64
7. Referências Bibliográficas.....	65

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Página
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
Figura 2. Formas morfológicas de <i>T. cruzi</i>	8
Figura 3. Esquema geral da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> mostrando as principais estruturas celulares observadas em seções de microscopia eletrônica.....	9
Figura 4. Topologia de membrana e propriedades catalíticas das diferentes famílias de ectonucleotidases.....	13
Tabela 1. Subtipos de receptores P1e P2, ligantes fisiológicos e distribuição em células do sistema imune.....	20
Figura 5. NTPDase-1 de <i>T. cruzi</i> purificada.....	37
Figura 6. Titulação do pool de anticorpos purificados anti-NTPDase-1 de <i>T. cruzi</i>	39
Figura 7. Avaliação da especificidade do pool de anticorpos purificados anti-NTPDase-1 através da análise de imunoreatividade cruzada com a E-NTPDase de <i>L. major</i> (GDPase).....	40
Figura 8. Imunodeteção da NTPDase-1 de <i>T. cruzi</i> , utilizando anticorpo anti NTPDase-1 <i>T. cruzi</i> purificado e soro policlonal em extrato bruto de tripomastigotas de primeira passagem.....	42
Figura 9. Imunodeteção da NTPDase-1 de <i>T. cruzi</i> , utilizando soro policlonal anti NTPDase-1 (1:1000), anticorpos purificados anti NTPDase-1 (1:1000) e Anti CD 39 de humano (1:1000).....	45
Figura 10. <i>Western blot</i> de extratos protéicos de epimastigotas utilizando como anticorpo primário Anti CD39 de humano.....	48
Figura 11. Microscopia confocal de tripomastigotas marcados com anticorpos anti NTPDase-1 (Anti CD39) e anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc.....	52
Figura 12. Microscopia confocal de tripomastigota marcados com anticorpos anti NTPDase-1 Purificado e anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc.....	52
Figura 13. Microscopia confocal de tripomastigota marcados com anticorpos anti NTPDase-1 policlonal e anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc.....	53
Figura 14. Microscopia confocal de tripomastigota, (controle negativo) incubados soro pré imune e anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc.....	53
Figura 15. Microscopia confocal de tripomastigota, (controle negativo) incubados somente com anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc.....	54
Figura 16. Microscopia confocal de amastigotas marcados com anticorpos anti NTPDase-1 (Anti CD39) e anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc.....	54
Figura 17. Microscopia confocal de amastigotas marcados com anticorpos anti NTPDase-1 Purificado e anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc.....	55
Figura 18. Microscopia confocal de amastigotas marcados com anticorpos anti NTPDase-1 Policlonal e anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc.....	55
Figura 19. Microscopia confocal de amastigota, (controle negativo) incubados soro pré imune e anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc.....	56
Figura 20. Microscopia confocal de amastigota, (controle negativo) incubados somente com	

anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc.....	57
Figura 21. Microscopia confocal de Epimastigotas marcados com anticorpos anti NTPDase-1 Purificado e anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc.....	58
Figura 22. Microscopia confocal de Epimastigotas marcados com anticorpos anti NTPDase-1 Policlonal e anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc.....	58
Figura 23. Microscopia confocal de epimastigota, (controle negativo) incubados soro pré imune e anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc.....	59
Figura 24. Microscopia confocal de epimastigotas, (controle negativo) incubados somente com anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc.....	59
Figura 25. Microscopia de fluorescência, marcados com anticorpos anti NTPDase-1.....	62

RESUMO

CUNHA, Luana Celina Seraphim, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2010. **Imunolocalização da nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1 (NTPDase-1) de *Trypanosoma cruzi***. Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto. Coorientadores: Márcia Rogéria de Almeida Lamego e Clovis Andrade Neves

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado da Ordem Kinetoplastida, agente etiológico da Doença de Chagas. As ecto-nucleotidasas da família E-NTPDases são enzimas capazes de hidrolisar nucleotídeos tri e/ou difosfatados nos seus produtos monofosfatados. Os nucleotídeos extracelulares são conhecidos como moléculas sinalizadoras envolvidas com vários processos celulares, incluindo a sinalização purinérgica relacionada à mediação da resposta imune de mamíferos. Mecanismos envolvidos na degradação dessas moléculas são importantes na infecção por *T. cruzi* e outros patógenos intracelulares. A Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase 1 (NTPDase-1) de *T. cruzi* é uma ecto-nucleotidase da família E-NTPDase, que hidroliza nucleotídeos extracelulares, apontada como molécula importante para o processo infectivo *in vitro* e virulência do parasito em modelo murino. O presente trabalho se propôs a avaliar a Imunolocalização da (NTPDase-1) em três formas morfológicas da cepa Y do parasito *T. cruzi*. Produção e purificação de anticorpos anti NTPDase-1 recombinante de *T. cruzi* através de cromatografia de afinidade em resina de agarose acoplada a NTPDase1 recombinante purificada. Foram utilizados nos ensaios de especificidade por *Western blot* e na imunolocalização por microscopia confocal: soro policlonal anti-NTPDase1 de *T. cruzi*, anticorpos antiNTPDase-1 purificados e um anticorpo policlonal comercial anti CD39 de humano. A especificidade dos anticorpos e soro imune foram avaliadas em extrato protéico de tripomastigotas e epimastigotas da cepa Y. A imunolocalização da NTPDase-1 foi avaliada nas três formas evolutivas do parasito, epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas. Os anticorpos purificados demonstraram especificidade contra NTPDase-1 em extrato protéico de *T. cruzi*, não demonstrando reconhecimento cruzado com GDPase de *L. major*. Anticorpo anti CD39 de humano reconhece uma possível isoforma da NTPDase-1 de 46 kDa além da NTPDase-1 de 66 kDa em extrato protéico de epimastigota. Os parasitos foram

marcados pelo anticorpo anti NTPDase-1 quanto pelo anti CD39 de humano no ensaio de microscopia. A NTPDase 1 está presente nas três formas do parasito, na forma infectiva tripomastigota, na forma proliferativa amastigota, quanto na forma não infectiva epimastigota.

ABSTRACT

CUNHA, Luana Celina Seraphim, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2010. **Imunolocalização da Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase 1 (NTPDase-1) de *Trypanosoma cruzi***. Adviser: Juliana Lopes Rangel Fietto. Co-Advisers: Márcia Rogéria de Almada Lamego and Clovis Andrade Neves.

Trypanosoma cruzi is a protozoan of the Order Kinetoplastida, etiologic agent of Chagas disease. The ecto-nucleotidases of the E-NTPDases family are enzymes able to hydrolyze nucleotide tri- and / or diphosphates in their monophosphate products. Nucleotides are known as extracellular signaling molecules involved in various cellular processes, including purinergic signaling related to the mediation of immune response in mammals. Mechanisms involved in the degradation of these molecules are important in infection by *T. cruzi* and other intracellular pathogens. The Nucleoside Triphosphate Difosfohidrolase 1 (NTPDase-1) of the *T. cruzi* is an ecto-nucleotidase of E-NTPDase family, which hydrolyzes extracellular nucleotides, and is identified as an important molecule for the infective process in vitro and virulence of the parasite in a MURINE model. This study aimed to evaluate the Immunolocalization of (NTPDase-1) in three morphological forms of the Y strain of the parasite *T. cruzi*. Production and purification of antibodies NTPDase-1 recombinant *T. cruzi* by affinity chromatography on agarose resin coupled with purified recombinant NTPDase1. There had been used in specificity tests by Western blot and in immunolocalization by confocal microscopy: polyclonal anti-NTPDase1 *T. cruzi* serum, antiNTPDase-1 purified antibodies and a commercial polyclonal human antibody anti CD39. The specificity of the antibodies and immune serum were assessed in protein extracts of trypomastigotes and epimastigotes of strain Y. The immunolocalization of NTPDase-1 was evaluated in three developmental stages of the parasite, epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes. The purified antibodies shown specificity against NTPDase-1 in *T. cruzi* protein extract, showing no cross-recognition with GDPase *L. major*. Human CD39 antibody recognizes a possible isoform of NTPDase-1 at 46-kDa beyond the NTPDase-1 at 66 kDa in epimastigote protein extract. Parasites were labeled by the antibody anti NTPDase 1 as by human anti CD39 from tests of microscopy. The NTPDase 1 is present in all three forms of the

parasite in the infective trypomastigote form, as proliferative amastigote, and in a non-infective epimastigote.

1. Introdução

Nos últimos anos nosso grupo de pesquisa junto a vários colaboradores, bem como outros grupos de pesquisa vem trabalhando na elucidação do papel das enzimas metabolizadoras de nucleotídeos extracelulares, chamadas de ecto-nucleotidases, tem sido o alvo de investigação na biologia e interação parasito-hospedeiro dos protozoários *Trypanosoma cruzi* e espécies do gênero *Leishmania*, agentes etiológicos da Doença de chagas e das leishmanioses respectivamente (Meyer-Fernandes, Dutra *et al.*, 1997; Fietto, Demarco *et al.*, 2004; Maioli, Takane *et al.*, 2004; Meyer-Fernandes, Saad-Nehme *et al.*, 2004).

Estas enzimas têm como função primária a degradação de nucleotídeos tri e/ou difosfatados nos seus produtos monofosfatados. Sendo os nucleotídeos extracelulares sabidamente moléculas sinalizadoras envolvidas com vários processos celulares, incluindo a sinalização purinérgica relacionada à mediação da resposta imune do hospedeiro. Acredita-se assim, que mecanismos envolvidos na degradação dessas moléculas sejam importantes na infecção pelo *T. cruzi* e outros patógenos. Dentre as ecto-nucleotidases descritas na literatura encontra-se a família das E-NTPDases objeto de estudo desta dissertação.

Após a comprovação da existência de ectonucleotidases da família E-NTPDase na superfície externa do *T. cruzi*, foi clonado o gene que codifica uma ecto-nucleotidase, tendo sido o seu produto protéico, denominado NTPDase-1 (Fietto, Demarco *et al.*, 2004). Baseados em dados da literatura que correlacionam a capacidade ecto-ATPásica de parasitos com a virulência (Nakaar, Beckers *et al.*, 1998) e associado à maior atividade ecto-ATPásica em tripomastigotas, (forma infectiva do parasita), sugeriu-se que também, em *T. cruzi* a virulência e infectividade poderiam estar relacionadas com uma maior capacidade ecto-nucleotidásica, o que foi comprovado posteriormente em cultivo celular, bem como em modelo murino (Santos, Possa *et al.*, 2009). Além disso, esses parasitos são deficientes na via de biossíntese “*de novo*” de purinas, sendo dependentes da chamada “*via de salvação*” (El Kouni, 2003). Sugerindo que estas enzimas possam também participar do processo de aquisição de purinas do meio extracelular (Fietto, Demarco *et al.*, 2004).

Comprovando a participação das E-NTPDases na infecção pelo *T. cruzi*, Santos e colaboradores (2009) mostraram uma diminuição significativa da infectividade em cultura de células e da virulência para camundongos quando estas enzimas foram inibidas por inibidores parciais da atividade ecto-ATP e ADPásicas ou pela ação de antisoro policlonal anti-NTPDase-1 recombinante de *T. cruzi*. Sabendo do envolvimento desta proteína com a capacidade infectiva do *T. cruzi*, esta foi então apontada como um possível alvo para o desenvolvimento de novas drogas para a quimioterapia da doença de Chagas (Santos, Possa *et al.*, 2009).

A localização de proteínas da família E-NTPDase na superfície do *T. cruzi* foi previamente mostrada usando antisoro policlonal anti-E-NTPDase de *Toxoplasma gondii*, visto que não existia anti-soro feito a partir da própria enzima de *T. cruzi* (Fietto, Demarco *et al.*, 2004) e através de medidas de atividade ecto-nucleotidásica usando parasitos intactos (Meyer-Fernandes, Dutra *et al.*, 1997; Fietto, Demarco *et al.*, 2004; Santos, Possa *et al.*, 2009).

Avanços na elucidação do papel da NTPDase-1 na biologia do parasito e nas interações com a célula hospedeira são alguns dos objetivos de continuidade dos estudos da NTPDase-1 de *T. cruzi*. Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a imunolocalização da NTPDase-1 em diferentes forma evolutivas da cepa Y do *T. cruzi* usando para isto anticorpos policlonais anti-NTPDase-1 purificados, soro hiperimune policlonal anti-NTPDase-1 e anticorpo policlonal comercial anti-CD 39 humano (principal E-NTPDase descrita em mamíferos).

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Doença de Chagas

Trypanossoma cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas também conhecida como tripanosomíase americana. Descoberta e descrita pelo pesquisador Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (Chagas, 1909), há mais de um século, a doença

de Chagas ainda persiste como um grave problema de saúde pública, afetando milhões de pessoas com alto impacto na morbidade e mortalidade (Dias, Silveira *et al.*, 2002).

Sua distribuição geográfica era determinada, principalmente, pela área de endemicidade da infecção em vetores, presentes em 21 países da América Latina, ocorrendo do cone sul da América do sul até o sul dos Estados Unidos (Who, 2005). Mas a distribuição geográfica da doença de Chagas vem se modificando devido a alguns fatores, como a urbanização, migração humana e despreparo de novas áreas afetadas para lidar com o controle da transmissão vetorial e em bancos de sangue. Países não-endêmicos (ou seja, países livres de vetores) na América do Norte, Europa e Região do Pacífico Ocidental têm visto o recente aparecimento da doença de Chagas após a migração de mais de 15 milhões de pessoas de áreas endêmicas (Schofield, Jannin *et al.*, 2006; Schmunis, 2007).

A forma natural de transmissão da doença de Chagas humana é aquela ligada diretamente ao vetor, porém existem ainda a transmissão via transfusão de sangue, via congênita, e mais recentemente, as que ocorrem via oral, pela ingestão de alimentos contaminados. Mecanismos menos comuns envolvem acidentes de laboratório, manejo de animais infectados, transplante de órgãos e pelo aleitamento materno. Uma via teoricamente possível, mas extremamente rara é a transmissão sexual (Carlier, 2003).

A doença crônica pode causar deficiências cardíacas e digestivas significativas e representa um alto impacto social e econômico, levando muitas vezes ao desemprego e diminuição da capacidade produtiva dos indivíduos infectados (Schmunis, 2007). A prevalência da doença de chagas é de 200.000 novos casos e 50.000 óbitos /ano (Who, 2005).

De forma sumarizada, a doença de Chagas possui duas fases distintas, a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda pode ser sintomática ou assintomática. O surgimento dos sintomas clínicos está geralmente associado à baixa imunológica do paciente sendo mais comumente encontrado em crianças e indivíduos imunodeprimidos. Esta fase se caracteriza por intenso parasitismo e alguns sinais clínicos iniciais podem ser encontrados, tais como o chagoma de inoculação (quando o

parasito penetra pela pele) e o sinal de romanã (penetração pela conjuntiva). Na maioria dos casos estes sinais somem com o tempo e o parasitismo diminui entrando então o indivíduo na fase crônica da doença, caracterizada por baixa parasitemia, sendo difícil à comprovação parasitológica e sorológica. Esta fase pode apresentar-se assintomática (forma indeterminada) ou sintomática nas formas cardíaca, digestiva, mista e nervosa (Rassi, 1979; Coura, Anuziato *et al.*, 1983).

O tratamento da doença ainda não é totalmente eficaz sendo utilizado na clínica somente o benznidazol (Polak e Richle, 1978). Além de ser pouco eficaz no tratamento, principalmente na fase crônica da doença, esta droga apresenta vários efeitos colaterais desagradáveis que limitam seu uso na terapêutica (Guedes, Urbina *et al.*, 2004). Além disto, é importante salientar que devido a grande variabilidade genética existe uma diversidade de susceptibilidade das cepas do parasito à ação da droga ocorrendo falhas terapêuticas. Deste modo, apesar dos vários esforços nesta área, e da potencialidade de novos fármacos, ainda não se tem conhecimento sobre alguma droga que seja eficiente contra todas as cepas e em todas as fases da doença (Guedes, Urbina *et al.*, 2004).

2.2. O ciclo de vida de *Trypanossoma cruzi*

T. cruzi apresenta um complexo ciclo de vida caracterizado pela presença de diferentes estágios de desenvolvimento que podem ser observados nos hospedeiros vertebrados e invertebrados (Figura1) (Tyler e Engman, 2001). Simplificadamente o ciclo de vida inicia-se quando o inseto vetor infectado ao excercer o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado libera fezes e urina contendo as formas infectivas tripomastigotas metacíclicas, derivadas da diferenciação dos epimastigotas presentes no lúmen do intestino do hospedeiro invertebrado. Os tripomastigotas metacíclicos, por sua vez, infectam o hospedeiro vertebrado onde esses se diferenciam em amastigotas, que é a forma responsável pela multiplicação intracelular. Após a multiplicação, o parasito se diferencia novamente na forma tripomastigota, a célula hospedeira é rompida liberando os tripomastigotas

sangüíneos, que por sua vez podem invadir músculos e outros tecidos ou serem absorvidos em uma nova picada do triatomíneo (Tyler e Engman, 2001; De Souza, 2002).

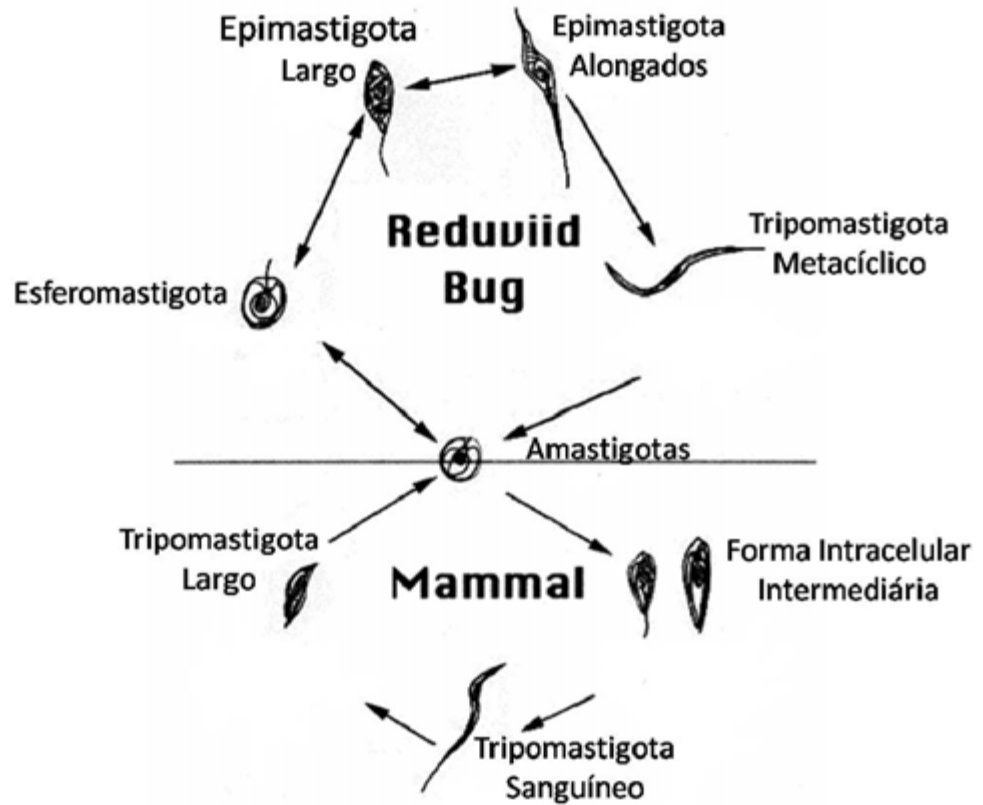


Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* adaptado de Tyler e Engman (2001) . Os desenhos representam morfologias comumente vistas nos hospedeiros vertebrados e invertebrados (sem escala). (i) é uma forma infectiva; (n) é uma forma não infectiva; (+) representa uma forma proliferativa; (-) representa uma forma não proliferativa.

Ao longo do seu ciclo evolutivo *T. cruzi* sofre profundas alterações em sua morfologia, que de modo geral, refletem sua adaptação aos microambientes onde se localizam. As diferentes formas recebem nomes de acordo com critérios morfológicos como suas dimensões, a posição de onde o flagelo emerge da bolsa flagelar e a localização do cinetoplasto em relação ao núcleo celular, sendo facilmente identificada por microscopia óptica em preparações coradas com Giemsa (De Souza 2002) (Figura 2).

As formas amastigotas, responsáveis pela multiplicação intracelular nos hospedeiros vertebrados, são formas ovóides, com comprimento médio de 8 μm e apresentam um flagelo muito curto não emergente para o meio extracelular. O cinetoplasto está localizado próximo ao núcleo (De Souza, 2002). Estudos realizados com essa forma evolutiva do parasito mostraram que elas também são infectivas, porém em taxas muito reduzidas, para células de mamífero (de Carvalho e de Souza, 1989; Ley, Robbins *et al.*, 1990).

Os epimastigotas são organismos alongados ou fusiformes, com 20-40 μm de comprimento e cinetoplasto localizado próximo e anterior à organela nuclear. O flagelo emerge da bolsa flagelar formando uma curta membrana ondulante que se estende até à extremidade anterior do corpo celular do parasito. Estas formas de *T. cruzi* são observadas em fase estacionária de crescimento (após a fase exponencial de crescimento) pela manutenção desses epimastigotas em meio de cultura axênica (meio LIT) ou ainda naturalmente encontrados no intestino médio e posterior dos hospedeiros invertebrados onde se multiplicam ativamente por divisão binária (De Souza, 2002).

Os tripomastigotas são considerados as formas infectivas para os hospedeiros vertebrados, medindo aproximadamente 25 μm de comprimento e cerca de 2 μm de diâmetro. O cinetoplasto está localizado posterior ao núcleo, e o flagelo emergente da bolsa flagelar, estende-se da extremidade posterior e percorre todo o corpo celular do tripomastigota. Existem as formas tripomastigotas de tecidos ou sanguíneos (TS), derivados do ciclo intracelular de multiplicação com liberação desses para o meio extracelular, alcançando posteriormente os vasos sanguíneos, ou ainda derivados de cultura de tecido *in vitro*. Há também os tripomastigotas metacíclicos (TM), oriundos da diferenciação dos epimastigotas em tripomastigotas por um processo conhecido como metaciclogênese, os quais são naturalmente encontrados na ampola retal dos hospedeiros invertebrados e são eliminados através das fezes e urina, sendo portanto, as formas infectivas para os hospedeiros vertebrados levando-se em

consideração o mecanismo de infecção natural, via transmissão vetorial (De Souza, 2002).

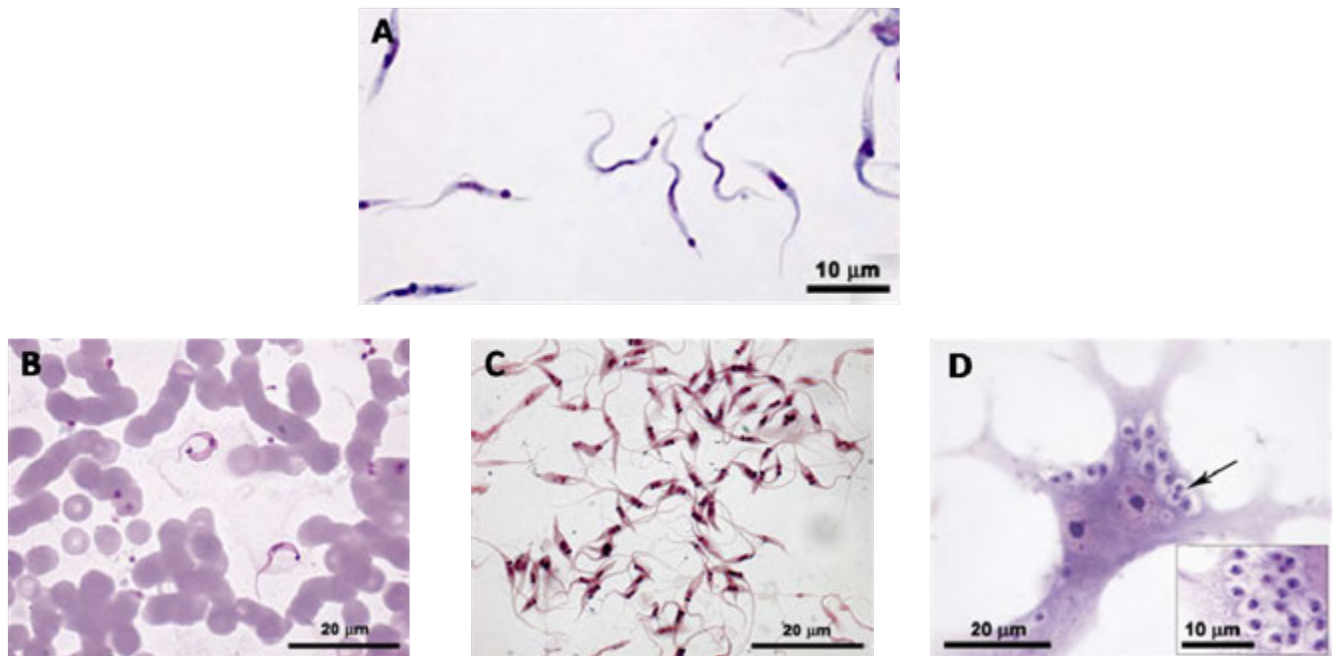


Figura 2. Formas morfológicas do *T. cruzi*. A- Forma Epimastigota, B- Forma tripomastigota, C- Forma tripomastigota metacíclico (derivada metaciclogênese *in vitro*), D- Forma amastigota fonte: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=69>.

Este protozoário tem sido alvo de intensa investigação por microscopia eletrônica convencional e técnicas especiais revistos em de Souza (2008). Estes estudos contribuíram significativamente para uma melhor compreensão da organização estrutural do protozoário e focado principalmente na identificação e caracterização parcial de organelas que constituem alvos para o desenvolvimento de novas drogas antiparasitárias, Rocha & Miranda (2008). A Figura 3 mostra as principais estruturas celulares possíveis de serem observadas por microscopia eletrônica de epimastigotas do *T. cruzi* (De Souza, 1999).

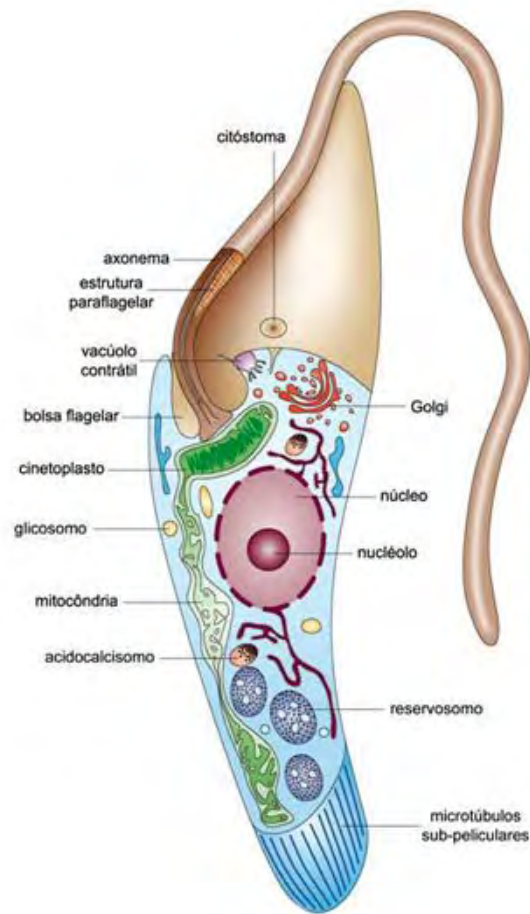


Figura 3. Esquema geral da forma epimastigota de *T. cruzi* mostrando as principais estruturas celulares observadas em microscopia eletrônica. (De Souza, 1999)

Em hospedeiros vertebrados, *T. cruzi* é um parasito obrigatoriamente intracelular que para completar seu ciclo de vida deve ter acesso ao citoplasma da célula hospedeira. O processo de invasão se divide em três fases: adsorção do parasito à membrana plasmática da célula hospedeira, internalização via formação do vacúolo parasitóforo e a ruptura da membrana vacuolar, na qual o parasito é liberado no citoplasma e replica-se na forma de amastigotas (De Souza, 2002).

De acordo com a literatura, sabe-se que o *T. cruzi*, dependendo da cepa, leva menos de 20 minutos para entrar uma célula de mamífero para então posteriormente se proliferar através de divisão binária, ao longo de 2-9 ciclos, preenchendo completamente o citoplasma das células hospedeiras em 4-5 dias, levando a ruptura

celular e liberação de novos tripomastigotas. Após a invasão, o parasito demora cerca de 30 minutos para sair do vacúolo parasitóforo (Burleigh e Andrews, 1995), 2-3 h para se transformar em amastigotas, e cerca de 24-44 h para sintetizar seu DNA. As formas amastigotas, responsáveis pela multiplicação intracelular, levam de 8-15 horas, dependendo da cepa do parasito, para dar origem a uma nova geração de amastigotas, mas a citocinese é rápida, durando de 20-30 min. (Hyde e Dvorak, 1973).

A aderência do parasito é um processo dependente de energia e requer a presença de moléculas específicas na superfície celular (Schenkman, Diaz *et al.*, 1991; Schenkman, Jiang *et al.*, 1991; Schenkman, Robbins *et al.*, 1991). A internalização de *T. cruzi*, além de ser um processo dependente de energia, necessita da presença de glicoproteínas específicas (Abuin, Colli *et al.*, 1989; Ouaiissi, Taibi *et al.*, 1990; Yoshida, Blanco *et al.*, 1990; Ortega-Barria e Pereira, 1991), mucinas (Acosta-Serrano, Almeida *et al.*, 2001), atividades de proteínas quinases (Vieira, De Carvalho *et al.*, 1994; Yoshida, Favoreto *et al.*, 2000) e o aumento da concentração de cálcio tanto no parasito quanto na célula hospedeira (Moreno, Silva *et al.*, 1994; Burleigh e Andrews, 1998).

A internalização de *T. cruzi* também depende de enzimas cujos sítios ativos estão localizados tanto na face externa da membrana plasmática quanto no citoplasma (Souto-Padron, Campetella *et al.*, 1990; Meirelles, Juliano *et al.*, 1992; Colli, 1993; Schenkman e Eichinger, 1993; Schenkman, Eichinger *et al.*, 1994; Scharfstein, Schmitz *et al.*, 2000). As atividades dessas enzimas, referidas como ectoenzimas, podem ser medidas utilizando células intactas. (Furuya, Zhong *et al.*, 1998; Meyer-Fernandes, Lanz-Mendoza *et al.*, 2000).

2.3. As Ecto-NTPDases

As ecto-nucleotidases são importantes enzimas responsáveis pelo metabolismo extracelular de nucleotídeos. Atualmente sabe-se que estas enzimas podem tanto ser secretadas quanto localizadas na porção externa de membranas celulares ou membranas de organelas (Ivanenkov, Murphy-Piedmonte *et al.*, 2003; Leal, Strecher *et al.*, 2005; Murphy-Piedmonte, Crawford *et al.*, 2005).

Na literatura existem vários sinônimos para este grupo de enzimas como, ecto apirase, ecto-ATPDase, CD 39. Em virtude dos vários nomes e para facilitar a comunicação no meio científico, Zimmermann e seus colaboradores (2001) propuseram uma nomenclatura única: NTPDases. Os membros dessa família são geralmente capazes de hidrolisar ligações pirofosfato de nucleotídeos 5'-trifosfato ou nucleotídeos 5'-difosfato, na presença de cátions divalentes, geralmente Ca^{2+} ou Mg^{2+} , com variações na preferência pelos nucleotídeos e na razão de hidrólise dos nucleotídeos tri e di-fosfatados (Laliberte e Beaudoin, 1983).

As NTPDases ou apirases da família CD39 não hidrolisam nucleotídeos monofosfatados, nem fosfatos não nucleosídeos, e apesar de comumente serem denominadas em função da utilização de nucleotídeos de adenina (ATPase, ADPase), nem sempre este é o substrato mais utilizado, havendo hidrólise também de outros nucleotídeos como UTP, UDP, GTP e GDP (Zimmermann, 2000).

Os papéis fisiológicos das E-NTPDases não são totalmente conhecidos ainda; entretanto algumas funções têm sido postuladas, incluindo participação na adesão celular, modulação de processos inflamatórios e da resposta imune (Mizumoto, Kumamoto *et al.*, 2002; Pizzirani, Ferrari *et al.*, 2007), sinalização em terminações purinérgicas, além de estar envolvida na secreção e tráfego em vesículas, reciclagem de purinas, regulação da homeostase vascular. Tem sido proposta uma associação entre uma ecto-NTPDase e uma 5'-nucleotidase (que converte AMP em adenosina) na modulação destes processos biológicos, regulando a concentração dos nucleotídeos (sinalizadores) no local (Enjyoji, Sevigny *et al.*, 1999; Lee e Marcus, 2008; Yegutkin, 2008).

O estudo das E-NTPDases tem avançado muito durante as últimas décadas mostrando a presença destas enzimas em vertebrados, invertebrados, plantas, leveduras (Handa e Guidotti, 1996; Zimmermann e Braun, 1996; Smith, Kirley *et al.*, 1997) e diferentes protozoários como: *Toxoplasma gondii* (Bermudes, Peck *et al.*, 1994; Silverman, Qi *et al.*, 1998), *Leishmania amazonensis* (Berredo-Pinho, Peres-Sampaio *et al.*, 2001; Coimbra, Goncalves-Da-Costa *et al.*, 2002; Pinheiro, Martins-Duarte *et al.*, 2006), *Entamoeba histolitica* (Barros, De Menezes *et al.*, 2000), *Trichinella spiralis* (Gounaris, 2002), *Trichomona vaginalis* (De Aguiar Matos, Borges *et al.*, 2001), e *Crithidia deanei* (Dos Passos Lemos, De Sa Pinheiro *et al.*, 2002).

Recentemente uma ecto-NTPDase denominada NTPDase1 foi descrita em procarioto, *Legionella pneumophila*, um agente causal de pneumonia (Sansom, Newton *et al.*, 2007). Dentro da família das ecto-nucleotidases foi descrita a NTPDase-1 de *T. cruzi* (Fietto, Demarco *et al.*, 2004).

Todos os membros da família E-NTPDase possuem 5 regiões ou domínios muito bem preservados evolutivamente, denominados regiões conservadas de apirases (ACRs) - presumivelmente sendo mais relevantes para sua atividade catalítica (Handa e Guidotti, 1996). Em adição, Smith and Kirley (1999) mostraram que mutagênese sítio-dirigida em resíduos de aminoácidos conservados das regiões I e IV resulta na perda da atividade nucleotidásica dessas enzimas.

As E-NTPDases, usualmente chamadas de apirases, podem ser separadas em dois grupos de acordo com a sua topografia de membrana (Zimmermann, 2000). Os membros do primeiro grupo incluem os representantes em humanos: E-NTPDase1(CD39), E-NTPDase 2 (CD39L1), E-NTPDase 3 (CD39L2), E-NTPDase 4 (UDPase), todas apresentam dois domínios transmembranas, um localizado na porção N-terminal e o outro na extremidade C-terminal. O segundo grupo inclui a NTPDase 5 e uma possível NTPDase 6 que são ancoradas à membrana por apenas um domínio hidrofóbico localizado na extremidade N-terminal, seguido ou não por um sinal de clivagem, podendo resultar numa forma solúvel e/ou secretada. Essas enzimas, de modo geral, hidrolisam não somente ATP e ADP, mas tem em comum uma ampla especificidade de substrato para nucleotídeos purínicos e pirimidínicos,

diferindo, entretanto, na relação à preferência por determinado nucleotídeo 5'-trifosfato ou nucleotídeo 5'-difosfato, conforme resumido na Figura 4, que também mostra outras enzimas do tipo ecto-nucleotidases, porém diferentes da família E-NTPDase (Zimmermann, 2000).

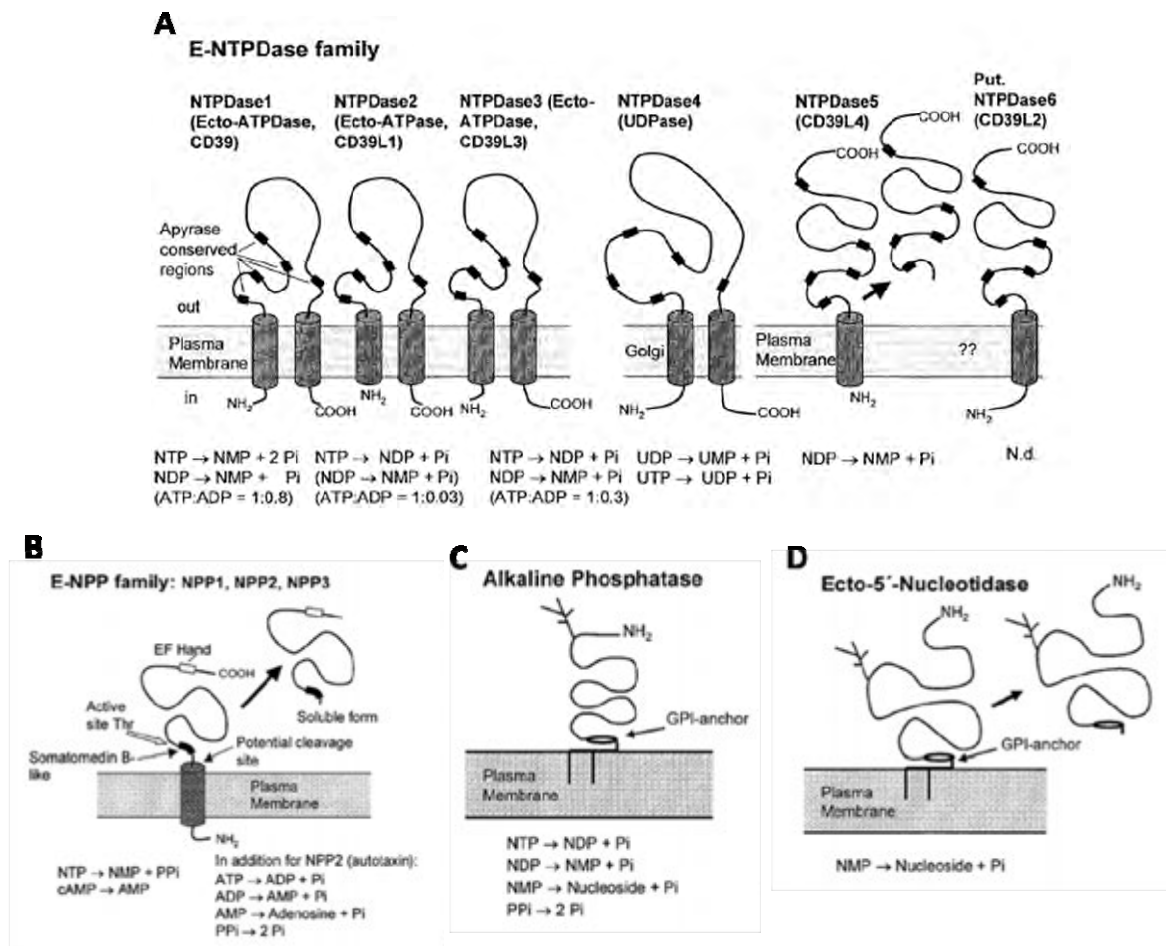


Figura 4: Topologia de membrana e propriedades catalíticas das diferentes famílias de ecto-nucleotidases. (A) Família E-NTPDase. As enzimas podem ocorrer como homodímeros. A NTPDase 5 pode ocorrer como uma proteína solúvel (seta). Uma possível NTPDase 6 solúvel, de estrutura primária conhecida está também 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).

2.4. Nucleotídeos extracelulares

A principal função das apirases até o momento é a regulação da concentração de nucleotídeos extracelulares. A literatura sobre a variedade de funções biológicas dos nucleotídeos extracelulares é bastante vasta. Nucleosídeos e nucleotídeos extracelulares são encontrados em quase todos os tipos de tecidos sendo liberados a partir de uma grande variedade de células. Sabe-se que o ATP extracelular (ATP_e), e seus produtos de degradação ADP, AMP e adenosina, bem como outros nucleotídeos e nucleosídeos, são componentes normais do meio extracelular e estão envolvidos com vários efeitos em diferentes células, tecidos e órgãos (Dombrowski, Ke *et al.*, 1998).

Durante muitos anos o papel do ATPe na modulação do sistema imune não era uma idéia aceita. Três descobertas quebraram esse ceticismo, primeiro a clonagem e identificação em células do sistema imunológico do receptor purinérgico P2 e basicamente todos os seus subtipos; em segundo a demonstração que o ATP é liberado por células do sistema imunológico; e finalmente, o terceiro que esses mediadores podem ser hidrolizados por ectonucleotidases específicas gerando derivados fosfohidrolíticos imunossupressivos. Na atualidade está claro que a rede de sinalização purinérgica é um componente imunoregulatório fundamental (Di Virgilio e 2006).

Em tecidos saudáveis o ATP é quase exclusivamente intracelular, a concentração extracelular em condições basais ou quiescente é basicamente insignificante (entre a 10–100 nM). Pode-se supor que, nestas condições, a maioria se não todos os receptores P2 estão inativos, assim sinalizações purinérgicas ATP-dependentes estão em níveis basais. Os níveis de ATP extracelular (ATPe), mantidos de baixo ou próximo de zero no espaço pericelular por ectoenzimas, é crucial para evitar a dessensibilização de receptores P2. Para esta finalidade, a atividade de ecto-ATPases da membrana plasmática da família das E-NTPDase como CD39, por exemplo, é de particular importância (Dwyer, Deaglio *et al.*, 2007).

No entanto, se um estresse ou lesão é aplicada às células do sistema imunológico, parenquimatosas ou residentes, há liberação de grandes quantidades de ATP, juntamente com outros nucleotídeos. Para que isso aconteça, não há necessariamente a ocorrência de danos de membrana, pois essas células possuem transportadores, canais não-seletivos de grande condutância como conexinas e panexinas, que podem ser ativados por processos mecânicos, fatores ou ligantes extracelulares. Além disso, em resposta à estimulação dessas células podem ocorrer violação transitória da membrana plasmática, levando a um efluxo de ATP e outros nucleotídeos, impulsionado por um grande gradiente elétrico-químico. Na verdade, o ATP é 10^6 vezes mais concentrado no citosol do que no meio extracelular (milimolar versus nanomolar), e é carregado negativamente, sendo repelido pela carga negativa do ambiente intracelular. Esses eventos fazem do ATP um potente sinalizador de perigo (Sabirov e Okada, 2005).

Sob certas circunstâncias o ATP pode servir como um sinal de perigo agudo quando liberado no meio extracelular em médias ou altas concentrações. O resultado pode ser bastante diferente quando as células são expostas de forma intermitente, lenta e crônica em níveis extracelulares de ATP. Nesta condição, os efeitos do ATP são muito mais sutis e dependendo das células que são estudadas, este nucleotídeo leva as respostas imunes a evoluir no sentido da tolerância em vez de reatividade celular. Os papéis dualísticos dos mediadores imunes são bem conhecidos, e até mesmo o ATP se comporta como um clássico mediador da inflamação e imunidade (Di Virgilio, Boeynaems *et al.*, 2009).

O ATPe e outros nucleotídeos transmitem sinais às células via moléculas associadas à superfície celular, cujos sítios ligantes fazem o meio extracelular. Enzimas ligantes de ATP são expressas em células linfocitárias, sendo que análogos não hidrolisáveis do ATP bloquearam a atividade lítica de células Natural Killer (NK) e células TCD8⁺ bem como sua atividade NTPDase. Neste mesmo trabalho Langston & Ke (2003) demonstraram que o ATPe é necessário para a secreção de algumas citocinas inflamatórias como IL-2 e INF γ .

Kukulski & Ben Yebdri (2009), evidenciaram que a indução quimiotática de neutrófilos por IL-8 requer uma ativação simultânea de receptores P2, provavelmente o P2Y₂ que é predominantemente expresso nessas células. A migração de neutrófilos humanos induzida por IL-8 foi significativamente inibida por antagonistas do receptor P2Y, como a suramina e o reativo azul 2 (RB-2) e potencializado por ATP, um ligante de P2Y₂, sendo também insensível para antagonistas específicos de P2Y₁, P2Y₆ e P2Y₁₁. Sugerindo que o ATP é necessário para que a IL-8 exerça seu fator quimiotático sobre neutrófilos, já adenosina não apresentou nenhum efeito quimiotático sobre IL-8 e a migração de neutrófilos.

De um modo geral, a sinalização mediada por receptores purinérgicos depende de uma variedade de fatores, incluindo a expressão desses receptores, sua sensibilidade aos ligantes bem como a concentração de nucleotídeos extracelulares. Neste contexto, o ATP e a adenosina são moléculas mediadoras importantes para células imunes, dependendo da concentração dessas moléculas, elas podem se ligar a um ou outro subtipo de receptor purinérgico, conduzindo, dessa maneira a diferentes respostas fisiológicas (Bours, Swennen *et al.*, 2006).

Além disto, o acúmulo de adenosina extracelular contribui para a imunodeficiência, pois apresenta efeitos tóxicos frente ao desenvolvimento dos linfócitos. Sabe-se também que a adenosina e seu produto de degradação, a inosina são reguladores do processo inflamatório e possuem efeitos imunomodulatórios caracteristicamente relacionados à inibição do processo inflamatório (Jijon, Walker *et al.*, 2005; Nemeth, Lutz *et al.*, 2005). O ADP estimula a agregação plaquetária (Dombrowski, Ke *et al.*, 1998).

Sabe-se também que a adenosina extracelular pode ser transportada para o citoplasma e incorporada em vias de recuperação de purinas, importantes vias presentes em parasitos como o *T. cruzi* que é incapaz de fazer a síntese *de novo* de purinas (El Kouni, 2003).

Outros nucleotídeos extracelulares, como o UDP, por exemplo, exercem efeitos biológicos importantes. Ele ativa especificamente os receptores de tipo P2Y₆, que é expresso em monócitos e células T em alguns estados inflamatórios (Somers, Hammet *et al.*, 1998). A ativação destes receptores em células T não é ainda bem compreendida, porém foi demonstrado, que o UDP estimula a liberação de IL-8, um quimioatrativo de neutrófilos, via P2Y₆ em células humanas monocíticas, além disso, foi demonstrado que a degradação do UDP pela atividade apirásica heteróloga inibe a produção desta interleucina em monócitos. Neste mesmo trabalho também foi observado que a estimulação mecânica de células tumorais (astrocitoma humano) causou a liberação de UTP, ativando receptores P2Y₄ estavam sendo superexpressos por estas células (Warny, Aboudola *et al.*, 2001).

2.5. Purinoreceptores

Os purinoreceptores são representados por várias famílias, e provavelmente são um dos receptores mais abundantes em mamíferos (Abbracchio, Burnstock *et al.*, 2009). Eles determinam uma variedade de efeitos induzidos por nucleotídeos extracelulares. Estes receptores são caracterizados como proteínas transmembranares agrupadas em duas grandes famílias, de acordo com os efeitos farmacológicos de antagonistas e agonistas dos nucleosídeos e nucleotídeos (Bours, Swennen *et al.*, 2006).

Os receptores purinégicos são divididos em duas grandes famílias denominadas como P1 e P2 observadas na Tabela 1, (Ralevic e Burnstock, 1998; Bours, Swennen *et al.*, 2006). Os receptores P1 pertencem à superfamília de receptores do tipo serpentina, sendo subdivididos em receptores dos subtipos A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, que se ligam a adenosina extracelular com diferentes afinidades (Ralevic e Burnstock, 1998). Sabemos que a adenosina é um potente imunomodulador, e a inosina gerada pela quebra da adenosina também exibe propriedades imunomodulatórias pela ação agonista sobre os receptores A₁, A_{2A}, e A₃ sob condições micromolares (Jin, Shepherd *et al.*, 1997; Fredholm, Irenius *et al.*, 2001; Gomez e Sitkovsky, 2003; Hasko, Sitkovsky *et al.*, 2004).

A família dos receptores do tipo P2 é subdividida em duas sub-famílias: os receptores P2X e receptores P2Y (Abbracchio e Burnstock, 1994; Jacobson, Jarvis *et al.*, 2002; Burnstock e Knight, 2004). Os recptores do tipo P2X são proteínas transmembranas em forma de canal iônico, transportam diferentes íons como Na⁺, K⁺, Ca⁺, sendo que sete subtipos já foram caracterizados (Khakh, Burnstock *et al.*, 2001; North, 2002). Os receptores do tipo P2Y são proteínas transmembrana que possuem sete domínios hidrofóbicos do tipo serpentina, acoplados à proteína G (GPCR), dos quais, oito subtipos já foram identificados (P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}) (Von Kugelgen e Wetter, 2000; Jacobson, Jarvis *et al.*, 2002; Boyenaems, Wilkin *et al.*, 2003). Os receptores P2X respondem primariamente ao ATP extracelular, Já os receptores P2Y apresentam responsividade a subtipos específicos para seus ligantes fisiológicos e podem ser subdivididos em dois subgrupos baseados em homologia de sequência (Abbracchio, Boeynaems *et al.*, 2003; Boyenaems, Wilkin *et al.*, 2003). O grupo 1 compreende receptores purinérgicos específicos P2Y₁ e P2Y₁₁, e receptores pirimidínicos específicos P2Y₄, P2Y₆ e um receptor de especificidade mista P2Y₂. O grupo 2, por sua vez, abrange dois receptores específicos para ADP que são P2Y₁₂, P2Y₁₃ e um receptor para UDP-glicose P2Y₁₄. (Tabela 1) (Bours, Swennen *et al.*, 2006).

Os receptores purinérgicos são amplamente distribuídos por todos os tecidos corporais, sendo expressos sobre uma ampla variedade de células. (Bours, Swennen *et al.*, 2006). O papel do ATP e da adenosina extracelular, particularmente na imunidade e na inflamação, depende da expressão de receptores purinérgicos pelos tipos celulares que são essenciais à eficácia inflamatória e resposta imunológica (Bours, Swennen *et al.*, 2006). A maioria das células imunes co-expressam ambos os subtipos de receptores, tanto P1 quanto P2, sugerindo uma dual regulação da função celular pela sinalização purinérgica. O resultado dessa sinalização receptor-mediada é particularmente determinado pela magnitude da expressão de receptores, por exemplo, a quantidade desses receptores na membrana plasmática das células. Essa quantidade pode mudar durante o curso da inflamação e da resposta imune dependendo da natureza dessas respostas (Bours, Swennen *et al.*, 2006).

Recentemente, Schicker e seus cols. (2009), demonstraram que receptores acoplados à proteína G (GPCRs) para nucleosídeos e nucleotídeos de adenina, podem associar-se como homômeros ou em mais de 10 combinações de heterômeros, incluindo a associação com as E-NTPDases. E que os efeitos fisiológicos de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina dependem mais de uma rede de receptores e enzimas adequadamente presentes na membrana plasmática, do que somente da presença de proteínas isoladas, assim, as respostas a ATP, ADP e adenosina podem ser diferentes de acordo com a combinação protéica formada nessa rede de receptores e enzimas na membrana.

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

Sub tipo	Ligantes Fisiológicos	Distribuição em Células Imunes
<u>Receptores P1</u>		
A₁	Adenosina (EC ₅₀ : 0.18-0.53 µM) Inosina (EC ₅₀ : 290 µM)	Neutrófilos, Monócitos, Macrófagos, Células Dendríticas
A_{2A}	Adenosina (EC ₅₀ : 0.56-0.95 µM) Inosina (EC ₅₀ : 50 µM)	Neutrófilos, Monócitos, Macrófagos, Células Dendríticas, linfócitos T, Linfócitos B
A_{2B}	Adenosina (EC ₅₀ : 16.2-64.1 µM)	Neutrófilos, Monócitos, Macrófagos, Células Dendríticas, linfócitos T
A₃	Adenosina (EC ₅₀ : 0.18-0.53 µM) Inosina (EC ₅₀ : 0.03-2.5 µM)	Neutrófilos, Monócitos, Macrófagos, Células Dendríticas, linfócitos T
<u>Receptores P2X</u>		
P2X₁	ATP (EC ₅₀ : 0.05-1 µM)	Neutrófilos, Monócitos, Macrófagos, Células Dendríticas, Linfócitos T, Células NK
P2X₂	ATP (EC ₅₀ : 1-30 µM)	
P2X₃	ATP (EC ₅₀ : 0.3-1 µM)	
P2X₄	ATP (EC ₅₀ : 1-10 µM)	Neutrófilos, Monócitos, Macrófagos, Células Dendríticas, Linfócitos T, Células NK
P2X₅	ATP (EC ₅₀ : 1-10 µM)	Neutrófilos, Monócitos, Macrófagos, Células Dendríticas, Linfócitos T
P2X₆	ATP (EC ₅₀ : 1-12 µM)	
P2X₇	ATP (EC ₅₀ : 100-780 µM)	Neutrófilos, Monócitos, Macrófagos, Células Dendríticas, linfócitos T, Linfócitos B, Células NK
<u>Receptores P2Y</u>		
P2Y₁	ADP (EC ₅₀ : 8 µM)	Neutrófilos, Monócitos, Macrófagos, Células Dendríticas, linfócitos T
P2Y₂	UDP (EC ₅₀ : 0.14 µM) = ATP (EC ₅₀ : 0.23 µM)	Neutrófilos, Monócitos, Macrófagos, Células Dendríticas, linfócitos T
P2Y₄	UTP (EC ₅₀ : 0.25-0.26 µM) >>ATP,UDP	Neutrófilos, Monócitos, Macrófagos, Células Dendríticas, linfócitos T
P2Y₆	UDP (EC ₅₀ : 0.3 µM) >>UTP(EC ₅₀ : 6 µM)	Neutrófilos, Monócitos, Macrófagos, Células Dendríticas, linfócitos T
P2Y₁₁	ATP (EC ₅₀ :17 µM)	Neutrófilos, Monócitos, Macrófagos, Células Dendríticas, linfócitos T, linfócitos B
P2Y₁₂	ADP (EC ₅₀ : 0.07 µM)	Monócitos, Macrófagos, linfócitos T,
P2Y₁₃	ADP (EC ₅₀ : 0.06 µM)>ATP(EC ₅₀ :0.26 µM)	Monócitos, Células Dendríticas, linfócitos T
P2Y₁₄	UDP-glicose (EC ₅₀ : 0.1-0.5 µM)	Neutrófilos, Células Dendríticas, Linfócitos T

2.6. Metabolismo de Purinas e atividade ecto-nucleotidásica em endoparasitas

As purinas são de importância vital para os organismos vivos. Elas são essenciais para a síntese de ácidos nucléicos, proteínas e outros metabólitos bem como para reações que requerem energia. Considerando a elevada taxa metabólica e de replicação, os parasitos requerem uma ativa síntese de ácidos nucléicos, nos quais necessitam de uma ampla demanda de nucleotídeos purínicos. Em geral, esses nucleotídeos podem ser sintetizados pela *via da biossíntese de novo* que utiliza componentes simples para a síntese de nucleotídeos purínicos, e/ou reciclados por uma via alternativa, a *via de salvação*, que é uma rota de reutilização, na qual a célula satisfaz suas necessidades purínicas a partir de fontes endógenas e/ou exógenas de purinas pré-formadas. Todos os parasitas estudados, com exceção de alguns nematóides, são incapazes de realizar a *biossíntese de novo*, e dependem da *via de salvação* para satisfazer seus requerimentos purínicos (El Kouni, 2003).

A primeira apirase descrita em um endoparasita sanguíneo, patógeno humano, foi a de *T. gondii* (Asai, Miura *et al.*, 1995). Desde então esta enzima tem sido estudada e associada a processos biológicos importantes dentro do contexto das relações parasito-hospedeiro. *T. gondii*, como *T. cruzi*, é um protozoário incapaz de utilizar 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). Componentes da via de salvação de purinas de parasitos têm sido considerados como bons alvos para o desenho de novas drogas (El Kouni, 2003).

Alguns trabalhos mostram de forma mais clara uma correlação entre a ativação de hidrólise de ATP e um dado efeito biológico na interação parasito-hospedeiro (Silverman, Qi *et al.*, 1998; Sansom, Newton *et al.*, 2007; De Almeida Marques-Da-Silva, De Oliveira *et al.*, 2008; Sansom, Robson *et al.*, 2008; Santos, Possa *et al.*, 2009).

Por exemplo, usando como modelo o *T. gondii*, foi mostrado que o aumento da atividade ecto-ATPásica induz a saída do parasita do vacúolo parasitóforo

(Silverman, Qi *et al.*, 1998) A apirase de *T. gondii* é secretada na forma de grânulos densos, dentro do vacúolo parasitóforo formado no interior da célula infectada, sendo sugerida então sua participação na via de captação de adenosina (Bermudes, Peck *et al.*, 1994) e controle da proliferação dentro do vacúolo, onde a diminuição da expressão por RNA antisense levou a conseqüente queda do número de parasitos por vacúolo parasitóforo (Nakaar, Beckers *et al.*, 1998). Asai e seus colaboradores (1995) identificaram duas isoformas da enzima em uma cepa virulenta (RH) do parasito. Neste mesmo trabalho, os genes codificantes destas isoformas foram clonados e verificou-se que estes diferiam em apenas 16 aminoácidos dos 628 presentes na seqüência primária descrita. O gene correspondente a NTPase 2 estava presente em todas as cepas testadas (virulentas e não virulentas) e o gene da NTPase 1 foi demonstrado apenas nas cepas virulentas, sugerindo que o produto desses genes poderiam desempenhar um papel importante no processo de sobrevivência intracelular e virulência do parasita.

Uma ecto-ATPase também foi descrita e vêm sendo estuda em *Trichomonas foetus* (Jesus, Lopes *et al.*, 2002), protozoário que parasita bovinos, taxonomicamente próximo de *Trichomonas vaginalis* parasito do trato urogenital humano. Além da caracterização usualmente utilizada analisando a atividade na presença de inibidores de outras ATPases, dependência de cátions divalentes, estudo com alguns inibidores, perfil de ativação em diferentes pHs e especificidade por nucleotídeos, demonstrou-se uma alta estimulação da atividade enzimática na presença de D-galactose, carboidrato conhecidamente exposto na superfície das células hospedeiras e envolvido no processo de adesão celular, processo este de vital importância para a infectividade e internalização do parasito nas células do hospedeiro.

Também em *Leishmania tropica* e *Leishmania amazonensis* foi detectada atividade NTPDásica dependente de Mg^{2+} (Meyer-Fernandes, Dutra *et al.*, 1997; Berredo-Pinho, Peres-Sampaio *et al.*, 2001) e em duas espécies responsáveis pela leishmaniose cutânea (Herwaldt, 1999). A localização desta enzima em *L. amazonensis* foi confirmada através de microscopia eletrônica utilizando anticorpos anti-CD39, sugerindo que essa proteína faça parte da família da NTPDase 1/ CD39

(Pinheiro, Martins-Duarte *et al.*, 2006). Foi observado um aumento na atividade enzimática no fim da replicação do parasito e em cepas mais virulentas. A atividade na forma amastigota, estágio obrigatoriamente intracelular, foi dez vezes maior quando comparada com a forma promastigota encontrada no tubo digestivo do inseto vetor. (Berredo-Pinho, Peres-Sampaio *et al.*, 2001; Pinheiro, Martins-Duarte *et al.*, 2006). Estes estudos demonstram dados que associam a presença genética, a expressão gênica e/ou a atividade enzimática de ecto-nucleotidasas de parasitos com a virulência, adesão celular, saída do parasito da célula infectada, controle da concentração de nucleotídeos das células hospedeiras e do meio extracelular e escape do sistema de defesa do hospedeiro (Demarco, Kowaltowski *et al.*, 2003; Maioli, Takane *et al.*, 2004).

Pesquisas mostraram atividade de hidrólise de nucleotídeos na superfície externa de outros tripanossomatídeos, como *Trypanosoma brucei*, causador da doença do sono, ensaios utilizando parasitos intactos demonstraram que *T. brucei* exibiu atividade NTPDásica dependente de Mg^{2+} hidrolizando ATP, CTP, GTP, UTP e ADP. Curiosamente a atividade catalítica pode ser estimulada por outros cátions divalentes incluindo zinco. Os autores sugerem que esta enzima em *T. brucei* poderia desempenhar um papel no salvamento de purinas em meio extracelular (De Souza Leite, Thomaz *et al.*, 2007).

Bisaggio e seus colaboradores em um trabalho publicado (2003), sugerem possível papel da atividade Ecto-ATPase dependente de Mg^{2+} na interação *T. cruzi*-célula hospedeira. Mostrando que a atividade NTPDásica está presente em todas as formas do parasito, embora haja uma variação na atividade de tripomastigotas que são as formas infectivas, onde tripomastigotas infectivos exibiram atividade E-NTPDásica 20 vezes maior que a forma epimastigota. Ainda nesse trabalho, foi demonstrando que parasitos crescidos na presença de suramina, inibidor da NTPDases, apresentaram um aumento na atividade ATPásica e na capacidade infectiva, quando comparados com outros parasitos que cresceram na ausência de suramina.

Corroborando com esta idéia, Fietto e colaboradores (2004) demonstraram a presença de uma atividade de hidrólise de nucleotídeos tri e di fosfatados (NTPDase) na superfície externa do *T. cruzi* (cepa Y). A atividade NTPDásica está presente em todas as formas do parasito, sendo sugerida a possível participação das ecto-nucleotidasas, bem como da NTPDase-1 de *T. cruzi* na via de captação de purinas, essencial para este parasito. Neste trabalho foi mostrado que o parasito possui atividade ecto-nucleotidásica em sua superfície, tendo sido isolado um gene denominado NTPDase-1 (E.C. 3.6.1.5) codificante de uma proteína predita com massa molecular estimada de 69 kDa que poderia ser o responsável pela produção da proteína com esta atividade. Neste mesmo trabalho, foi realizada uma imunolocalização nas três formas do parasito (tripomastigota, amastigota e epimastigota) usando anti-soro policlonal anti-NTPDase de *T. gondii*, além da caracterização de seus substratos. Apontando para o envolvimento de ecto-nucleotidasas, incluindo a NTPDase-1, com o mecanismo de virulência relacionados à hidrólise de ATP extracelular (ATPe) e seus metabólitos, em função de que as formas tripomastigotas infectantes apresentaram uma razão de hidrólise ATP/ADP maior que as formas epimastigotas não infectantes.

Em adição, Santos e seus colaboradores (2009) expressaram a NTPDase-1 de *T. cruzi* em sistema heterólogo bacteriano em sua forma solúvel (sem o peptídeo sinal amino-terminal de 36 aa), mostrando atividades similares de hidrólise sobre ATP e ADP. Estes mesmos autores realizaram ensaios analisando a infectividade em cultura de células e a virulência para camundongos quando esta enzima e/ou alguma homóloga foram inibidas por inibidores da atividade ou pela ação de antisoro policlonal anti-NTPDase-1, apresentando uma diminuição significativa da infectividade tanto *in vitro*, bem como da virulência *in vivo*. Ainda neste trabalho os autores sugerem que durante a manutenção de *T. cruzi* em cultura de células, haja uma diminuição da relação de hidrólise ATP/ADP e que este fenômeno esteja correlacionado à diminuição da infectividade "*in vitro*".

É importante salientar que uma nova busca por outros genes codificantes de isoformas da NTPDase-1 na seqüência liberada do genoma de *T. cruzi* (El-Sayed, Myler *et al.*, 2005) foi efetuada e que não foram encontrados outros genes homólogos

(Santos, Possa *et al.*, 2009). Cabe também ressaltar que, apesar de incompleto, a maior parte do genoma deste parasito foi determinada e que o gene da NTPDase-1, na cepa Y, apresenta somente uma cópia (Fietto, Demarco *et al.*, 2004).

Neste trabalho, como continuidade aos estudos da NTPDase-1 de *T. cruzi* efetuamos sua imunolocalização por microscopia confocal, nas três formas do parasito: epimastigotas, tripomastigotas de primeira passagem, e amastigotas, utilizando soro policlonal e anticorpos purificados contra NTPDase-1 heteróloga e anti CD 39 de humano.

3. Objetivos

3.1. Objetivos gerais

Determinar a imunolocalização celular da NTPDase-1 em diferentes formas evolutivas da cepa Y de *T. cruzi*.

3.2. Objetivos específicos

- Purificar a proteína NTPDase-1 recombinante, expressa em sistema heterólogo bacteriano
- Produzir anti-soro policlonal anti NTPDase-1 recombinante de *T. cruzi* em coelho.
- Purificar anticorpos anti NTPDase-1 recombinante em coluna de afinidade ligada covalentemente à NTPDase-1 recombinante.
- Avaliar a especificidade dos anticorpos purificados comparando o reconhecimento cruzado dos anticorpos com a NTPDase-1 de *T. cruzi*, extrato total de *E. coli* e a E-NTPDase de *L. major* denominada GDPase.
- Imunodectar a NTPDase-1 em extrato protéico total da cepa Y do *T. cruzi* na forma infectiva tripomastigota e não infectiva epimastigota, usando soro policlonal anti-NTPDase-1, anticorpos policlonais purificados anti-NTPDase-1 e anti-CD39 comercial.
- Imunolocalizar a NTPDase-1 em formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas por microscopia confocal usando os mesmos anticorpos descritos no item anterior.

4. Materiais e Métodos

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, com 30 dias de idade, machos, pesando aproximadamente 20g, nascidos e mantidos no Biotério Central da Universidade Federal de Ouro Preto. Para repique e/ ou coleta sanguínea de tripomastigotas, através do plexo ocular. Os tripomastigotas sanguíneos foram usados, para produzir os tripomastigotas de P1 e amastigotas de P1 derivados da infecção em cultura de células VERO, como descrito por (Santos, Possa *et al.*, 2009). Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea, 1992), de acordo com as normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Ouro Preto.

4.2. População de *T. cruzi*

Neste trabalho utilizou-se a cepa Y de *T. cruzi*, gentilmente cedida pelo grupo da Dr^a. Maria Terezinha Bahia do Laboratório de Doença de Chagas da Universidade Federal de Ouro Preto.

4.3. Cultivo de células VERO

Para a manutenção das células VERO foram utilizadas garrafas de cultura de 25 cm³ contendo 7 mL de meio de cultura RPMI Cultilab® adicionado de 1% de soro fetal bovino. Foram colocadas aproximadamente 5 x 10⁵ células VERO por garrafa. Os repiques dessas células foram feitos pela remoção do meio de cultura, lavagem da monocamada de células com 10 mL de solução salina 0.9% (estéril), adição de 5 mL de tripsina (100 mL de PBS 1X, 0,5g de tripsina e 0.02g de EDTA) e incubação por 2 a 3 minutos em estufa à 37° C para descolamento das células. A reação de descolamento foi interrompida pela adição de 10 mL de solução salina 0.9% e

posterior homogeneização. Esta suspensão celular foi acondicionada num tubo Falcon de 15 mL, centrifugada por 10 minutos a 152 g (5° C), o sobrenadante descartado e o pellet suspenso em 10 mL de solução salina 0.9% estéril. Uma alíquota foi retirada para contagem em câmara de Neubauer. As células foram centrifugadas novamente por 10 minutos a 152 g (5° C), suspensas em meio RPMI 5% SFB e uma quantidade de 1×10^6 células foram semeadas em 15 mL de meio de cultura RPMI 5% SFB em garrafas de 75 cm³ e incubadas em estufa à 37° C, 5% CO₂ e atmosfera umidificada à 95%.

4.4. Infecção de células VERO

Os camundongos infectados com a cepa Y do *T. cruzi* foram usados para coleta de sangue no dia do pico de parasitemia (7° dia). Os animais foram anestesiados e o sangue coletado assepticamente pelo seio venoso retro-orbital com o auxílio de pipetas Pasteur previamente esterilizadas contendo o anti-coagulante heparina sódica Hipolabor® 5.000 U/mL. O sangue (1mL) foi distribuído nas garrafas de cultura contendo células VERO previamente crescidas por 48 h à 37° C. As garrafas foram novamente incubadas à 37° C por 24 h para a internalização dos parasitos. Após esse período, essas garrafas foram lavadas (3 vezes cada uma) com solução salina 0.9% (estéril) para remoção de células sangüíneas e de parasitos não internalizados ou daqueles aderidos à superfície celular. Em seguida foram adicionados 15 mL de meio RPMI 1% SFB e procedida nova incubação em estufa à 33° C, 5% CO₂ e atmosfera umidificada à 95%, para continuidade do ciclo intracelular do parasito até a liberação das formas tripomastigotas, concluindo-se assim uma passagem celular.

4.5. Coleta de tripomastigotas e obtenção de epimastigotas e amastigotas

As formas tripomastigotas foram coletadas no sobrenadante de cultura após o cumprimento de um ciclo de replicação e diferenciação intracelular da cepa Y. Para

essa cepa, o ciclo intracelular in vitro tem duração de cerca de 5 dias. Estes parasitos foram então recuperados do meio extracelular pela coleta do sobrenadante da cultura de células VERO, distribuídos em tubo Falcon de 50 mL e centrifugados à 152 g por 10 minutos (5° C) para remoção de células hospedeiras e/ou restos celulares oriundos da ruptura dessas. O pellet foi descartado e o sobrenadante estocado em outro tubo Falcon de mesmo volume. Em seguida centrifugou-se novamente, agora à 3500 rpm por 15 minutos à 5° C, para baixar os tripomastigotas. O pellet obtido foi utilizado para realização dos experimentos de *Western blot* e para os ensaios de imunolocalização.

As formas epimastigotas utilizadas nesse trabalho foram obtidas de amostras congeladas que foram recuperadas e cultivadas em meio LIT(glicose 1.0 g, NaCl 2.0 g, KCl 0.2 g, Na₂PO₄.12H₂O 10.8 g, triptose 2.5 g, infuso de fígado 2.5 g, 50 mL de SFB, 1.5 mL de hemina, 0.03 g de streptomina, em 1L de água) contido num tubo Falcon de 15 mL e incubados em estufa à 28° C. A cultura foi avaliada a cada dois dias por exame a fresco em microscópio óptico (objetiva de 40X), até obtenção de massa de parasitos suficiente para os ensaios.

As formas evolutivas amastigotas foram obtidas pela incubação da cultura de células VERO infectadas com *T. cruzi* em estufa à 37° C por um período mínimo de 7 dias sem troca do meio de cultura ocorrendo a acidificação do pH do meio de cultura, induzindo dessa maneira a diferenciação e liberação das formas amastigotas do parasito derivadas de tripomastigotas de primeira passagem. Por último, foram realizados os mesmos procedimentos de centrifugação descritos para a coleta dos tripomastigotas.

Todos os estoque e formas do parasito foram cultivados do Laboratório de Doença de Chagas da Universidade Federal de Ouro Preto coordenado pela Professora Maria Terezinha Bahia.

4.6. Obtenção da NTPDase-1 recombinante

A porção solúvel da NTPDase-1 da cepa Y de *T. cruzi* (Fietto, Demarco *et al.*, 2004) foi expressa em sistema heterólogo bacteriano *Escherichia coli* pET21b (Novagen) como descrito por Santos, Pssa e seus colaboradores (2009). De forma simplificada a NTPDase-1 de *T. cruzi* foi expressa na cepa BL21-DE3 de *E. coli* e sua produção foi induzida pela adição de 1mM de IPTG por 1 hora, à 37° C sob agitação de 200 rpm. A purificação foi feita usando resina de níquel-agarose Ni-NTA Sigma®, segundo (Santos, Possa *et al.*, 2009) as várias eluições contendo a proteína purificada foram concentradas usando Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units Millipore® com membrana de 3 kDa, de acordo com manual do fabricante. As amostras de proteína foram quantificadas pelo método de Bradford (Bio Rad®) e analisadas por SDS-PAGE 10% corado com azul de Coomassie.

4.7. Produção do antisoro policlonal anti-NTPDase-1 de *T. cruzi*

Para obtenção do soro hiperimune, a proteína recombinante purificada foi inoculada em coelho fêmea de dois meses, via intradermal, uma dose de 0,5 mg em 0,5 mL de tampão de eluição (50mM de tris, 300 mM NaCl, 250mM de imidazol) juntamente com mesmo volume de adjuvante completo de Freud (Sigma®). Após duas semanas, mais uma dose de 0,5 mg da proteína recombinante foi novamente inoculada com mesmo volume de adjuvante incompleto de Freud (Sigma®) semelhante ao inóculo anterior. Decorridos mais 15 dias, o sangue periférico foi coletado por punção da veia marginal da orelha do coelho. O sangue foi centrifugado a 786 g por 10 minutos em temperatura ambiente e o soro contendo os anticorpos foi distribuídos em alíquotas em tubos eppendorf de 1.5 mL sendo estocados a -20 graus até o uso.

4.8. Produção da resina de afinidade acoplada a NTPDase-1

A proteína NTPDase-1 de *T. cruzi* foi acoplada a CNBr-activate Sepharose Fast Flow 4B ativada, de acordo com o manual do fabricante (GE®). Resumidamente, a resina foi suspensa em 20 mL de HCl 1 mM “gelado” por 30 minutos, sob leve agitação para retirar o açúcar que reveste a resina. Após centrifugação a 1.000 g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o volume da resina foi determinado (5mL). Posteriormente a resina foi lavada 2x com tampão de ligação (NaHCO₃ 0.1M; NaCl 0.5 M pH 8.3) e novamente centrifugada como descrito anteriormente. Em seguida 500 µg da proteína NTPDase-1 purificada foi suspensa em tampão de ligação (NaHCO₃ 0.1M; NaCl 0.5 M pH 8.3) e incubada com a resina previamente tratada, por 16 horas a 4°C sob leve agitação, o acoplamento foi mensurado por dosagem de proteína total pelo método de Bradford na amostra antes e após o acoplamento. Decorrido o tempo de ligação, a resina foi centrifugada a 1.000 g por 5 minutos a 4°C e lavada com 25 mL de tampão de ligação (NaHCO₃ 0,1M; NaCl 0,5 M pH 8.3). Após o acoplamento os sítios ligantes não ativados foram bloqueados por tratamento com tampão Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0, sob leve agitação por 4 horas. Em seguida, a resina foi lavada 8x alternadamente com tampão acetato 0.1M, NaCl 0.5M pH 3.5 e tampão Tris-HCl 0.1M, pH 8.5. Finalmente a resina foi lavada com PBS 1X, seguida de 2 lavagens com tampão de ligação (NaHCO₃ 0.1M; NaCl 0.5 M pH 8.3). Deste modo obteve-se a resina de afinidade para purificação das IgGs específicas contra NTPDase-1 de *T. cruzi* presentes no antisoro policlonal produzido em coelho. A resina de afinidade foi armazenada em geladeira a 4° C segundo as normas do fabricante até o momento do uso.

4.9. Purificação dos anticorpos IgG anti-NTPDase1 de *T. cruzi*

As IgGs específicas anti-NTPDase-1 de *T. cruzi* foram purificadas de acordo com o descrito por (Chandler, 2007) com algumas adaptações. O soro total foi diluído na proporção de 1 mL de soro para 10mL de tampão de ligação contendo (Tris 10 mM pH 7.5), a coluna foi equilibrada com 20 vezes o seu volume com tampão de

ligação (Tris 10 mM pH 7.5), em seguida o soro previamente diluído foi passado 3 vezes através da coluna num fluxo lento para garantir a ligação das IgGs específicas ao antígeno imobilizado covalentemente na coluna. Posteriormente a coluna foi lavada com 10 vezes o volume da coluna com Tampão de ligação (Tris 10 mM pH 7.5) e depois com a mesma quantidade de Tampão de Lavagem (Tris 10mM + 500 mM de NaCl pH 7.5) com o objetivo de eluir as moléculas ligadas inespecificamente. Em seguida os anticorpos ligados por interações ácido-sensíveis foram eluidos com 5mL de tampão glicina 100 mM pH 2.5, e logo os anticorpos ligados por interações básica-sensíveis foram eluidos com 2mL de tampão Tris 10 mM pH 8.8. Finalmente o pH das amostras de eluição contendo os anticorpos foi acertado para 7.2, sendo as mesmas unidas e concentradas utilizando Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units Milipore®.

4.10. Determinação do título dos anticorpos purificados

A determinação do título dos anticorpos purificados foi feita através da imunodeteção por *Western blot*, tendo sido utilizada metodologia de acordo com (Sambrook e Russel, 2001). Amostras de 1µg da proteína NTPDase-1 de *T. cruzi* foram aplicadas em 3 canaletas do gel de poliacrilamida-SDS-PAGE 10%, como controle negativo foi utilizado extrato de *E. coli DH5α*. A eletroforese foi realizada com tampão de corrida 1X (Tris 25 mM, 250 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,3) em condições constantes de voltagem (80V), utilizando-se o sistema *Mini Protean III Dual Slab Cell* Bio-Rad®. Após a separação protéica deu-se início a transferência para membrana de nitrocelulose (por 2 horas, 70 V, 250 mA) utilizou-se o sistema de transferência molhada *Mini transblot electrophoretic transfer cell* Bio-Rad® em condições de acordo com manual do fabricante . Após a transferência as membranas foram coradas em solução de ponceau S, para verificação da qualidade da transferência. Em seguida, as membranas foram bloqueadas em PBS-T 0,1% acrescido de Albumina 3% por 12 horas a 4º C. Decorrido esse tempo foram efetuadas 3 lavagens de 5 min com PBS-T 0.1% e incubadas por 12 horas com o anticorpo primário em PBS-T 0,1 % (anticorpos anti- NTPDase-1 de *T. cruzi*), nas seguintes diluições: 1:250, 1:500 e 1:1000. Posteriormente foram feitas 3 lavagens com PBS-T 0,1%, seguida da incubação por 2

horas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em cabra conjugado a Peroxidase Sigma® na diluição de 1:20.000. Novamente foram efetuadas 3 lavagens com PBS-T 0,1% e finalmente foi realizada a revelação em sala escura adicionando a solução contendo o substrato para a enzima peroxidase (Tris 50mM pH 7.6 + 10mg Diaminobenzidina Sigma® + 10µL de Peróxido de hidrogênio 30%) quando as bandas apareceram, a reação foi parada pela adição de água destilada.

4.11. Avaliação da especificidade dos anticorpos purificados anti-NTPDase-1

Para confirmar a especificidade dos anticorpos purificados foi efetuado um ensaio de *Western blot* como descrito anteriormente no item 4.13 modificando apenas as amostras analisadas. Foram aplicadas no gel de poliacrilamida-SDS 10%, 1µg da proteína NTPDase-1 de *T. cruzi*, 1µg da apirase recombinante de *Leishmania major*, (GDPase) e 15 µL extrato total de *E. coli* DH5 α , densidade optica (DO) de 0,6 medida a 600nm. Todo o processo de corrida, transferência, bloqueio e ligação com anticorpo primário foram idênticos ao item anterior, somente o anticorpo secundário usado foi o anti-IgG de coelho produzido em cabra conjugado a Fitc Sigma® na diluição de 1:20.000. Após ligação com anticorpo secundário foram efetuadas 3 lavagens com PBS-T 0.1% e a fluorescência do Fitc foi observada em um foto documentador de fluorescência FLA 5100 (Fujifilm®)

4.12. Imunodeteção da NTPDase-1 em extrato de tripomastigota e epimastigota de *T. cruzi*.

Para a imunodeteção da NTPDase-1 nos extratos celulares do parasito tanto da forma infectiva tripomastigota de primeira passagem como da forma não infectiva epimastigota, foi utilizada a mesma metodologia descrita no item 4.11, foram efetuadas incubações com os anticorpos purificados anti-NTPDase na diluição de 1:1000, o soro policlonal anti-NTPDase-1 na diluição de 1:1000, e um anticorpo comercial Anti-ENTPD1 de humano (anti CD39) Sigma® produzido em coelho na diluição de 1:2000.

4.13. Imunolocalização da NTPDase-1 nas três formas evolutivas *T.cruzi*

Os ensaios de imunolocalização foram realizados “in vivo” como descrito por Fietto e seus colaboradores (2004). Os parasitos foram centrifugados a 786 g por 5 min a 4° C para retirar o meio e ressuspensos em PBS. Foram realizados três experimentos independentes nos quais os parasitos foram incubados separadamente com: 1) anticorpos purificados anti NTPDase 1 na diluição de 1:100; 2) antisoro policlonal não purificado na diluição de 1:100; nesse caso como controle negativo foi utilizado 3) o soro pré-imune na mesma diluição 1:100; e 4) anticorpo policlonal comercial anti CD39 Sigma® na diluição 1:200. Todos os ensaios foram incubados com anticorpo secundário anti IgG de coelho produzido em cabra conjugado a Fitc Sigma®. Como controle negativo foi utilizado a incubação somente com o anticorpo secundário anti IgG de coelho produzido em cabra conjugado a Fitc Sigma®. Depois de todos os tratamentos foi observada a mobilidade dos parasitos. A montagem da lâmina foi feita com um esfragaço com 20µL da preparação e montados com Fluoromont (Serva®). As lâminas foram analisadas em Microscópio óptico de varredura a laser, Confocal, Zeiss®, modelo LSM 510 META.

4.14. Ensaio de imunofluorescência em epimastigotas

Foram aliqüotados 1 mL de cultura de epimastigotas em tubos eppendorf® sendo os parasitos recuperados após centrifugação a 786 g por 5 min a 4° C ressuspensos em PBS e espalhados em lâminas histológicas antecipadamente cobertas com poli-L-lisina (Sigma)® . O ensaio de imunofluorescência foi realizado com parasitos foram previamente fixados com etanol por 10 minutos, o que permitiu a permeabilização da membrana dos parasitos. Após a fixação as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS, em seguida foram incubadas com anticorpo policlonal anti NTPDase-1 de *T. cruzi* na diluição de 1:10, em câmara úmida a 37° C, por 1 hora, após o tempo de incubação, foram efetuadas 3 lavagens PBS-A 1% e incubadas com anticorpo secundário conjugado a Fitc (Sigma®), na diluição de 1:100 em câmara úmida a 37° C, decorrido o tempo de 1 hora, as lâminas foram marcadas com DAPI

(4'6-diamidino-2-phenylindole), Sigma ® 10 µg/ml para visualização do núcleo e do cinetoplasto e finalmente passaram por três lavagens com PBS, e em seguida foram montadas com sacarose 50% analisadas em microscópio de fluorescência Olympus® BX 70. Os controles negativos foram feitos utilizando soro pré-imune de coelho na diluição de 1:10, e outras lâminas foram incubadas somente com o anticorpo secundário, para descartar ligações inespecíficas.

5. Resultados e Discussão

A família apirase (CE 3.6.1.5) ou CD39 (NTPDase) (Gendron, Benrezzak *et al.*, 2002) é composta de enzimas que hidrolisam uma variedade de nucleosídeos tri e difosfatos liberando NDP, NMP, e ortofosfato, sua atividade é dependente da presença de cátions divalentes, cálcio e magnésio (Plesner, 1995; Meyer-Fernandes, 2002). Tem sido sugerido, que tais enzimas, podem desempenhar um papel modulador da inflamação e resposta imune mediada por ATP e ADP extracelular (Mizumoto, Kumamoto *et al.*, 2002). O ATP extracelular é envolvido em uma grande variedade de funções fisiológicas e patológicas (Hasko, Deitch *et al.*, 2002).

As NTPDases têm sido descritas em vários protozoários de acordo com Meyer-Fernandes (2002), e a atividade ecto-ATPásica tem sido relacionada à virulência, aquisição de purinas, sucesso no processo de aderência e internalização dos parasitos (Asai, Miura *et al.*, 1995; Nakaar, Beckers *et al.*, 1998; Silverman, Qi *et al.*, 1998; Bisaggio, Peres-Sampaio *et al.*, 2003; Pinheiro, Martins-Duarte *et al.*, 2006; Santos, Possa *et al.*, 2009).

No presente trabalho foi avaliada a imunolocalização da NTPDase-1, nas três formas do parasito, tripomastigota, epimastigota e amastigota da cepa Y.

5.1. Purificação da NTPDase-1 heteróloga de *T. cruzi*

Para a realização desse projeto, a apirase recombinante de *T. cruzi* (NTPDase-1) de aproximadamente, 66 kDa, foi expressa em sistema heterólogo bacteriano e purificada por cromatografia de afinidade, conforme descrito por Santos e seus colaboradores (2009). Como pode ser observada na figura 5, a presença de uma única banda no gel de SDS-PAGE das eluições. As eluições foram agrupadas e desalinizadas, e utilizadas como antígeno para imunização do coelho para obtenção do soro policlonal anti-NTPDase1 de *T. cruzi* e para montagem da coluna de afinidade para purificação dos anticorpos específicos contra a NTPDase-1 de *T. cruzi*.

A massa molecular observada para a NTPDase-1 recombinante purificada está de acordo com a proteína predita usando o programa Protparam para a sequência da NTPDase-1 heteróloga solúvel (sem a sequência hidrofóbica aminoterminal e o sítio de clivagem proteolítica previstos por Fietto et al., 2004, e adicionados dos aminoácidos derivados do vetor de clonagem contendo a cauda de hexa-histidina)

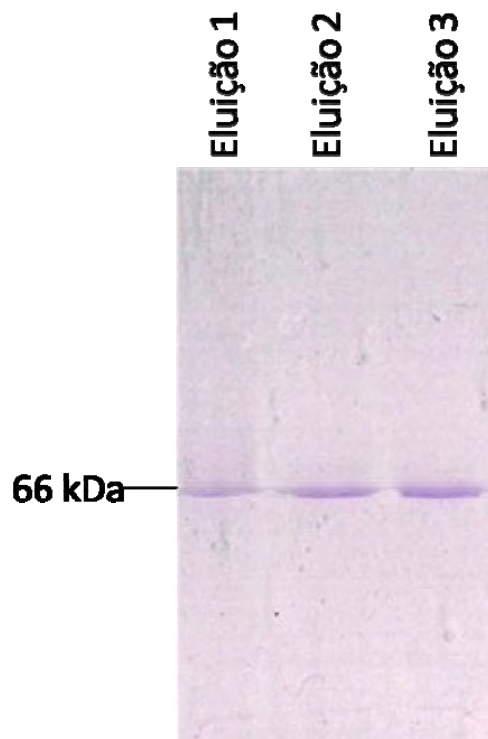


Figura 5 - NTPDase-1 de *T. cruzi* purificada. Uma amostra de 15 μ L de cada eluição da NTPDase-1 foi aplicada em cada canaleta, mostrando a proteína purificada com aproximadamente 66 kDa. SDS-PAGE 10%, corado com Azul de Coomassie.

5.2. Purificação e titulação dos anticorpos específicos.

Para obtenção do soro policlonal anti-NTPDase-1 foram efetuadas duas imunizações com a proteína NTPDase-1 de *T. cruzi* heteróloga em um coelho fêmea, como descrito anteriormente por Santos e seus colaboradores (2009). O soro total foi obtido e purificado através de cromatografia de afinidade, utilizando resina sepharose ligada covalentemente a NTPDase-1 recombinante purificada como descrito nos materiais e métodos, e assim obteve-se anticorpos (IgG) purificados específicos.

Os anticorpos purificados anti NTPDase-1 foram titulados pela técnica de *Western blot*, usando as seguintes diluições de 1:250, 1:500 e 1:1000. Como controle negativo utilizou-se o extrato total de *E. coli* como descrito nos materiais e métodos. Como pode ser visto na Figura 6, foi observado o reconhecimento nas três diluições testadas, assim, para os subsequentes experimentos adotou-se o título de 1:1000. Além disto, nenhuma banda protéica foi reconhecida no controle negativo utilizado contendo extrato total de *E. coli*, o que demonstra que o pool de anticorpos anti-NTPDase-1 reconhece de forma específica a NTPDase-1 quando comparada com o extrato protéico da bactéria.

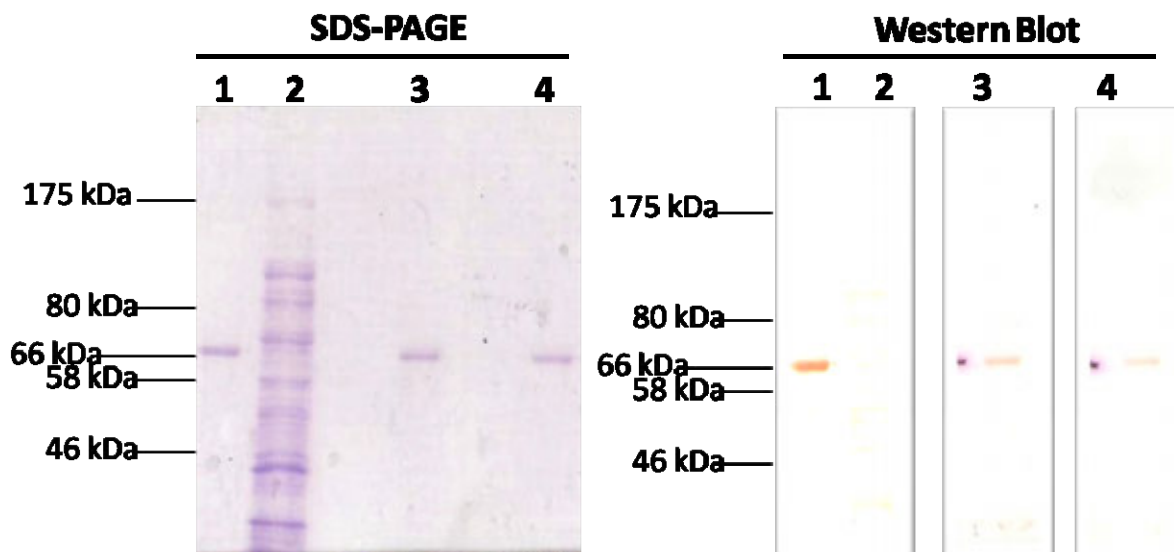


Figura 6 - Titulação do pool de anticorpos purificados anti-NTPDase-1 de *T. cruzi*. SDS-PAGE 10% corado com azul de coomassie, contendo nas canaletas 1, 3 e 4 amostra de 1 μ g de NTPDase-1 purificada. Canaleta 2 extrato total de *E. coli* DH5 α controle negativo. *Western blot* das amostras visualizadas no SDS-PAGE 10% usando o pool de anticorpos anti-NTPDase-1 em diferentes diluições. Canaletas (1 e 2) diluição de 1:250, (3) diluição de 1:500, (4) diluição de 1:1000, revelado pelo método da Peroxidase.

5.3. Avaliação da especificidade do pool de anticorpos purificados

Para confirmar a especificidade dos anticorpos purificados foi efetuado um ensaio de *Western blot* utilizando 1 μ g de NTPDase-1 heteróloga de *T. cruzi* (canaleta 1), e 1 μ g de GDPase-1 heteróloga de *L. major* (canaleta 2), sendo esta última uma proteína ortóloga da NTPDase-1 de *T. cruzi* (Fietto, Demarco *et al.*, 2004). Podemos observar na figura 7, que não houve reconhecimento da GDPase de *L. major*, aliado ao dado anterior que demonstrou o não reconhecimento do extrato total de *E. coli* DH5 α (Figura 6, canaleta 2) podemos sugerir que o pool de anticorpos purificados anti-NTPDase-1 é bastante específico para o reconhecimento da NTPDase-1 de *T. cruzi*, faltando ainda verificar esta especificidade quanto à diversidade de proteínas do parasito em si.

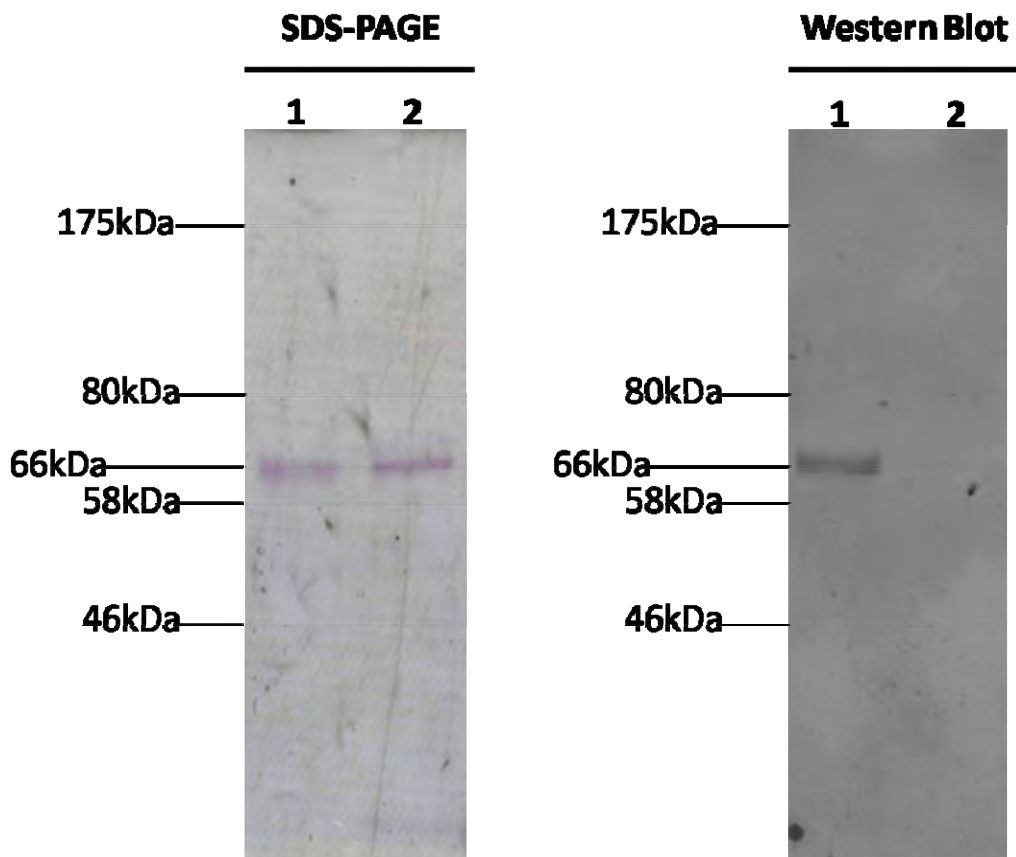


Figura 7- Avaliação da especificidade do pool de anticorpos purificados anti-NTPDase-1 através da análise de imunoreatividade cruzada com a E-NTPDase de *L. major* (GDPase). Na figura da esquerda temos o SDS-PAGE 10% corado com Azul de Coomassie, canaleta 1 - 1µg de NTPDase-1 recombinante de *T.cruzi* e canaleta 2 - 1µg de GDPase recombinante de *L. major*. Na figura da direita temos o *Western blot* das amostras mostradas no gel SDS-PAGE usando como anticorpo primário o pool de anticorpos purificados anti-NTPDase-1 e anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc.

É importante ressaltar que foi escolhida a GDPase de *L. major* neste ensaio de especificidade, pois de acordo com o que foi descrito por Fietto e seus colaboradores (2004), no qual se comparou a NTPDase de *T. cruzi* a todas as proteínas no banco de dados GenBank, a maior similaridade então apresentada foi com a guanosina difosfatase de *L. major* (GDPase), apresentando uma identidade de 31% e 46% de similaridade considerando os 631 aminoácidos relativos as proteínas deduzidas. Tanto a NTPDase-1 de *T. cruzi* como a GDPase de *L. major*

possuem um longa porção amino terminal presente somente nas proteínas de tripanosomatídeos, que pode ser sugerida como parte da adaptação ao parasitismo, ao longo do processo evolutivo.

5.4. Imunodeteção de NTPDase-1 de *T. cruzi* em extrato total de tripomastigota de primeira passagem usando soro policlonal e os anticorpos purificados

Análises realizadas, por *Western blot*, possibilitaram a imunodeteção de uma única banda a uma proteína de 66 kDa, alusivo a NTPDase1 ou um homólogo nos extratos de tripomastigotas, em ambos os *Western blots*, tanto na membrana incubada com o anticorpo purificado (canaleta 2), quanto com soro policlonal (canaleta B), assim como houve um reconhecimento da banda correspondente a NTPDase-1 de *T. cruzi* heteróloga purificada (canaleta 1) de mesmo peso molecular de 66 kDa, (Figura 8). Foi realizado o *Western blot* do extrato total de tripomastigota, no qual foram aplicadas 20µg de proteína total, separadas por eletroforese (SDS-PAGE), e depois transferidas para uma membrana de nitrocelulose, que posteriormente foi incubada com os anticorpos anti NTPDase-1 purificados e soro policlonal anti NTPDase-1 na diluição de 1:1000, e marcadas com anticorpo secundário conjugado a Fitc na diluição de 1:20000, como descrito anteriormente nos materiais e métodos. Esses resultados são corroborados por Fietto, DeMarco e seus colaboradores (2004), que a partir do RNAm de epimastigotas, isolou um gene da suposta NTPDase 1, cujo tamanho é de, aproximadamente, 69 kDa. Neste trabalho ainda foi caracterizado a atividade NTPDásica em parasitas intactos da cepa Y.

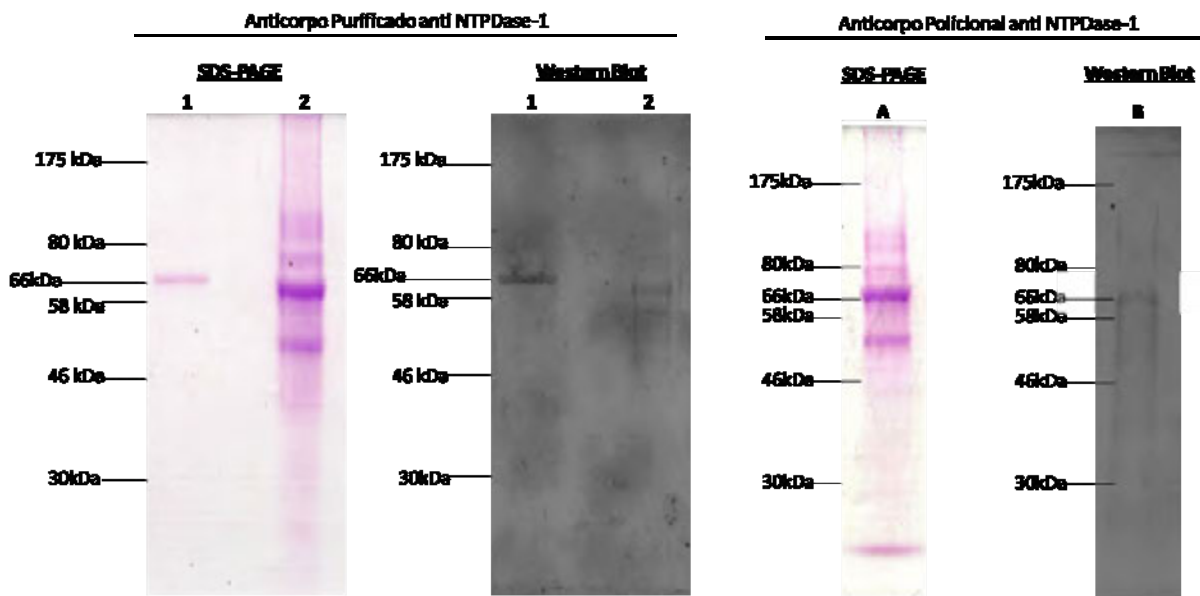


Figura 8 - Imunodetecção da NTPDase-1 de *T. cruzi*, utilizando anticorpo anti NTPDase-1 *T. cruzi* purificado e soro policlonal em extrato bruto de tripomastigotas de primeira passagem. As duas figuras da esquerda correspondem ao SDS-PAGE 10% e *Western blot* respectivo feito usando o pool de anticorpos anti-NTPDase-1 purificado (Ac Purificado) e as duas figuras da direita correspondem ao mesmo tipo de ensaio feito usando o antisoro policlonal anti-NTPDase-1. Na canaleta (1) - 1µg de NTPDase-1 de *T. cruzi* purificada, na canaleta (2) - 20µg de extrato total de tripomastigotas de primeira passagem. O *Western blot* foi revelado através da fluorescência do anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc na diluição de 1:20.000.

Santos e seus colaboradores (2009), baseado em ensaio de infecção, *in vitro*, e na mensuração da atividade hidrolítica de ATP em tripomastigotas intactos, oriundos de passagens celulares em cultura de célula VERO, apontaram uma correlação entre a diminuição da relação de hidrólise ATP/ADP e a diminuição da capacidade infectiva. Ainda neste trabalho, foi demonstrado que tripomastigotas de P1, incubados com suramina, considerado um potente inibidor de Ecto-ATPDase, apresentaram uma diminuição significativa de mais de 50% na infectividade em células VERO. O nível de inibição da suramina sobre a NTPDase-1 recombinante, expressa em sistema heterólogo, foi muito semelhante à taxa de inibição da atividade hidrolítica em parasitos intactos. Neste mesmo trabalho, ensaios *in vitro*,

utilizando o anti-soro policlonal anti NTPDase-1 (mesmo usado nesta dissertação), não produziu qualquer ação inibitória em relação a atividade enzimática da proteína recombinante, sugerindo na época que os anticorpos presentes em tal soro poderiam estar reconhecendo outra proteína homóloga à NTPDase-1 ou que os mesmos se ligariam a NTPDase-1, em regiões não essenciais para a atividade enzimática. Por outro lado este mesmo antisoro anti-NTPDase-1 foi mostrado como capaz de inibir a infecção *in vitro* em cerca de 50%, sugerindo que a ligação à estas outras regiões da NTPDase-1 afeta a capacidade de infectar dos tripomastigotas de P1. Nossos dados mostraram que no extrato total dos tripomastigotas de P1 somente uma banda protéica é reconhecida tanto pelo soro policlonal quanto pelo pool de anticorpos purificados.

Este dado reforça a idéia de que a proteína presente na superfície dos tripomastigotas, demonstrada como importante para o processo infectivo deve mesmo ser a própria NTPDase-1 e não uma proteína homóloga a esta. Porém não podemos descartar a hipótese de nas condições do *Western blot* (diluição 1:1000 e reconhecimento de epítomos lineares) a especificidade ser diferente das condições de uso do parasito vivo como nos ensaios de inibição da infecção *in vitro* mostrados por Santos et al., 2009, já que neste caso a diluição do soro policlonal anti-NTPDase-1 foi de 1:100, existindo também a possibilidade de reconhecimento de epítomos conformacionais não disponíveis em *Western blot*.

5.5. Imunodeteção da NTPDase -1 de *T. cruzi* em extrato total de epimastigota com soro policlonal, anticorpos purificados e anti CD39 humano

Foi realizada a imunodeteção da NTPDase-1, usando a técnica de *Western blot*, em extrato total de dois lotes diferentes de epimastigotas mantidos em cultura axênica. Os mesmos serão mostrados de forma independente devido ao resultado distinto que foi observado.

Em um primeiro lote foram usados como anticorpos primários: soro policlonal 1:1000, Ac anti NTPDase-1 Purificado 1:1000, e Anti CD 39 1:2000. Todas as

membranas foram reveladas pela fluorescência do anticorpo secundário conjugado a Fitc, usado na diluição de 10.000. Este primeiro ensaio está mostrado na figura 9. Analisando a figura deste ensaio (Figura 9), podemos observar um mesmo padrão de reconhecimento dos anticorpos utilizados (policlonal, purificado e anti CD 39), demonstrando o reconhecimento de uma banda de cerca de 66 kDa (canaletas 2, 4 e 6) compatível com a a massa molecular da NTPDase-1. Não foi detectado sinal nos controles negativos, referentes ao extrato de *E. coli* DH5 α (dados não mostrados). Pode-se observar também que na revelação do *Western blot* feito com o anti-soro policlonal anti CD 39 aparecem duas bandas, a mesma compatível com a massa molecular da NTPDase-1 e uma segunda banda bem mais fracamente reconhecida com aproximadamente 46 kDa, que não foi observada com o uso dos outros dois anticorpos. Esta segunda banda poderia ser referente a uma segunda isoforma de e-NTPDase de *T. cruzi* ainda não descrita, visto que para os outros tripanosomatídeos esta segunda isoforma é encontrada no genoma (Fietto, Demarco *et al.*, 2004). A pouca reação observada pode ser devido a diferença de expressão, ou a baixa identidade entre estas isoformas que para *T. brucei* e *L. major* é menor do que 30%.

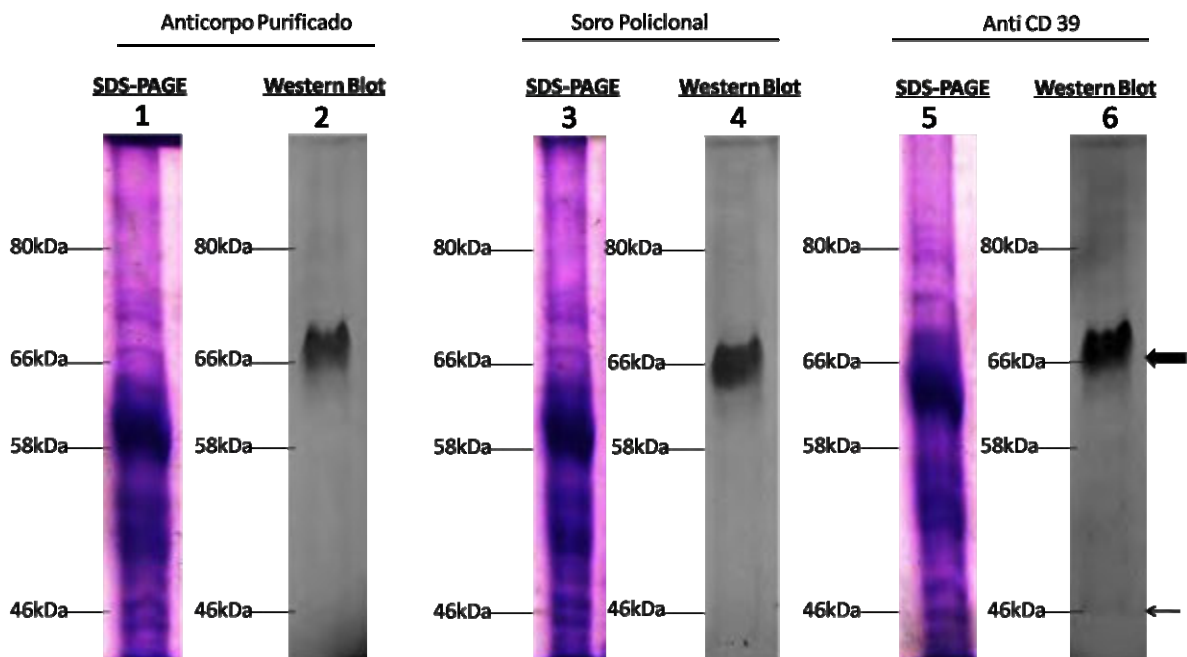


Figura 9 – Imunodeteção da NTPDase-1 de *T. cruzi*, utilizando soro policlonal anti NTPDase-1(1:1000), anticorpos purificados anti NTPDase-1 (1:1000) e Anti CD 39 de humano (1:1000) – Em cada figura as canaletas 1, 3 e 5 representam o perfil protéicos dos extratos de epimastigotas em gel SDS-PAGE 10% corado com coomassie e na direita, canaletas 2, 4 e 6 o *Western blot* respectivo as amostras de extrato protéico. O *Western blot* foi visualizado através da fluorescência do anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc 1:10.000. Na revelação do *Western blot* com anti-CD39 visualizam-se duas bandas protéicas, uma mais forte, indicada pela seta larga, e uma mais fraca, indicada pela seta fina.

Curiosamente, podemos observar uma forte marcação no extrato total de epimastigotas, (Figura 9 canaletas 2, 4 e 6) que foi, consideravelmente, maior em relação ao sinal observado no extrato de tripomastigotas (figura 8), uma vez que foram aplicados no gel de SDS-PAGE a mesma quantidade de proteínas totais, 20µg, dosadas pelo método de Bradford. Porém a concentração do anticorpo secundário foi maior neste ensaio (diluição de 1:10.000) em relação ao ensaios dos tripomastigotas (diluição de 1:20.000).

Considerando que a literatura aponta uma maior atividade de E-NTPDase nas formas infectivas, era de se esperar que a marcação dos tripomastigotas fosse mais

evidente do que a dos epimastigotas, aparentemente contrário ao aqui observado. Porém é importante salientar que apesar de ter-se aplicado quantidades iguais de extrato protéico total para tripomastigotas e epimastigotas, a imagem do extrato corado parece mais intensa (mais proteína) nos extratos de epimastigotas do que nos tripomastigotas. Assim pode também ter havido algum desvio de ligação do corante azul de coomassie em relação ao conteúdo protéico dos extratos. Isto se explicaria devido ao alto coeficiente de variação (média de 38%) da ligação do reagente de Bradford em relação ao conteúdo de aminoácidos básicos ou aromáticos das proteínas. Outra explicação seria a da qualidade do reagente usado nas dosagens que por não ter sido a mesma alíquota pode levar a uma diferença na dosagem.

Outra possibilidade a se discutir é a questão da localização sub-celular da NTPDase-1 nas formas epimastigotas e tripomastigotas. Uma hipótese pode ser que apesar dos epimastigotas aparentemente possuírem maior quantidade da NTPDase-1 esta possa estar retida intra-celular em algum reservatório da via secretória como por exemplo no reservossoma, enquanto que nos tripomastigotas a mesma não fique retida em compartimentos intracelulares. Outra possibilidade é a secreção da NTPDase-1. Como a NTPDase-1 apresenta um peptídeo sinal aminoterminal que pode ser clivado proteoliticamente liberando uma proteína solúvel pode ser que nos tripomastigotas a maior parte desta enzima esteja sendo secretada para controlar a concentração de nucleotídeos extra-celulares a fim de evitar a estimulação do sistema imune e favorecer a infecção pelo parasito, visto que trabalhamos todo o tempo com os tripomastigotas de P1 a fim de ainda mantermos as características de alta infectividade próximas ao que deve ser observado para o tripomastigotas sanguíneos. A atividade E-NTPDásica solúvel já foi demonstrada para vários patógenos como *T. gondii* e *S. mansoni* (Silverman, Qi *et al.*, 1998; Demarco, Kowaltowski *et al.*, 2003) e também já tendo sido observada por nosso grupo de pesquisa (dados não publicados do mestrado de Ramon de Freitas Santos, 2008).

Em um segundo ensaio foi feita outra avaliação do extrato de epimastigotas, no qual a membrana foi incubada somente com os anticorpos policlonais anti

NTPDase-1 de humano (anti-CD39), na diluição de 1:2000, sendo anticorpo secundário empregado anti IgG de coelho conjugado a Fitc na diluição 1:20.000. Este resultado está mostrado na figura 10, onde a esquerda, temos o gel de SDS-PAGE, e a direita a membrana de nitrocelulose revelada, na qual podemos observar, como na figura 9 do ensaio anterior, a detecção de duas proteínas principais, uma na altura de 66 kDa correspondente a NTPDase-1 e outra na altura aproximada de 46 kDa (canaleta 1). Além disto, na canaleta 2, podemos perceber que também houve a imunodeteção da NTPDase 1 recombinante purificada. Porém diferente do que foi observado no ensaio anterior (Figura 9) a banda mais proeminente foi a de 46 kDa e não a de 66 kDa.

Anti CD 39

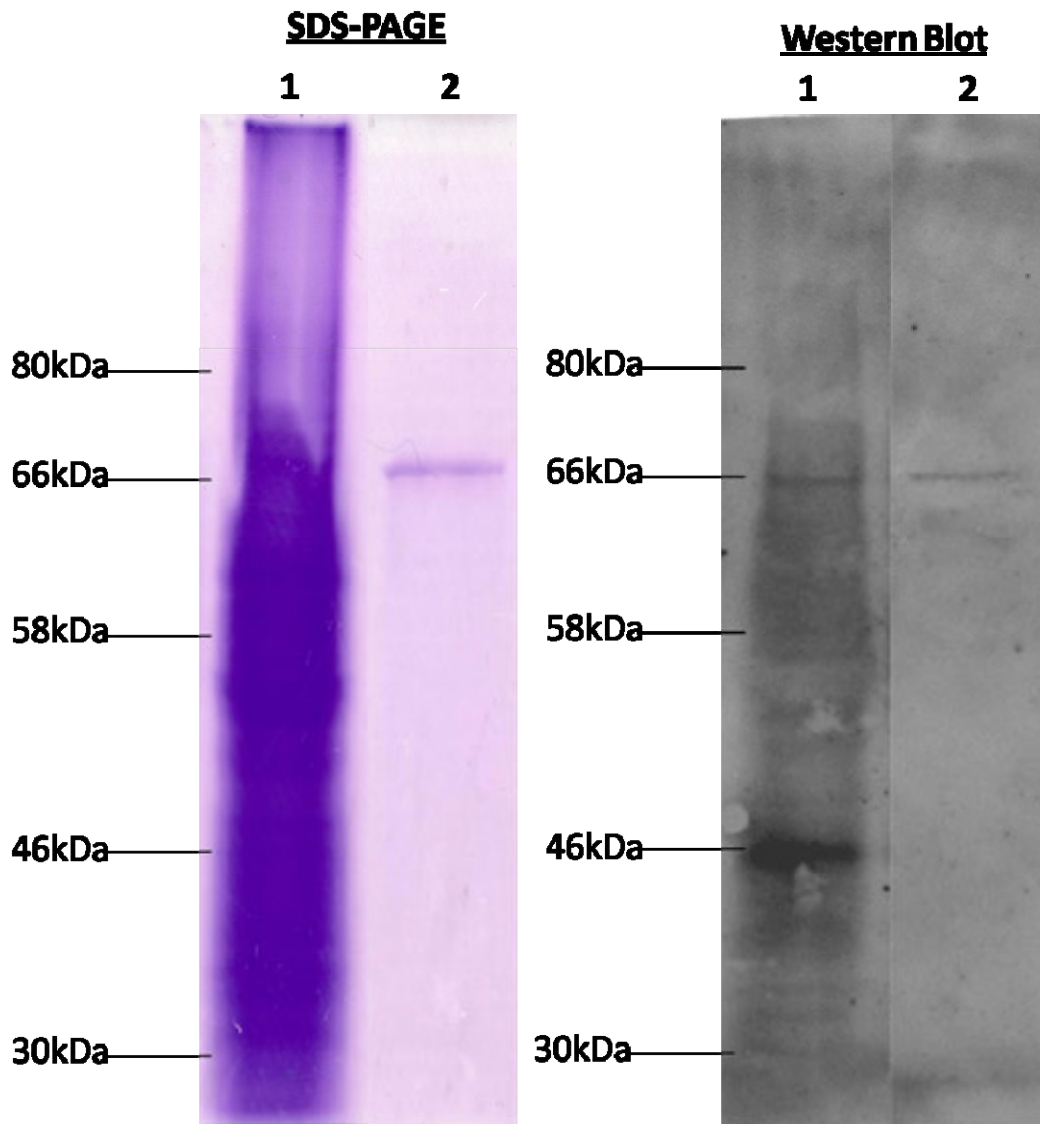


Figura 10 – *Western blot* de extratos protéicos de epimastigotas utilizando como anticorpo primário Anti CD39 de humano. A esquerda temos SDS-PAGE 10% corado com Azul de Coomassie e na direita o *Western blot* respectivo. Na canaleta 1 foi aplicado o extrato total de epimastigota (não quantificado) e na canaleta 2 – 1 μ g de NTPDase-1 de *T. cruzi* purificada. A revelação foi feita pela detecção de fluorescência do anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc.

Embora as buscas realizadas no banco de dados genômico de *T. cruzi* (cepa CL-Brener) encontre uma única isoforma do gene codificante da NTPDase-1 (Fietto, Demarco *et al.*, 2004), os ensaios de *Western blot* com anticorpo anti CD39, reconhecem nos epimastigotas além da banda referente a NTPDase-1, uma proteína de massa molecular de aproximadamente 46 kDa (Figura 10). Como dito anteriormente esta pode ser um possível homólogo da NTPDase-1 de *T. cruzi*, considerando que outros tripanossomatídeos possuem duas cópias de E-NTPDases no genoma (Fietto, Demarco *et al.*, 2004).

Corroborando essa idéia, Fietto, DeMarco e seus colaboradores em (2004) realizaram uma imunoprecipitação de uma possível apirase, a partir de epimastigotas da cepa Y marcados com metionina [³⁵S], utilizando anticorpo policlonal anti-apirase de *T. gondii*, resultando no reconhecimento de uma única banda de massa molecular aproximada 58 kDa. Como a técnica de SDS-PAGE unidimensional tem baixa resolução não sendo usada para determinação acurada da massa molecular de proteínas pode ser que a banda aqui sugerida como tendo aproximadamente 46 kDa seja a mesma mostrada por Fietto (2004). Fato é que esta banda não foi reconhecida pelo anticorpo policlonal anti-NTPDase-1 de *T. cruzi*, nem tão pouco pelos anticorpos anti-NTPDase-1 purificados, nas condições de *Western blot* aqui testadas.

É importante ressaltar que os dois ensaios de *Western blot* usando epimastigotas mostraram resultados semelhantes quanto à presença de duas proteínas sendo reconhecidas pelo anti-CD39, mas a relação de expressão das mesmas nos dois extratos foi contrária, sendo as isoforma diferentemente expressas nos dois extratos (comparar Figuras 9 e 10 com anti-CD39). Considerando a variabilidade genética da cepa Y, pode haver uma variação no padrão de proteínas expressas mesmo em uma mesma forma morfológica do parasito, já que a cepa Y é constituída de uma mistura de três clones (Silva, 1953), que podem estar diferentemente representados em lotes distintos de parasitos.

Além disso, deve ser considerada a fase de crescimento das culturas de epimastigotas, visto que existe diferença da fase logarítmica na qual há uma intensa multiplicação dos parasitos, e da fase estacionária, quando a população alcança

15x10⁸ parasitas/mL de meio LIT, mas não há mais intensa multiplicação, o que pode refletir em um diferente padrão de expressão protéica. No caso da forma tripomastigota, é necessário se determinar um padrão para a realização dos experimentos para que os dados possam ser comparados, pois há mudanças biológicas visíveis e bioquímicas detectáveis durante a manutenção *in vitro* como foi mostrado por Santos e colaboradores (2009). Por outro lado, para a forma epimastigota, cujo cultivo em laboratório é mais prático e simples, não é usual, nem tão pouco foi ainda mostrada a necessidade de se manter um padrão da população para que as análises de um mesmo grupo ou de diferentes grupos possam ser comparadas. No caso específico desta dissertação não houve um controle específico do número de passagens acelulares dos lotes de epimastigotas, nem tão pouco da fase de crescimento. Os resultados desta dissertação apontam a necessidade de padronização e sincronia no uso dos epimastigotas, o que pode ser estendido para qualquer outra forma do parasito, visto que o mesmo já foi observado para tripomastigotas.

5.6. Imunolocalização da NTPDase1 em parasitos vivos não permeabilizados

Para realização dos experimentos de imunolocalização da NTPDase-1 na superfície dos parasitas, foram testados os mesmos três anticorpos primários: o soro policlonal, o anticorpo purificado, e o anticorpo comercial anti CD 39 de humano (Sigma)®, todos na diluição de 1:100, com exceção da forma não infectiva, epimastigota, para a qual não foi utilizado o anticorpo anti CD39 de humano. Como anticorpo secundário, foi utilizado anticorpo anti IgG de coelho conjugado a Fitc (Sigma)®, na diluição de 1:500, tal como descrito nos materiais e métodos. Nesse ensaio, não houve a permeabilização da membrana dos parasitos, e ainda cabe ressaltar que, a mobilidade e a viabilidade dos parasitos foram observadas durante todas as etapas do experimento. As lâminas montadas foram analisadas usando Microscópio óptico de varredura a laser, Confocal, Zeiss®, modelo LSM 510 META, usando laser de argônio (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) no comprimento de excitação de 488 nm, filtros LP 475 para as formas tripomastigotas, amastigotas, e LP

505 para a forma epimastigotas como descrito por de Souza e de Carvalho (1998). Todas as imagens foram feitas sob as mesmas condições, com exceção dos controles que foram expostos também com mais intensidade para visualização do fundo com não marcação dos parasitos. Os resultados podem ser observados nas Figuras 11.

Aparentemente não houve discrepância no padrão de marcação dos parasitas em relação ao uso dos diferentes anticorpos primários usados, a marcação ocorreu na superfície das três formas evolutivas: tripomastigota, amastigota e epimastigota. Os tripomastigotas (figuras 11, 12 e 13) e amastigotas (figuras 16, 17, 18) exibiram marcação mais intensa e espalhada, ao longo de toda sua superfície se comparados com os epimastigotas (figuras 21, 22). A marcação da forma tripomastigota foi menos intensa que a amastigota (comparar figuras 11, 12 e 13 com as figuras 16, 17 e 18), sendo presente ao longo do corpo e não detectável na região flagelar. Curiosamente, os epimastigotas apresentaram uma marcação pontual em duas regiões, na extremidade do flagelo, região anterior do parasito, e na região mediana do corpo, representados nas figuras 21 e 22. Os controles não exibiram marcação (figuras 14, 15, 19, 20, 23 e 24).

TRIPOMASTIGOTAS

Anti CD 39

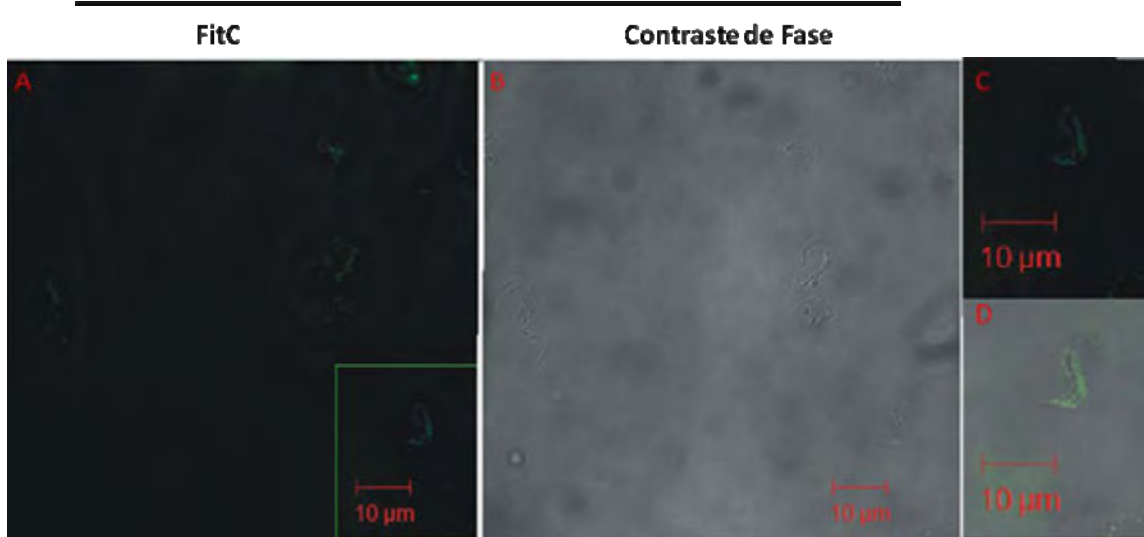


Figura 11 - Microscopia confocal de tripomastigotas marcados com anticorpos anti NTPDase-1 (Anti CD39) e anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc. A- Fitc; B- Campo Claro; C- Secção de A; D- Secção de A e B sobrepostas. Barras = 10 µm

TRIPOMASTIGOTAS

Anti-NTPDase-1 Purificado

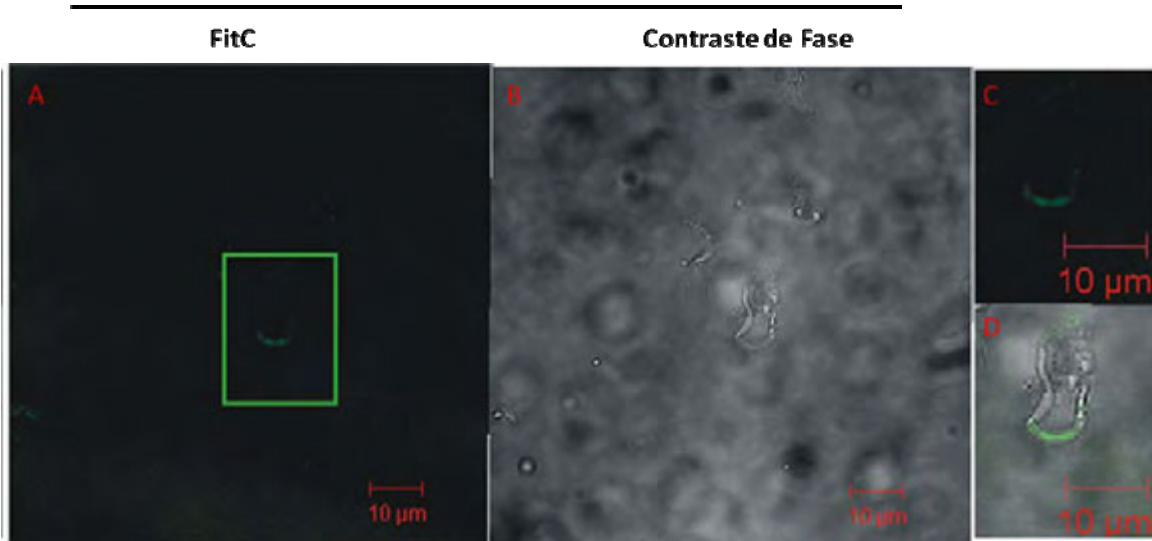


Figura 12 - Microscopia confocal de tripomastigota marcados com anticorpos anti NTPDase-1 Purificado e anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc. A- Fitc; B- Campo Claro; C- Secção de A; D- Secção de A e B sobrepostas. Barras = 10 µm

TRIPOMASTIGOTAS
Anti-NTPDase-1 Policlonal

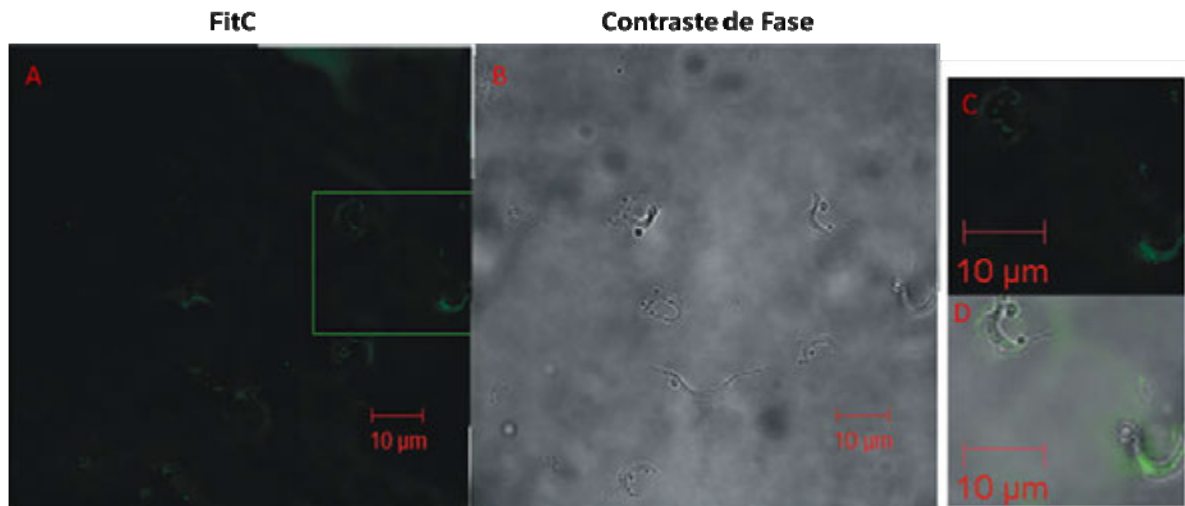


Figura 13- Microscopia confocal de tripomastigota marcados com anticorpos anti NTPDase-1 policlonal e anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc. A- Fitc; B- Campo Claro; C- Secção de A; D- Secção de A e B sobrepostas. Barras = 10 μm

TRIPOMASTIGOTAS

Soro Pré Imune

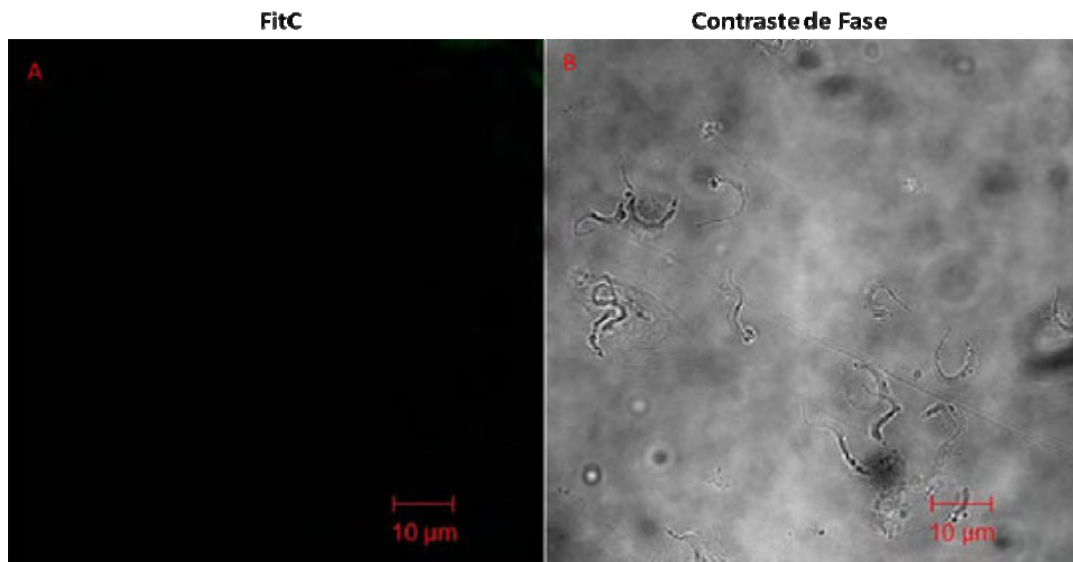


Figura 14- Microscopia confocal de tripomastigota, (controle negativo) incubados soro pré imune e anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc. Barras = 10 µm

TRIPOMASTIGOTAS

Controle Negativo

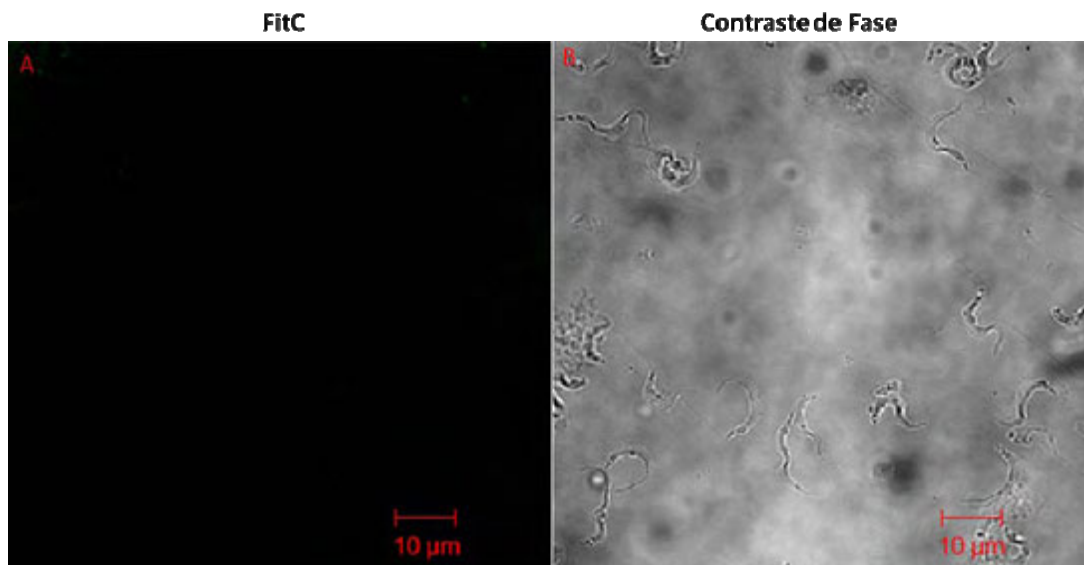


Figura 15- Microscopia confocal de tripomastigota, (controle negativo) incubados somente com anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc. Barras = 10 µm

AMASTIGOTAS

Anti CD 39

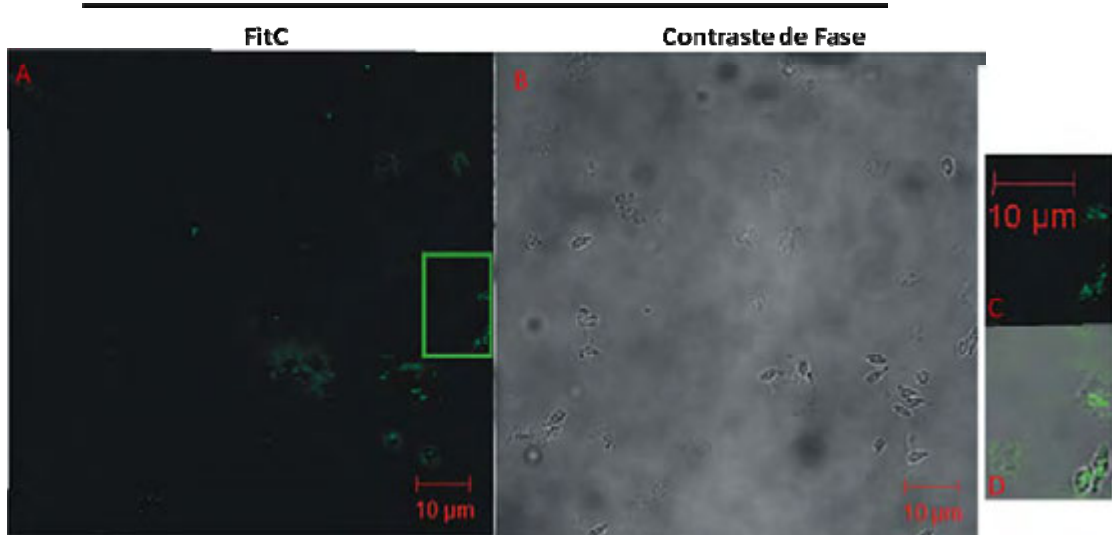


Figura 16 - Microscopia confocal de amastigotas marcados com anticorpos anti NTPDase-1 (Anti CD39) e anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc. A- Fitc; B- Campo Claro; C- Secção de A; D- Secção de A e B sobrepostas. Barras = 10 μm

AMASTIGOTAS

Anti-NTPDase-1 Purificado

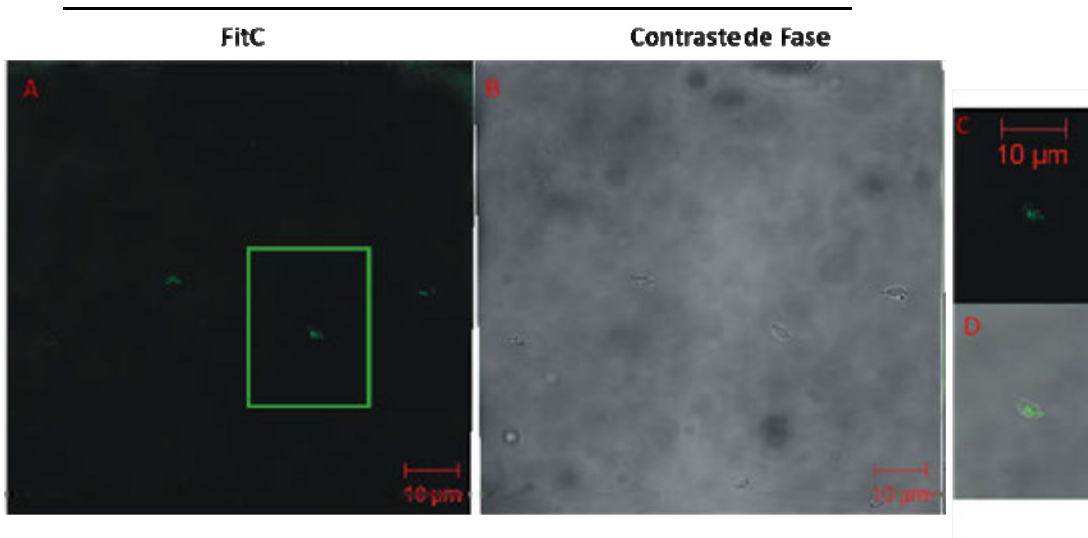


Figura 17 - Microscopia confocal de amastigotas marcados com anticorpos anti NTPDase-1 Purificado e anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc. A- Fitc; B- Campo Claro; C- Secção de A; D- Secção de A e B sobrepostas. Barras = 10 μm

AMASTIGOTAS

Anti-NTPDase-1 Policlonal

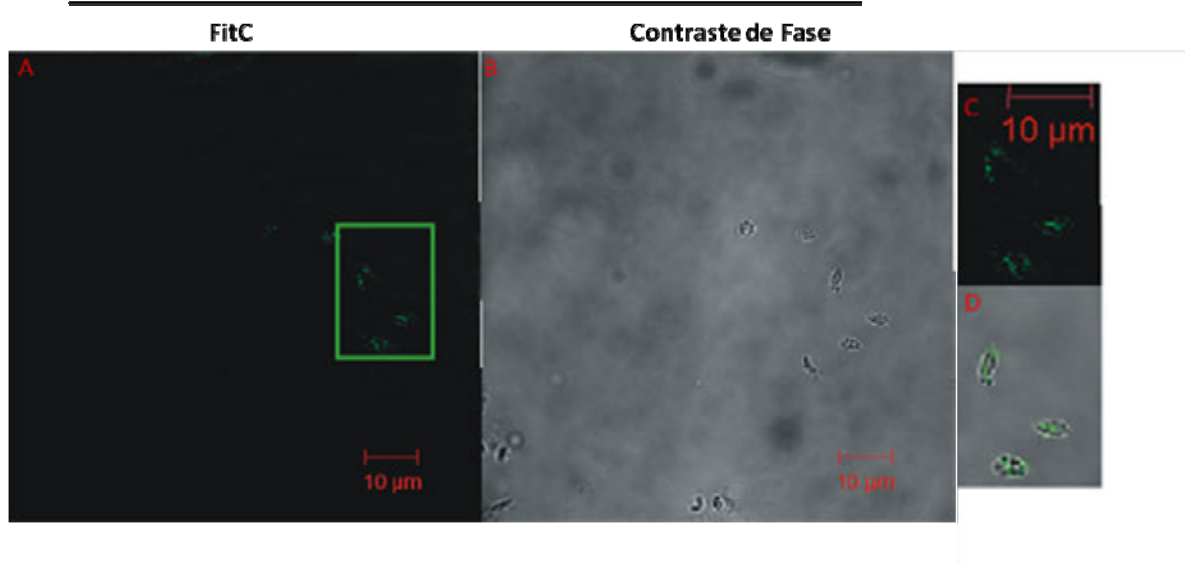


Figura 18 - Microscopia confocal de amastigotas marcados com anticorpos anti NTPDase-1 Policlonal e anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc. A- Fitc; B- Campo Claro; C- Secção de A; D- Secção de A e B sobrepostas. Barras = 10 μm

AMASTIGOTAS

Soro Pré Imune

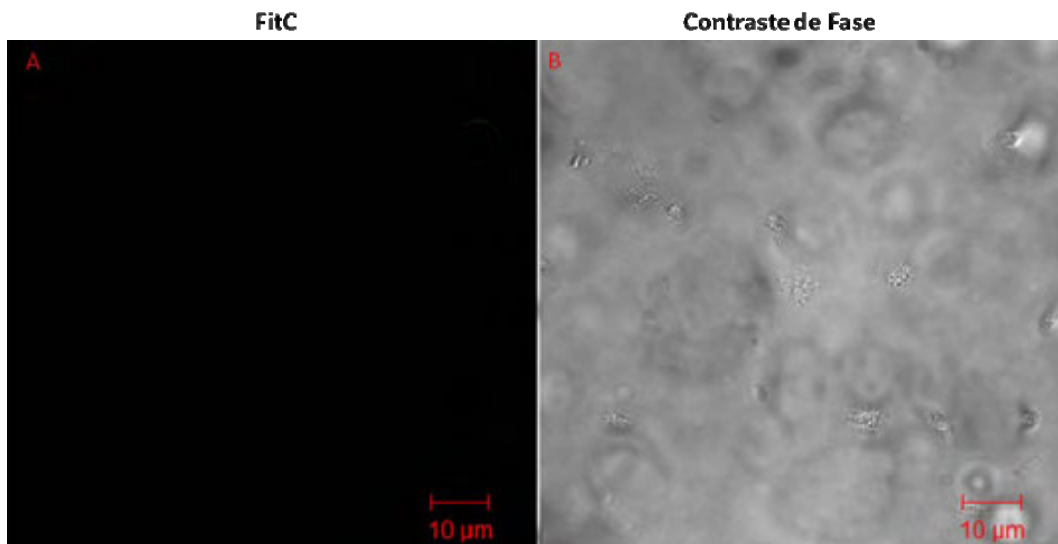


Figura 19- Microscopia confocal de amastigota, (controle negativo) incubados soro pré imune e anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc. Barras = 10 μm

AMASTIGOTAS

Controle Negativo

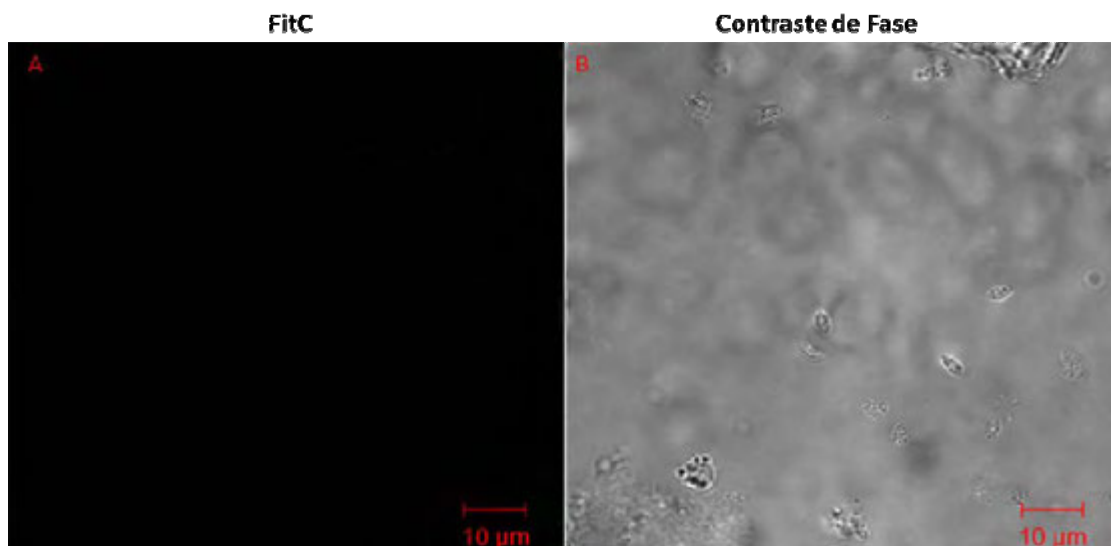


Figura 20 - Microscopia confocal de amastigota, (controle negativo) incubados somente com anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc. Barras = 10 μm

EPIMASTIGOTAS
Anti-NTPDase-1 Purificado

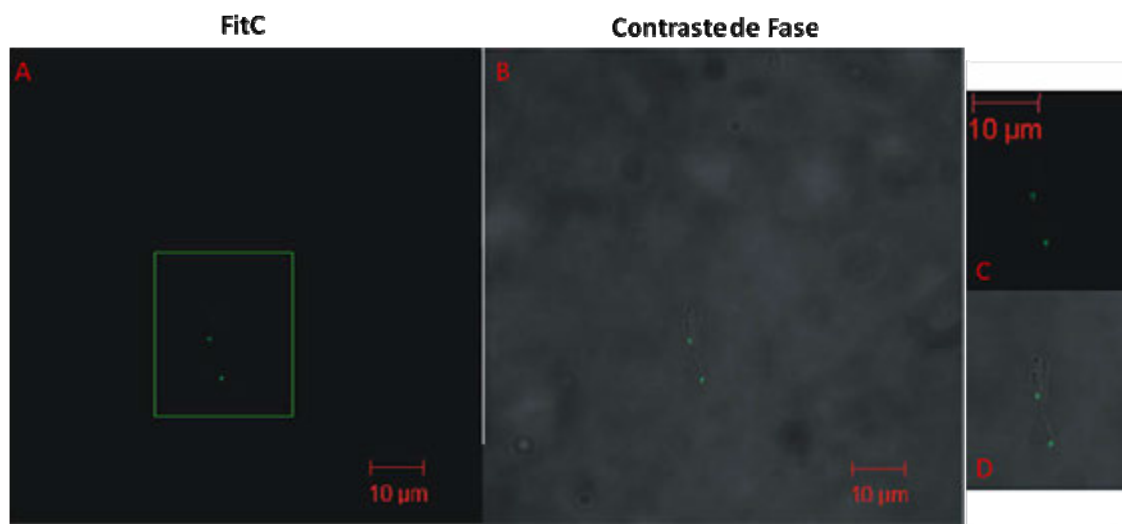


Figura 21 - Microscopia confocal de Epimastigotas marcados com anticorpos anti NTPDase-1 Purificado e anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc. A- Fitc; B- Campo Claro; C- Secção de A; D- Secção de A e B sobrepostas. Barras = 10 μm

EPIMASTIGOTAS
Anti-NTPDase-1 Policlonal

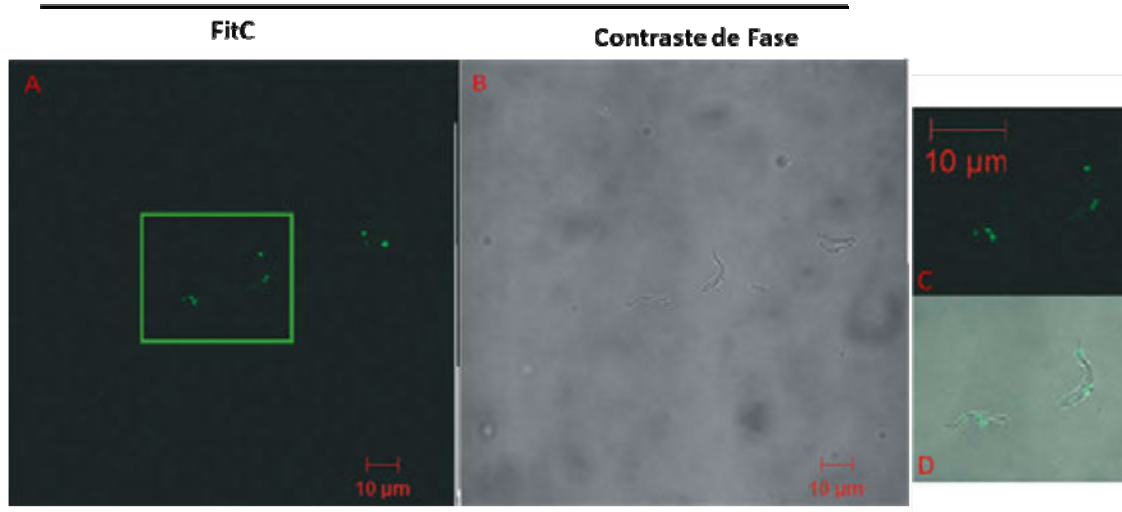


Figura 22 - Microscopia confocal de Epimastigotas marcados com anticorpos anti NTPDase-1 Policlonal e anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc. A- Fitc; B- Campo Claro; C- Secção de A; D- Secção de A e B sobrepostas. Barras = 10 μm

EPIMASTIGOTAS

Soro Pré Imune

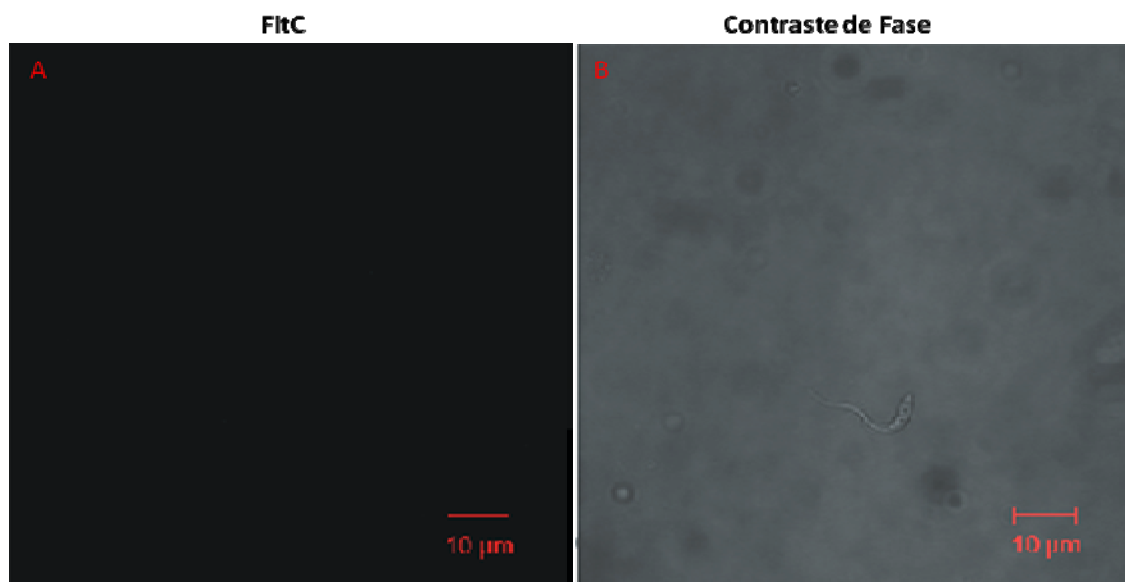


Figura 23- Microscopia confocal de epimastigota, (controle negativo) incubadas soro pré imune e anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc. Barras = 10 µm

EPIMASTIGOTAS

Controle Negativo

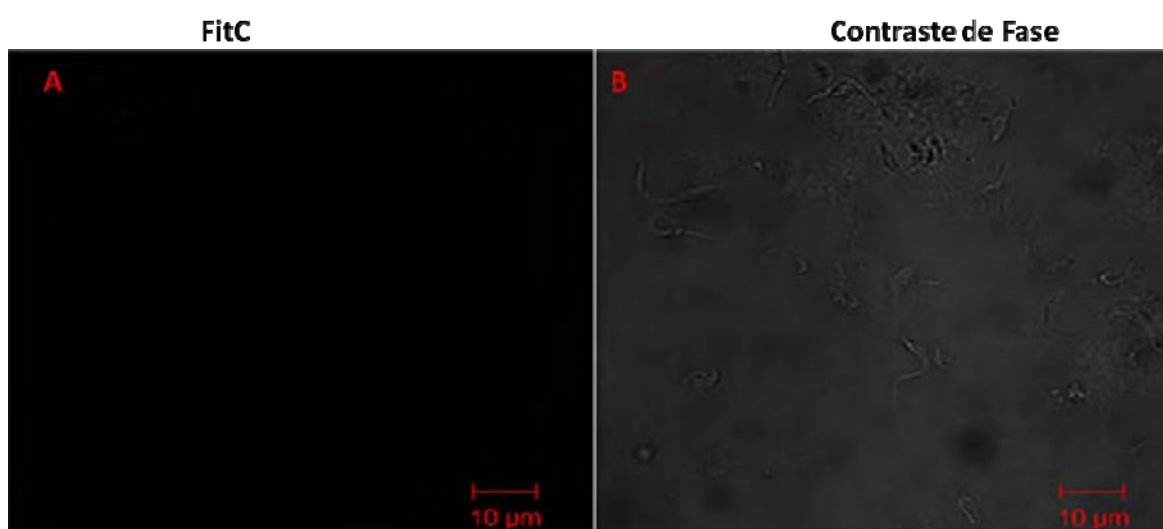


Figura 24 - Microscopia confocal de epimastigotas, (controle negativo) incubadas somente com anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a Fitc. Barras = 10 µm

Entretanto, experimentos de imunofluorescência realizados por Fietto, DeMarco e seus colaboradores (2004), em parasitos intactos de *T. cruzi*, usando o anticorpo anti-NTPDase de *T. gondii*, resultou em marcação da superfície das três formas evolutivas. Os amastigotas exibiram uma maior intensidade de marcação e a coloração foi homogênea ao longo de toda a sua superfície, enquanto que nos tripomastigotas a marcação foi menos intensa. Já a forma não infectiva mostrou que os epimastigotas de *T. cruzi* foram imunomarcados em sua superfície, mas não na região flagelar. Tomados em conjunto, os dados indicam que a NTPDase-1 ou algum homólogo estava presente em todas as formas do parasito estudadas. Haja vista que os experimentos foram realizados com a cepa Y, que além de ser uma cepa altamente infectiva, é composta por três clones diferentes (Silva et al, 1953), essa variabilidade genética pode refletir em um padrão de expressão de proteínas diferenciado. Várias podem ser as razões para a divergência dos dados de Fietto et al (2004) em relação aos dados desta dissertação, como por exemplo a especificidade do anticorpo anti-apirase de *T. gondii* (que pela imunoprecipitação mostrada em (Fietto, Demarco et al., 2004) parece ser específico para uma isoforma diferente da NTPDase-1); a variação de título de anticorpo e o tipo de anticorpo usado, que nos dois trabalhos são diferentes. Outro ponto que pode levar a resultados diferentes é a não sincronia dos parasitos que no caso do trabalho de 2004 não foi controlada e nos ensaios desta dissertação foram usados tripomastigotas e amastigotas de P1 somente.

Além disso, a taxa de expressão da NTPDase-1 ou de seu homólogo é certamente significativamente menor se comparada com proteínas constitutivas do citoesqueleto do parasito que são altamente expressas (Gull, 1999) podendo haver no caso, maior dificuldade de detecção, devendo ser testadas diluições mais concentradas dos anticorpos deste estudo. Embora as diluições adotadas nos ensaios desta dissertação, de 1:100 para os anticorpos primários e 1:500 para os secundários, sejam consideradas satisfatórias. Talvez uma diluição menor pudesse refletir em marcação mais intensa. Nesse tipo de análise, em parasitos intracelulares, as diluições variam entre 1:10 a 1:50 para o anticorpo primário, e de 1:50 a 1:100 para o secundário, geralmente conjugado a um fluoróforo (De-Souza, De-Carvalho et al., 1998; Baqui, Milder et al., 2000; Carrero-Lerida, Perez-Moreno et al., 2009)..

5.7. Imunofluorescência de epimastigota permeabilizados

Foi realizado também um ensaio de imunofluorescência em outro lote de epimastigotas, marcados com soro policlonal na diluição de 1:10, e anticorpo secundário conjugado com Fitc, diluídos a 1:100, como descrito, previamente, nos materiais e métodos. A membrana dos parasitos foi permeabilizada com etanol, permitindo o acesso dos anticorpos ao citoplasma. Os parasitos exibiram uma forte marcação na região posterior (no fundo do corpo do parasito) e uma marcação mais tênue por todo o corpo do parasito, com excessão do flagelo, como pode ser observado na figura 25. Não houve marcação nas preparações incubadas com o soro pré imune.

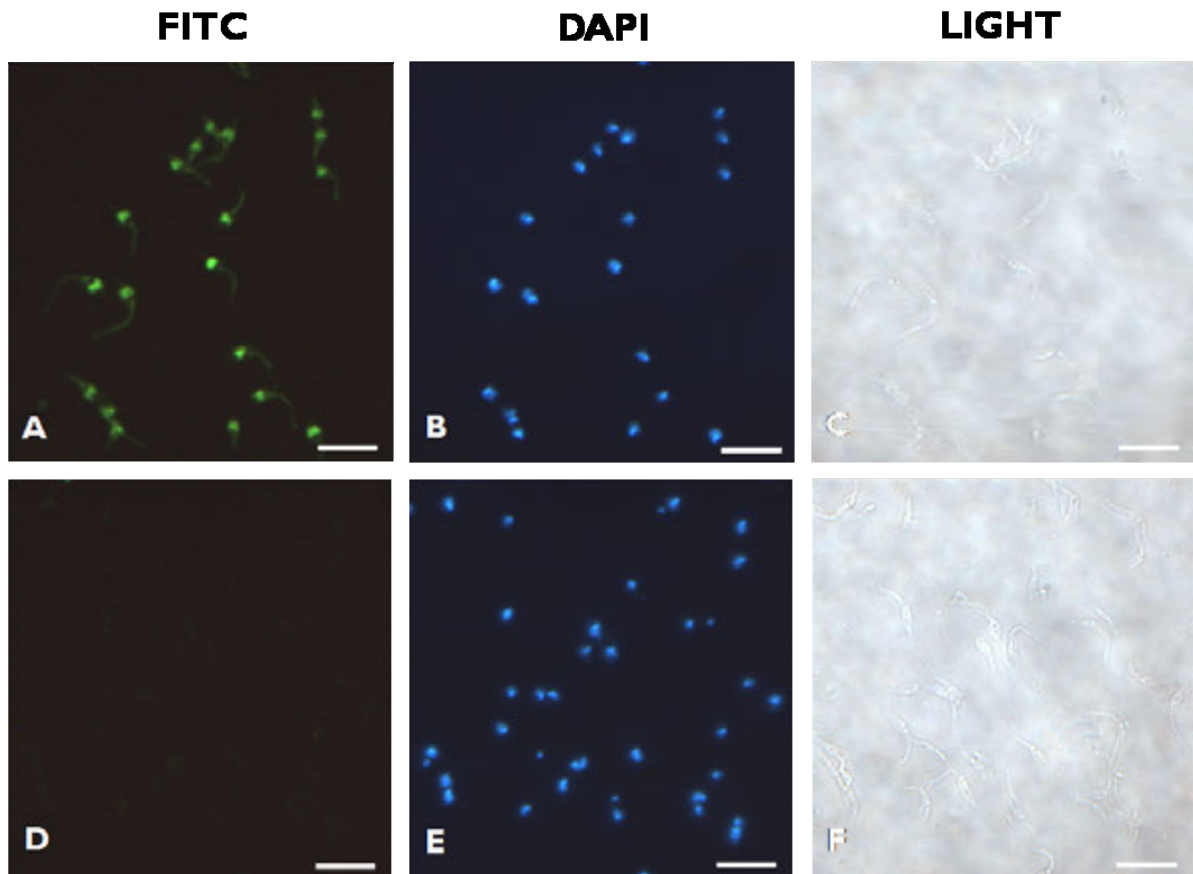


Figura 25 - Microscopia de fluorescência, marcados com anticorpos anti NTPDase-1. Barras = 10 μ m (A) epimastigotas marcados com Fitc; (B,E) núcleos e cinetoplasto marcados com DAPI;(C,F) microscopia de campo claro; (D) controle negativo utilizando sooro pré imune.

Este resultado em comparação com os dados analisados em confocal para os epimastigotas sugerem entre outras coisas que o uso do anticorpo primário mais concentrado facilita a detecção da NTPDase-1, pois a marcação neste ensaio (Figura 25) foi mais evidente que no ensaio anterior (Figura 11-14, 16-18, 12 e 22) .

Uma hipótese que também pode ser levantada a partir desses resultados é que possivelmente, a via de processamento e secreção da NTPDase-1 pode estar relacionada com o reservossoma, uma organela localizada principalmente na região posterior do parasito (De Souza, Carreiro *et al.*, 2000). Dados sugerem que esta organela seja especializada no acúmulo de macromoléculas externas ingeridas, bem como, no acúmulo de proteases sintetizadas pela célula, como é o caso de uma cisteíno-protease conhecida como cruzipaina (Murta, Persechini *et al.*, 1990; Souto-Padron, Campetella *et al.*, 1990).

Uma das alternativas para inferir mais sobre a secreção da NTPDase-1 e a participação do reservossoma nesse processo, seria fazer uma dupla marcação utilizando anticorpos anti cruzipaina e anticorpos anti NTPDase-1. Em adição, o reservossoma pode ser facilmente identificado por microscopia de fluorescência como uma estrutura alaranjada quando incubado com laranja de acridina (Soares, Souto-Padron *et al.*, 1992), o que poderia também ser usado a fim de visualizar se a marcação da NTPDase-1 co-localiza com o reservossoma.

O papel das apirases dependentes de magnésio ainda é alvo de especulação. Em alguns parasitos, sua atividade enzimática de superfície é considerada um importante sinal extracelular na regulação da virulência (Ralevic e Burnstock, 1998; Silverman, Qi *et al.*, 1998; Berredo-Pinho, Peres-Sampaio *et al.*, 2001; Pinheiro, Martins-Duarte *et al.*, 2006). Em relação a *T.cruzi* pouco se sabe a respeito da via de secreção dessa enzima, ou mesmo se há outro homólogo no genoma deste parasito, mais experimentos devem ser realizados para elucidar o real papel da apirase no processo infectivo. Porém os resultados aqui apresentados se avaliados de forma conjunta sugerem realmente que existe outra isoforma de E-NTPDase menor que a NTPDase-1. Para confirmar esta suposição poderia ser realizada uma

imunoprecipitação de ambas as proteínas, com subsequente separação por SDS-PAGE e seqüenciamento de peptídios das mesmas.

Para determinar com exatidão a localização subcelular da NTPDase-1 de *T. cruzi*, sugerimos o uso de microscopia eletrônica que permitirá uma maior resolução, associada a técnicas de imunocitoquímica, podendo assim confirmar as informações obtidas por meio da microscopia confocal e de fluorescência.

6. Considerações Finais

Após uma análise detalhada dos resultados dos dados, podemos concluir que:

O Anticorpo anti NTPDase-1 purificado reconhece de maneira específica a NTPDase-1 em extrato protéico das formas epimastigota e tripomastigota.

O anticorpo Anti CD39 de humano, é capaz de reconhecer duas proteínas em extrato protéico de epimastigotas: uma destas proteínas seria a NTPDase-1 com aproximadamente 66 kDa e a outra seria uma isoforma menor com cerca de 46 kDa.

A NTPDase 1 está presente nas três formas do parasito tanto na forma infectiva tripomastigota, como na forma proliferativa intracelular, amastigota, e na forma proliferativa não infectiva epimastigota.

7. Referências Bibliográficas

- Abbracchio, M. P., J. M. Boeynaems, *et al.* Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. Trends Pharmacol Sci, v.24, n.2, Feb, p.52-5. 2003.
- 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.
- Abuin, G., W. Colli, *et al.* A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* involved in cell invasion (Tc-85) is heterogeneous in expression and molecular constitution. Mol Biochem Parasitol, v.35, n.3, Jul, p.229-37. 1989.
- Acosta-Serrano, A., I. C. Almeida, *et al.* The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. Mol Biochem Parasitol, v.114, n.2, May, p.143-50. 2001.
- Asai, T., S. Miura, *et al.* Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. J Biol Chem, v.270, n.19, May 12, p.11391-7. 1995.
- Baqui, M. M., R. Milder, *et al.* In vivo and in vitro phosphorylation and subcellular localization of trypanosomatid cytoskeletal giant proteins. Cell Motil Cytoskeleton, v.47, n.1, Sep, p.25-37. 2000.
- Barros, F. S., L. F. De Menezes, *et al.* Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in *Entamoeba histolytica*. Arch Biochem Biophys, v.375, n.2, Mar 15, p.304-14. 2000.
- Bermudes, D., K. R. Peck, *et al.* Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. J Biol Chem, v.269, n.46, Nov 18, p.29252-60. 1994.
- Berreto-Pinho, M., C. E. Peres-Sampaio, *et al.* A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. Arch Biochem Biophys, v.391, n.1, Jul 1, p.16-24. 2001.
- Bisaggio, D. F., C. E. Peres-Sampaio, *et al.* Ecto-ATPase activity on the surface of *Trypanosoma cruzi* and its possible role in the parasite-host cell interaction. Parasitol Res, v.91, n.4, Oct, p.273-82. 2003.
- 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.
- Boeynaems, J. M., F. Wilkin, *et al.* P2Y receptors: new subtypes, new functions. Drug. Dev. Rev., v.59, n.1, p.30-35. 2003.

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

_____. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. Curr Opin Microbiol, v.1, n.4, Aug, p.461-5. 1998.

Burnstock, G. e G. E. Knight. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. Int Rev Cytol, v.240, p.31-304. 2004.

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.

Carrero-Lerida, J., G. Perez-Moreno, *et al.* Intracellular location of the early steps of the isoprenoid biosynthetic pathway in the trypanosomatids *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. Int J Parasitol, v.39, n.3, Feb, p.307-14. 2009.

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.

Chandler, J. P. Purification and Characterization of Antibodies. In: G. C. Howard e K. R. Matthew (Ed.). Making and using antibodies: A practical handbook. New York: CRC Press and Taylor & Francis Group, 2007. Purification and Characterization of Antibodies, p.125

Cobea. Princípios Éticos na Experimentação Animal 1992.

Coimbra, E. S., S. C. Goncalves-Da-Costa, *et al.* Characterization and cytochemical localization of an ATP diphosphohydrolase from *Leishmania amazonensis* promastigotes. Parasitology, v.124, n.Pt 2, Feb, p.137-43. 2002.

Colli, W. Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. FASEB J, v.7, n.13, Oct, p.1257-64. 1993.

Coura, J. R., N. Anuziato, *et al.* Chagas`disease morbidity. I- Study of cases originating in various states of Brazil, observed in Rio de Janeiro. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.78, p.363-372. 1983.

de-Souza, W., T. U. De-Carvalho, *et al.* The use of confocal laser scanning microscopy to analyze the process of parasitic protozoon-host cell interaction. Braz J Med Biol Res, v.31, n.11, Nov, p.1459-70. 1998.

De Aguiar Matos, J. A., F. P. Borges, *et al.* Characterisation of an ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. Int J Parasitol, v.31, n.8, Jun, p.770-5. 2001.

De Almeida Marques-Da-Silva, E., J. C. De Oliveira, *et al.* Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. Microbes Infect, v.10, n.8, Jul, p.850-7. 2008.

- de Carvalho, T. M. e W. de Souza. Early events related with the behaviour of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. Cell Struct Funct, v.14, n.4, Aug, p.383-92. 1989.
- de Souza Leite, M., R. Thomaz, *et al.* *Trypanosoma brucei brucei*: biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. Exp Parasitol, v.115, n.4, Apr, p.315-23. 2007.
- de Souza, W. A Short Review on the Morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.94, p.17-36. 1999.
- _____. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. . Current Pharmaceutical design, v.8, p.269-285. 2002.
- _____. Electron microscopy of trypanosomes - A historical view. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.103, n.4, p.313-325. 2008.
- de Souza, W., I. P. Carreiro, *et al.* Two special organelles found in *Trypanosoma cruzi*. An Acad Bras Cienc, v.72, n.3, Sep, p.421-32. 2000.
- Demarco, R., A. T. Kowaltowski, *et al.* Molecular characterization and immunolocalization of *Schistosoma mansoni* ATP-diphosphohydrolase. Biochem Biophys Res Commun, v.307, n.4, Aug 8, p.831-8. 2003.
- Di Virgilio, F. e Purinergic mechanism in the immune system: a signal of danger for dendritic cells. Purinergic Signalling, v.1, p.205-209.. 2006.
- Di Virgilio, F., J. M. Boeynaems, *et al.* Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. Curr Opin Pharmacol, v.9, n.4, Aug, p.507-13. 2009.
- Dias, J. C., A. C. Silveira, *et al.* The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.97, n.5, Jul, p.603-12. 2002.
- Dombrowski, K. E., Y. Ke, *et al.* Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function. Immunol Rev, v.161, Feb, p.111-8. 1998.
- Dos Passos Lemos, A., A. A. De Sa Pinheiro, *et al.* Ectonucleotide diphosphohydrolase activity in *Crithidia deanei*. Parasitol Res, v.88, n.10, Oct, p.905-11. 2002.
- Dwyer, K., S. Deaglio, *et al.* CD39 and control of cellular immune responses. Purinergic Signalling, v.3, p.171-180. 2007.
- El-Sayed, N. M., P. J. Myler, *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. Science, v.309, n.5733, Jul 15, p.409-15. 2005.
- El Kouni, M. H. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. Pharmacol Ther, v.99, n.3, Sep, p.283-309. 2003.
- Enyoji, K., J. Sevigny, *et al.* Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. Nat Med, v.5, n.9, Sep, p.1010-7. 1999.

- Fietto, J. L., R. Demarco, *et al.* Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. Biochem Biophys Res Commun, v.316, n.2, Apr 2, p.454-60. 2004.
- Fredholm, B. B., E. Irenius, *et al.* Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. Biochem Pharmacol, v.61, n.4, Feb 15, p.443-8. 2001.
- Furuya, T., L. Zhong, *et al.* Ecto-protein tyrosine phosphatase activity in *Trypanosoma cruzi* infective stages. Mol Biochem Parasitol, v.92, n.2, May 1, p.339-48. 1998.
- Gendron, F. P., O. Benrezzak, *et al.* Purine signaling and potential new therapeutic approach: possible outcomes of NTPDase inhibition. Curr Drug Targets, v.3, n.3, Jun, p.229-45. 2002.
- Gomez, G. e M. V. Sitkovsky. Differential requirement for A2a and A3 adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo. Blood, v.102, n.13, Dec 15, p.4472-8. 2003.
- Gounaris, K. Nucleotidase cascades are catalyzed by secreted proteins of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. Infect Immun, v.70, n.9, Sep, p.4917-24. 2002.
- Guedes, P. M., J. A. Urbina, *et al.* Activity of the new triazole derivative albaconazole against *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in dog hosts. Antimicrob Agents Chemother, v.48, n.11, Nov, p.4286-92. 2004.
- Gull, K. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. Annu Rev Microbiol, v.53, p.629-55. 1999.
- Handa, M. e G. Guidotti. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). Biochem Biophys Res Commun, v.218, n.3, Jan 26, p.916-23. 1996.
- Hasko, G., E. A. Deitch, *et al.* Adenosine: a potential mediator of immunosuppression in multiple organ failure. Curr Opin Pharmacol, v.2, n.4, Aug, p.440-4. 2002.
- Hasko, G., M. V. Sitkovsky, *et al.* Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. Trends Pharmacol Sci, v.25, n.3, Mar, p.152-7. 2004.
- Herwaldt, B. L. Leishmaniasis. Lancet, v.354, n.9185, Oct 2, p.1191-9. 1999.
- Hyde, T. P. e J. A. Dvorak. *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. 2. Quantitative analysis of the penetration phase. Exp Parasitol, v.34, n.2, Oct, p.284-94. 1973.
- Ivanenkov, V. V., D. M. Murphy-Piedmonte, *et al.* Bacterial expression, characterization, and disulfide bond determination of soluble human NTPDase6 (CD39L2) nucleotidase: implications for structure and function. Biochemistry, v.42, n.40, Oct 14, p.11726-35. 2003.
- Jacobson, K. A., M. F. Jarvis, *et al.* Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. J Med Chem, v.45, n.19, Sep 12, p.4057-93. 2002.
- Jesus, J. B., A. H. Lopes, *et al.* Characterization of an ecto-ATPase of *Tritrichomonas foetus*. Vet Parasitol, v.103, n.1-2, Jan 3, p.29-42. 2002.

Jijon, H. B., J. Walker, *et al.* Adenosine is a negative regulator of NF-kappaB and MAPK signaling in human intestinal epithelial cells. Cell Immunol, v.237, n.2, Oct, p.86-95. 2005.

Jin, X., R. K. Shepherd, *et al.* Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. J Clin Invest, v.100, n.11, Dec 1, p.2849-57. 1997.

Khakh, B. S., G. Burnstock, *et al.* International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. Pharmacol Rev, v.53, n.1, Mar, p.107-18. 2001.

Kukulski, F., F. Ben Yebdri, *et al.* Extracellular ATP and P2 receptors are required for IL-8 to induce neutrophil migration. Cytokine, v.46, n.2, May, p.166-70. 2009.

Laliberte, J. F. e A. R. Beaudoin. Sequential hydrolysis of the gamma- and beta-phosphate groups of ATP by the ATP diphosphohydrolase from pig pancreas. Biochim Biophys Acta, v.742, n.1, Jan 12, p.9-15. 1983.

Langston, H. P., Y. Ke, *et al.* Secretion of IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. J Immunol, v.170, n.6, Mar 15, p.2962-70. 2003.

Leal, D. B. R., C. A. Strecher, *et al.* Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.15) activity in human lymphocytes. . Biochimica et Biophysica Acta, v.1721, n.1-3, p.9-15. 2005.

Lee, J. H. e D. C. Marcus. Purinergic signaling in the inner ear. Hear Res, v.235, n.1-2, Jan, p.1-7. 2008.

Ley, V., E. S. Robbins, *et al.* The exit of Trypanosoma cruzi from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. J Exp Med, v.171, n.2, Feb 1, p.401-13. 1990.

Maioli, T. U., E. Takane, *et al.* Immune response induced by New World Leishmania species in C57BL/6 mice. Parasitol Res, v.94, n.3, Oct, p.207-12. 2004.

Meirelles, M. N., L. Juliano, *et al.* Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of Trypanosoma cruzi in vitro. Mol Biochem Parasitol, v.52, n.2, Jun, p.175-84. 1992.

Meyer-Fernandes, J. R. Ecto-ATPases in protozoa parasites: looking for a function. Parasitol Int, v.51, n.3, Sep, p.299-303. 2002.

Meyer-Fernandes, J. R., P. M. Dutra, *et al.* Mg-dependent ecto-ATPase activity in Leishmania tropica. Arch Biochem Biophys, v.341, n.1, May 1, p.40-6. 1997.

Meyer-Fernandes, J. R., H. Lanz-Mendoza, *et al.* Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in hemocytes of larval Manduca sexta. Arch Biochem Biophys, v.382, n.1, Oct 1, p.152-9. 2000.

Meyer-Fernandes, J. Ecto-ATPases in protozoa parasites: looking for a function. Parasitol Int, v.51, n.3, Sep, p.299-303. 2002.

- Meyer-Fernandes, J. R., J. Saad-Nehme, *et al.* A Mg-dependent ecto-ATPase is increased in the infective stages of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Res, v.93, n.1, May, p.41-50. 2004.
- Mizumoto, N., T. Kumamoto, *et al.* CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. Nat Med, v.8, n.4, Apr, p.358-65. 2002.
- Moreno, S. N., J. Silva, *et al.* Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. J Exp Med, v.180, n.4, Oct 1, p.1535-40. 1994.
- Murphy-Piedmonte, D. M., P. A. Crawford, *et al.* Bacterial expression, folding, purification and characterization of soluble NTPDase5 (CD39L4) ecto-nucleotidase. Biochim Biophys Acta, v.1747, n.2, Mar 14, p.251-9. 2005.
- Murta, A. C., P. M. Persechini, *et al.* Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. Mol Biochem Parasitol, v.43, n.1, Nov, p.27-38. 1990.
- Nakaar, V., C. J. Beckers, *et al.* Basis for substrate specificity of the *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. Mol Biochem Parasitol, v.97, n.1-2, Nov 30, p.209-20. 1998.
- Nemeth, Z. H., C. S. Lutz, *et al.* Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism. J Immunol, v.175, n.12, Dec 15, p.8260-70. 2005.
- North, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. Physiol Rev, v.82, n.4, Oct, p.1013-67. 2002.
- Ortega-Barria, E. e M. E. Pereira. A novel *T. cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. Cell, v.67, n.2, Oct 18, p.411-21. 1991.
- Ouaissi, M. A., A. Taibi, *et al.* Characterization of major surface and excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of potential protective antigen. Parasitology, v.100 Pt 1, Feb, p.115-24. 1990.
- Pinheiro, C. M., E. S. Martins-Duarte, *et al.* *Leishmania amazonensis*: Biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. Exp Parasitol, v.114, n.1, Sep, p.16-25. 2006.
- Pizzirani, C., D. Ferrari, *et al.* Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1 β -loaded microvesicles from human dendritic cells. Blood, v.109, n.9, May 1, p.3856-64. 2007.
- Plesner, L. Ecto-ATPases: identities and functions. Int Rev Cytol, v.158, p.141-214. 1995.
- Polak, A. e R. Richle. Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative benznidazole. Ann Trop Med Parasitol, v.72, n.1, Feb, p.45-54. 1978.
- Ralevic, V. e G. Burnstock. Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacol Rev, v.50, n.3, Sep, p.413-92. 1998.

Rassi, C. Clínica: Fase aguda. In: Z. Brener e Z. Andrade (Ed.). Trypanosoma cruzi e a doença de chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1979. Clínica: Fase aguda., p.249-264

Rocha, G. M., K. Miranda, *et al.* Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* revisited by atomic force microscopy. Microsc Res Tech, v.71, n.2, Feb, p.133-9. 2008.

Sabirov, R. e Y. Okada. ATP release via anion channels. Purinergic Signalling v.1, p.311-328. 2005.

Sambrook, J. e D. W. Russel. Molecular Cloning: a laboratory manual. In: (Ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory, v.3, 2001. Molecular Cloning: a laboratory manual., p.18-49

Sansom, F. M., H. J. Newton, *et al.* A bacterial ecto-triphosphate diphosphohydrolase similar to human CD39 is essential for intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. Cell Microbiol, v.9, n.8, Aug, p.1922-35. 2007.

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

Santos, R. F., M. A. Possa, *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.

Scharfstein, J., V. Schmitz, *et al.* Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. J Exp Med, v.192, n.9, Nov 6, p.1289-300. 2000.

Schenkman, S., C. Diaz, *et al.* Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. Exp Parasitol, v.72, n.1, Jan, p.76-86. 1991.

Schenkman, S. e D. Eichinger. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. Parasitol Today, v.9, n.6, Jun, p.218-22. 1993.

Schenkman, S., D. Eichinger, *et al.* Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. Annu Rev Microbiol, v.48, p.499-523. 1994.

Schenkman, S., M. S. Jiang, *et al.* A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. Cell, v.65, n.7, Jun 28, p.1117-25. 1991.

Schenkman, S., E. S. Robbins, *et al.* Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. Infect Immun, v.59, n.2, Feb, p.645-54. 1991.

Schicker, K., S. Hussl, *et al.* A membrane network of receptors and enzymes for adenine nucleotides and nucleosides. Biochim Biophys Acta, v.1793, n.2, Feb, p.325-34. 2009.

Schmunis, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. Mem Inst Oswaldo Cruz v.102 Suppl 1, p.75–85. 2007.

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

Silva, L. I. P. N., W. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. Folia Clin Biol, v.20, p.191-208. 1953.

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

Smith, T. M., Jr., T. L. Kirley, *et al.* A soluble ecto-ATPase from *Tetrahymena thermophila*: purification and similarity to the membrane-bound ecto-ATPase of smooth muscle. Arch Biochem Biophys, v.337, n.2, Jan 15, p.351-9. 1997.

Smith, T. M. e T. L. Kirley. 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, v.38, n.1, Jan 5, p.321-8. 1999.

Soares, M. J., T. Souto-Padron, *et al.* Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. J Cell Sci, v.102 (Pt 1), May, p.157-67. 1992.

Somers, G. R., F. M. Hammet, *et al.* Expression of the P2Y6 purinergic receptor in human T cells infiltrating inflammatory bowel disease. Lab Invest, v.78, n.11, Nov, p.1375-83. 1998.

Souto-Padron, T., O. E. Campetella, *et al.* Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. J Cell Sci, v.96 (Pt 3), Jul, p.485-90. 1990.

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

Vieira, M. C., T. U. De Carvalho, *et al.* Effect of protein kinase inhibitors on the invasion process of macrophages by *Trypanosoma cruzi*. Biochem Biophys Res Commun, v.203, n.2, Sep 15, p.967-71. 1994.

Von Kugelgen, I. e A. Wetter. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, v.362, n.4-5, Nov, p.310-23. 2000.

Warny, M., S. Aboudola, *et al.* P2Y(6) nucleotide receptor mediates monocyte interleukin-8 production in response to UDP or lipopolysaccharide. J Biol Chem, v.276, n.28, Jul 13, p.26051-6. 2001.

Who. World Health Organization Tropical Disease Research: progress 2003-2004 Se Trainventeenth Programme Report of the UNICEF/UNDP/Word Bank/WHO. . Special Programme for Reserch & Training in Tropical Diseases. P. R. N. 17. Geneva 2005.

Yegutkin, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. Biochim Biophys Acta, v.1783, n.5, May, p.673-94. 2008.

Yoshida, N., S. A. Blanco, *et al.* The stage-specific 90-kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol, v.39, n.1, Feb, p.39-46. 1990.

Yoshida, N., S. Favoreto, Jr., *et al.* Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. Braz J Med Biol Res, v.33, n.3, Mar, p.269-78. 2000.

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

_____. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. Drug Dev, v.52, p.44-56. 2001.

Zimmermann, H. e N. Braun. Extracellular metabolism of nucleotides in the nervous system. J Auton Pharmacol, v.16, n.6, Dec, p.397-400. 1996.