

MELLINA LANNA TRINDADE

**NTPDase-1 DE *Trypanosoma cruzi*: IMUNOLOCALIZAÇÃO E ESTUDO DE
SEU PAPEL NAS ETAPAS INICIAIS DA INFECÇÃO CELULAR POR
FORMAS EPIMASTIGOTAS**

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
2012

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

T	Trindade, Mellina Lanna, 1984-
T833n 2012	NTPDase-1 de <i>Trypanosoma cruzi</i> : imunolocalização e estudo de seu papel nas etapas iniciais da infecção celular por formas epimastigotas / Mellina Lanna Trindade. – Viçosa, MG, 2012. x, 73f. : il. ; (algumas color.) ; 29cm. Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. Referências bibliográficas: f. 57-73. 1. <i>Trypanosoma cruzi</i>. 2. Microscopia. 3. Protozoário. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título. CDD 22. ed. 572.7

MELLINA LANNA TRINDADE

**NTPDase-1 DE *Trypanosoma cruzi*: IMUNOLocalização E ESTUDO DE
SEU PAPEL NAS ETAPAS INICIAIS DA INFECÇÃO CELULAR POR
FORMAS EPIMASTIGOTAS**

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: 09 de Novembro de 2012.

Prof. Eduardo de A. Marques da Silva

Prof. Gustavo Costa Bressan

Profa. Juliana Lopes Rangel Fietto

(Orientadora)

**“The important thing is not to stop questioning, curiosity has its own reason
for existing.”
Albert Einstein**

**Dedico esta conquista à minha família, em especial aos meus pais e irmãos e
ao Jardel, pela permanente ajuda, companheirismo e torcida!**

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À Deus, pela força e motivação diária!

Aos meus pais, grandes amigos, que muito me apoiaram e incentivaram para conclusão desta etapa.

Aos meus irmãos, Talline e Luiz Fellipe.

Ao companheiro de todas as horas e grande incentivador, Jardel.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Biologia Celular e Estrutural, em especial a secretária Beth.

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

À Juliana L. R. Fietto, pela disponibilidade em orientar e ensinar, e pela competência e conhecimento científico.

Ao professor Leandro Licursi de Oliveira, pela atenção e solicitude.

Aos professores Márcia Rogéria Almeida, Gustavo Bressan e Abelardo Silva Júnior, grandes colaboradores.

Aos professores do Programa de pós graduação, pelo enriquecimento científico acumulado durante o desenvolvimento das disciplinas.

Ao Felipe, maior parceiro e entusiasta deste trabalho.

Ao Ramon e Matheus, pelo aprendizado e paciência.

À Chris e Raphael, pelo companheirismo.

À Myrian, pela amizade e companhia nos experimentos.

À Izadora, por ser prestativa durante toda a execução deste projeto.

Ao professor Serrão, e as pós- doc Claudinha e a Madu, pela ajuda nas microscopias.

Ao senhor Valdir, por deixar nosso ambiente de trabalho mais organizado.

Aos amigos do LIMA, pelo acolhimento, amizade, diversão e colaboração.

Aos laboratórios de Biologia e Controle de Hematozoários - LBCH, em especial ao Marcinho e ao Laboratório de Immunovirologia - LIMV, especialmente Samara, Thaís e Lorena, pelos inúmeros empréstimos de reagentes, uso de equipamentos e amizade.

À Sabrina, Samara e Camila, pelo apoio psicológico e amizade.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram neste projeto, o meu Muito Obrigada!!!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 <i>T. cruzi</i> e a Doença de Chagas	3
2.2 Formas e ciclo evolutivo do parasito.....	5
2.3 Organização estrutural do <i>T. cruzi</i>	8
2.4 Processo de infecção por <i>T. cruzi</i> em células de mamífero	11
2.5 Nucleotídeos extra-celulares e purinoreceptores.....	13
2.6 As ecto-nucleotidases e a família E-NTPDase	18
2.7 NTPDase-1 de <i>T. cruzi</i>	21
2.8 Metabolismo de purinas e papel das apirases em endoparasitas	22
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo Geral	26
3.2 Objetivos Específicos.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Parasito.....	27
4.2 Meio Grace	27
4.3 Cultivo do parasito	27
4.4 Curva de crescimento	28
4.5 Células VERO.....	28
4.6 Meio RPMI.....	28
4.7 Cultivo de células VERO	29
4.8 Obtenção da NTPDase-1 recombinante.....	29
4.9 Determinação da Concentração da Proteína.....	30
4.10 Análises em SDS-PAGE	30
4.11 Produção do antisoro policlonal anti-NTPDase-1 de <i>T. cruzi</i>	30
4.12 Produção da resina de afinidade acoplada a NTPDase-1	31
4.13 Purificação dos anticorpos IgG anti-NTPDase1 de <i>T. cruzi</i>	32
4.14 Avaliação da especificidade dos anticorpos purificados	32
4.15 Ensaios de adesão na presença da proteína recombinante NTPDase 1 de <i>T. cruzi</i>	33
4.16 Ensaios de adesão com o anticorpo anti- NTPDase 1 de <i>T. cruzi</i>	34

4.17 Expressão da proteína NTPDase 1 de acordo com a curva de crescimento do parasito	34
4.18 Microscopia confocal	35
4.19 Análise por microscopia eletrônica	36
4.20 Fixação e coloração pelo método de Giemsa	37
4.21 Análise estatística dos dados.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Determinação da fase log do crescimento de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> ..	38
5.2 Padronização da melhor concentração de células VERO para os ensaios de adesão e infecção.....	39
5.3 Obtenção da NTPDase-1 recombinante purificada.....	41
5.4 Determinação do título dos anticorpos anti- NTPDase 1 de <i>T. cruzi</i> purificados	42
5.5 Avaliação do índice de adesão na presença da proteína recombinante NTPDase 1 de <i>T. cruzi</i>	44
5.6 Avaliação do índice de adesão na presença do anticorpo anti-NTPDase 1 de <i>T. cruzi</i>	47
5.7 Expressão da proteína NTPDase 1 de acordo com a curva de crescimento do parasito	48
5.8 Imunolocalização da NTPDase 1 em epimastigotas por microscopia confocal	51
5.9 Imunolocalização da NTPDase 1 em epimastigotas por Microscopia Eletrônica	53
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

Ado - Adenosina
ADPe - ADP extracelular
AMP - Adenosina 5' -monofosfato
ATP - Adenosina 5' -trifosfato
ATPe - ATP extracelular
BNZ - Benzonidazol
BSA - Soroalbumina bovina
DNA - Ácido desoxirribonucleico
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
E-NPP - ecto-nucleotideo pirofosfatase/fosfosdiesterase
E-NTPDase - ecto-nucleosideo trifosfato difosfohidrolase
GDP - Guanosina 5' - difosfato
GTP - Guanosina 5' - trifosfato
gp - Glicoproteína
IgG - Imunoglobulina G
IP3 - Fosfatidil inositol 1,4,5-trifosfato
IPTG - Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
kDa - Quilo Dáton
LIT - Liver infusion and tryptose
LPS - Lipopolissacarídeo
NF - Nifurtimox
Pi - Fosfato inorgânico
pH - Potencial hidrogeniônico
SDS - Duodecil sulfato de sódio
SDS PAGE- Eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio
SFB - Soro fetal bovino
SMF - Sistema mononuclear fagocitário
UDP – Uracila 5' – difosfato
UTP – Uracila 5' – trifosfato

RESUMO

TRINDADE, Mellina Lanna, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa. Novembro de 2012. **NTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi*: imunolocalização e estudo de seu papel nas etapas iniciais da infecção celular por formas epimastigotas.** Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto. Coorientadora: Cláudia Vânia Miranda de Oliveira.

A doença de Chagas, também conhecida como a tripanossomíase americana, é uma enfermidade tropical causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, sendo encontrada principalmente na América Latina e acometendo atualmente cerca de 10 milhões de pessoas no mundo. Esta doença é transmitida aos seres humanos e a mais de 150 espécies de mamíferos domésticos e selvagens pelas fezes de triatomíneos infectados durante o repasto sanguíneo. A NTPDase-1 é uma ecto-nucleotidase caracterizada na cepa Y do *T. cruzi* como uma proteína presente na superfície do parasito, sendo um importante fator de virulência, infectividade e considerada um bom alvo para bloqueio da infecção. Esta enzima catalisa a hidrólise de nucleotídeos de adenosina tri e di-fosfatados, sendo provavelmente capaz de modular a sinalização purinérgica em mamíferos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel da NTPDase-1 na adesão celular do parasito em célula de mamífero através de ensaios de bloqueio com anticorpo específico e competição com a proteína recombinante, além de verificar a localização da NTPDase-1 em epimastigotas por microscopia de fluorescência confocal e microscopia eletrônica. Os resultados indicam uma redução significativa na taxa de adesão de epimastigotas em células VERO, alcançando até 85% de inibição nos ensaios de competição com a proteína NTPDase 1 recombinante e até 61% de inibição na presença de anticorpos anti- NTPDase 1 purificado, comparados ao controle composto somente de células VERO e epimastigotas de *T. cruzi*. As imagens obtidas por microscopia confocal e imunoeletrônica revelam a expressão da proteína na superfície do parasito e próxima a base do flagelo. A descoberta de moléculas envolvidas com o processo de infecção presentes nas interações parasito-hospedeiro e o conhecimento da função destas biomoléculas pode ser um bom alvo para a quimioterapia.

ABSTRACT

TRINDADE, Mellina Lanna, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa. November, 2012. **NTPDASE-1 of *Trypanosoma cruzi*: immunolocalization and study of its role in the initial stages of cellular infection by epimastigotes.** Adviser: Juliana Lopes Rangel Fietto. Co-adviser: Cláudia Vânia Miranda de Oliveira.

Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, is a tropical disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* that is found mainly in Latin America and currently affects roughly 10 million people worldwide. This disease is transmitted to humans and over 150 species of domestic and wild mammals through the feces of triatomas infected while feeding on blood. NTPDase1 is an ectonucleotidase characterized in the Y strain of *T. cruzi* as a protein present on the surface of the parasite, is an important factor in virulence and infectivity and is considered a good candidate for blocking the infection. This enzyme catalyzes the hydrolysis of adenosine tri- and diphosphates and is probably capable of modulating purinergic signaling in mammals. The objective of this work was to evaluate the role of NTPDase1 in cellular adhesion of the parasite on mammal cells through blockage assays with specific antibodies and competition with the recombinant protein, in addition to verification of the localization of the NTPDase1 in the epimastigotes using fluorescent confocal microscopy and electron microscopy. The results indicate a significant reduction in the epimastigote adhesion on Vero cells, reaching an inhibition rate of up to 85% in competition tests with the recombinant NTPDase1 protein and up to 61% inhibition rates in the presence of purified NTPDase1 antibodies, compared with the control group composed solely of Vero cells and *T. cruzi* epimastigotes. The images obtained using confocal and immunoelectron microscopy reveal the expression of the protein on the surface of the parasite and near the base of the flagellum. The discovery of the presence of molecules involved in the infection process in the parasite-host interactions and knowledge of the function of these biomolecules may lead to a good target for chemotherapy.

1. INTRODUÇÃO

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da Doença de Chagas, uma enfermidade tropical predominantemente encontrada em 18 países da América Latina, acometendo atualmente cerca de 10 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2012).

Essa doença pode ser transmitida ao homem e a mais de 150 espécies de mamíferos domésticos e selvagens. De forma simples pode-se definir duas fases da doença, a fase aguda e a fase crônica. Ambas podem apresentar-se de forma sintomática ou assintomática dependendo dentre outros fatores, do estado imunológico do hospedeiro. Na fase aguda se encontra grande quantidade de parasitos no sangue em contraste com a fase crônica onde há baixa parasitemia.

As primeiras drogas usadas em humanos foram o Nifurtimox (NF) e o Benzonidazol (BNZ). O NF atua produzindo radicais livres e o BNZ inibe a síntese de macromoléculas, mas ambos produzem reações adversas especialmente em adultos (Werner et al, 2011). Após os anos 80, a comercialização do NF foi interrompida no Brasil, Argentina, Chile e Uruguai. Na atualidade, não existe um tratamento eficiente e sem efeitos colaterais (Werner et al, 2011). Portanto, o desenvolvimento de drogas mais eficientes é extremamente necessário.

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, (Tyler et al, 2001). Três formas de desenvolvimento foram classificadas em função da sua morfologia e biologia (Brener, 1972): epimastigota, forma replicativa, presente no intestino médio do vetor; tripomastigota, forma infectante do parasito encontrada no hospedeiro vertebrado; e amastigota, a forma intracelular replicativa no hospedeiro mamífero (Tanowitz et al, 1992).

A família das E-NTPDases (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases) inclui enzimas que hidrolisam uma variedade de nucleotídeos di- e trifosfatados em seus respectivos monofosfonucleosídeos e fosfato inorgânico (Bigonnesse et al, 2004).

Esta família de enzima é o objeto de nosso estudo, pelo seu possível papel em funções celulares parasito-hospedeiro (Bisaggio et al., 2003), e têm sido apontada como fator de virulência de patógenos (Sansom et al., 2008). Nosso grupo também corroborou com esta afirmação, demonstrado uma diminuição significativa da

infectividade em cultura de células e da virulência em camundongos de parasitos tratados com inibidores parciais da atividade ecto-ATP e ADPásicas ou pela ação de antisoro policlonal anti-NTPDase-1 recombinante de *T. cruzi* (Santos, 2009). Santos (2009) demonstrou que o antisoro anti-NTPDase-1 foi capaz de inibir a infecção de forma significativa mas não teve inibição da atividade da enzima recombinante, sugerindo um papel duplo da NTPDase-1 na infecção, sendo um dependente de atividade enzimática e outro independente da mesma.

Portanto, neste trabalho estudamos a participação da NTPDase-1 na adesão de epimastigotas em células VERO e procuramos avançar os conhecimentos sobre a localização desta proteína nos parasitos usando anticorpo específico anti-NTPDase-1.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *T. cruzi* e a Doença de Chagas

Trypanosoma cruzi é um protozoário pertencente ao Reino Protista, Filo Sarcomastigophora, Classe Zoomastigophora, Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, Gênero Trypanosoma.

Em 1909, Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, um cientista brasileiro, descobriu e descreveu o parasito como o agente causador da tripanossomíase americana, conhecida como doença de Chagas.

A doença de Chagas foi inicialmente caracterizada como uma zoonose estritamente selvagem, tornando-se antroponose quando o homem invadiu as florestas de forma predatória dispersando os animais selvagens e construindo casas e alpendres de fácil adaptação a seus vetores, os triatomíneos.

Atualmente, é uma enfermidade tropical predominantemente encontrada na América Latina, acometendo cerca de 10 milhões de pessoas no mundo (Who, 2012), e pode ser transmitida ao homem e a mais de 150 espécies de mamíferos domésticos e selvagens, situando em duas zonas ecológicas: cone sul da América do Sul onde os insetos vetores vivem dentro das moradias humanas (ciclo doméstico); e norte da América do Sul, América Central e México, onde os insetos vivem tanto dentro quanto fora dos domicílios (ciclos doméstico e silvestre).

Podem-se definir duas fases da doença: a fase aguda, e a fase crônica. Ambas podem apresentar-se de forma sintomática ou assintomática dependendo de fatores inerentes ao parasito e ao hospedeiro vertebrado. Os fatores relacionados ao parasito associam-se diretamente ao tropismo, variabilidade e virulência da cepa, carga do inóculo e antigenicidade (Higuchi, 1995; Dias, 2000). Em relação ao hospedeiro vertebrado, fatores como idade, sexo, reinfecções, estado nutricional e perfil da resposta imune parecem modular diferenças nas manifestações clínicas (Higuchi, 1995; Dias, 2000). A fase aguda caracteriza-se 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. Essa fase tem duração média de dois meses, evoluindo então para a fase crônica que persistirá por toda a vida do paciente (Miles e cols., 2003).

Na fase crônica o parasitismo é muito baixo, sendo difícil à comprovação parasitológica e sorológica da doença. Esta fase pode se apresentar assintomática (forma indeterminada) ou sintomática (formas cardíaca, digestiva e nervosa).

Na transmissão natural, as formas infectantes (tripomastigotas metacíclicas) são liberadas nas excretas dos insetos vetores durante o repasto sanguíneo. Para que ocorra a infecção são necessárias condições de contato entre o homem e o triatomíneo infectado, além de uma série de variáveis que regulam as chances de infecção, tais como a taxa de infecção, intervalo de tempo entre a picada e a defecação, o número e o volume de evacuação por unidade de tempo, o número de parasitos eliminados, a porcentagem de formas infectantes e sua capacidade de penetração, a intensidade de pruridos causados durante a picada, a reinfecção, o tipo de cepa ou clones do parasito, receptores clonais histotrópicos específicos do hospedeiro e ainda resposta imune inicial e posterior do indivíduo (Coura, 2007). Quanto à transmissão congênita, o parasito pode ser transmitido da mãe para uma, alguma ou todas as gestações, podendo também infectar os filhos durante o parto (Freilij & Altchek, 1995). A transmissão oral também pode ocorrer como resultado da ingestão do parasito. Exemplos desta infecção ocorreram em 2005 no sul de Santa Catarina devido ao esmagamento de triatomíneos infectados, juntamente com a cana de açúcar durante o preparo do suco. Outras maneiras de se transmitir os parasitos são por intermédio de transfusão sanguínea, acidentes de laboratório e transplantes. Outra via teoricamente possível, mas extremamente rara, é a transmissão sexual (Carlier, 2003).

Numa visão epidemiológica, a doença de Chagas é controlada, atualmente, pela eliminação de vetores com inseticidas, pela melhoria das moradias impedindo a colonização pelos insetos vetores, pelo controle de bancos de sangue e campanhas educacionais, visto que está relacionada com a pobreza e baixo nível educacional (Maya e cols., 2007).

O tratamento da doença de Chagas iniciou em 1930 com o uso de um derivado da quinolona - 7602, Bayer. No final dos anos 60 e início dos anos 70, dois fármacos começaram a ser utilizados, o NF, um 5- nitrofurano(3-metil-N-[(5-nitro-2-furanil)-metileno]-4-tiomorfolinamina-1,1-dioxida); Bayer 2502 (Bock & Gonnert, 1972) e o BZ (N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida) (Polak & Richle, 1978).

O modo de ação do NF envolve a geração de radicais livres (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e metabólitos eletrofílicos) que, na presença de oxigênio, produzem intermediários reativos (Werner et al, 2011). Sendo *T. cruzi* parcialmente deficiente na eliminação desses radicais livres, este se torna susceptível a esses intermediários (DoCampo & Moreno, 1986).

O BNZ passou a ser utilizado clinicamente em humanos em 1978. Esta droga inibe a síntese protéica, originando degradação na biossíntese de macromoléculas (Werner et al, 2011).

Na fase aguda da doença, o tratamento com NF e BZ obtêm cerca de 70 a 75% de cura, aumentado para 100% nos casos congênitos (Werner et al, 2011). Na fase crônica, a porcentagem de cura alcança apenas 30%, sendo um dos problemas enfrentados neste fase as diferenças regionais de susceptibilidade dos parasitos a droga, além dos vários efeitos colaterais desagradáveis que limitam seu uso na terapêutica (Guedes, Urbina et al. 2004).

Os efeitos colaterais mais frequentes com o tratamento com o NF são anorexia, perda de peso, alterações psíquicas, excitabilidade, sonolência e manifestações digestivas, como náuseas, vômitos e ocasionalmente, cólicas intestinais e diarreias. As reações adversas com o BZ podem ser de quatro tipos: sintomas de hipersensibilidade, linfadenopatia, dor articular e muscular; dermatites com erupções cutâneas (usualmente aparecendo entre o 7º e o 10º dia de tratamento); depressão da medula óssea, trombocitopenia e granulocitose; e polineuropatia, parestesia e polineurite dos nervos periféricos (Coura & de Castro, 2002).

Após os anos 80, a comercialização do NF foi interrompida, primeiramente no Brasil e subsequentemente na Argentina, Chile e Uruguai (Coura & de Castro, 2002).

Na atualidade, não existe um tratamento eficiente e sem efeitos colaterais (Werner et al, 2011). Portanto, o desenvolvimento de drogas mais eficientes é extremamente necessário.

2.2 Formas e ciclo evolutivo do parasito

T. cruzi se apresenta em três formas fundamentais caracterizadas pelas posições relativas do flagelo, cinetoplasto e núcleo: As tripomastigotas apresentam

cerca de 20 μm de comprimento, são fusiformes, com cinetoplasto subterminal e constituem a forma infectiva, sendo encontrados no sangue de mamíferos e na porção terminal do intestino de insetos triatomíneos. Esta forma do parasito não é multiplicativa. As epimastigotas são células fusiformes, com cerca de 20 μm de comprimento e cinetoplasto anterior ao núcleo. São a forma replicativa no parasito presente no intestino do triatomíneo. As amastigotas são formas arredondadas, possuindo aproximadamente 2 μm de diâmetro, não apresentam um flagelo emergente e se multiplicam por fissão binária no interior de células hospedeiras de mamíferos.

Estas formas evolutivas estão representadas na figura 1.

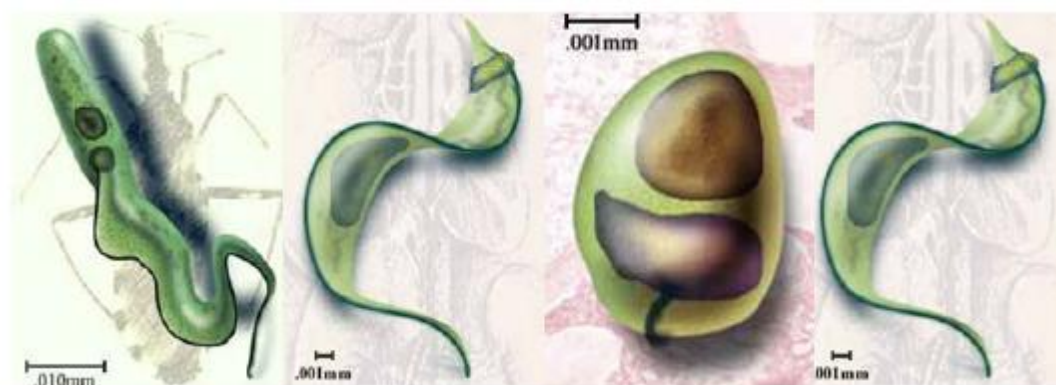


Figura 01. Formas morfológicas do *T. cruzi* (desenho didático). Da esquerda para a direita, temos a forma epimastigota, tripomastigota metacíclico, amastigota e tripomastigota sanguíneo. Fonte: <http://www.uta.edu/chagas/html/chagBiol.html>

O ciclo de vida do parasito é extremamente complexo, apresentando diversas variações morfológicas que se alternam entre dois tipos de hospedeiro: insetos da família Reduviidae, subfamília Triatominae e mamíferos (incluindo o homem).

A contaminação do barbeiro, inseto hematófago, ocorre quando este realiza repasto sanguíneo em mamífero infectado e ingere formas tripomastigotas sanguíneas, que são conduzidas à porção anterior do estômago. Neste novo ambiente, as tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas e em algumas formas esferomastigotas. No intestino, as epimastigotas se multiplicam sucessivamente por divisão binária (Zeledon, 1999; Kolien e Schaub, 2000; Garcia e Azambuja, 1999) e aderem-se às células epiteliais por hemidesmossomos. Esta adesão ocorre predominantemente pela região do flagelo. Posteriormente, os epimastigotas se soltam e movem – se para o intestino posterior, onde iniciam o processo de diferenciação em tripomastigotas metacíclicos, que aderem à cutícula que reveste o

epitélio do reto e do saco retal do inseto. Ao se soltarem do epitélio, podem ser eliminados na urina ou fezes do inseto em seu próximo repasto sanguíneo (Zeledon, 1999; Kolien & Schaub, 2000; Garcia & Azambuja, 1999).

A contaminação de um hospedeiro vertebrado ocorre quando o barbeiro infectado pica o mamífero. Neste processo, o inseto geralmente defeca e urina, depositando assim, sobre a pele ou mucosa do mamífero a forma tripomastigota metacíclica, que é a forma infectante e não replicativa. A invasão do parasito ocorre quando o hospedeiro se coça, gerando lesões na pele por onde o parasito penetra. Inicialmente, os tripomastigotas metacíclicos invadem as células do sistema mononuclear fagocitário, seguindo-se a formação do vacúolo parasitóforo. No interior do vacúolo, a forma tripomastigota se diferencia para a forma amastigota e ocorre a lise da membrana do vacúolo parasitóforo. No citoplasma, esta forma se multiplica por fissões binárias sucessivas, podendo tomar todo o citoplasma. Após as sucessivas divisões, as amastigotas iniciam sua diferenciação para tripomastigotas antes da célula hospedeira ser rompida por excesso de parasitos. No meio extracelular, os tripomastigotas e amastigotas podem infectar novas células nucleadas ali presentes (Prata, 2001) ou serem ingeridas pelos insetos vetores durante um novo repasto sanguíneo, iniciando um novo ciclo (figura 2).

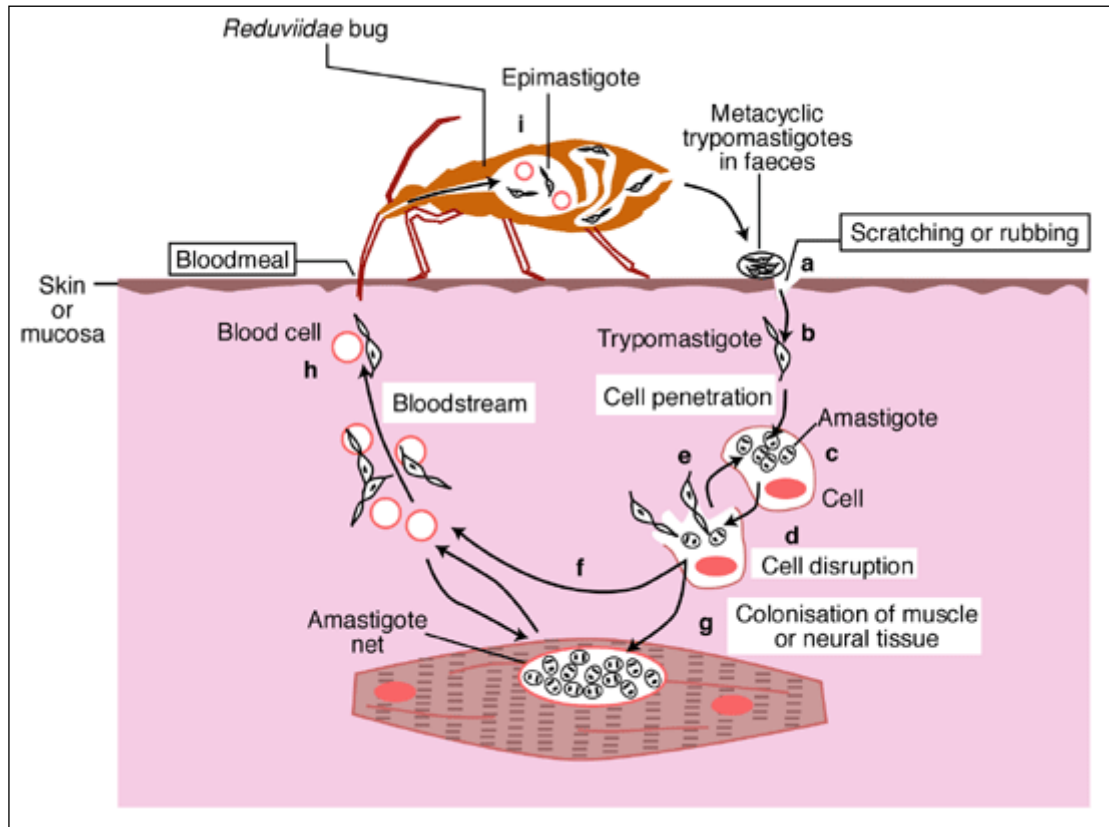


Figura 02. Ciclo de vida do *T. cruzi*. Os desenhos representam formas morfológicas vistas nos hospedeiros vertebrados e invertebrados. a) Lesão; b) Formas tripomastigotas; c) Formas amastigotas no interior da célula; d) Ruptura celular; e) Liberação dos tripomastigotas; f) Formas tripomastigotas sanguíneas; g) Colonização do tecido muscular ou tecido nervoso pelas formas infectantes tripomastigotas e amastigotas h) Tripomastigotas sugados pelo inseto; i) Formas epimastigotas no trato digestivo do inseto (Prata, 2001).

2.3 Organização estrutural do *T. cruzi*

T. cruzi é um parasito eucarioto unicelular e possui muitas organelas comuns aos eucariotos, além de algumas peculiares da família Trypanosomatidae (Figura 03).

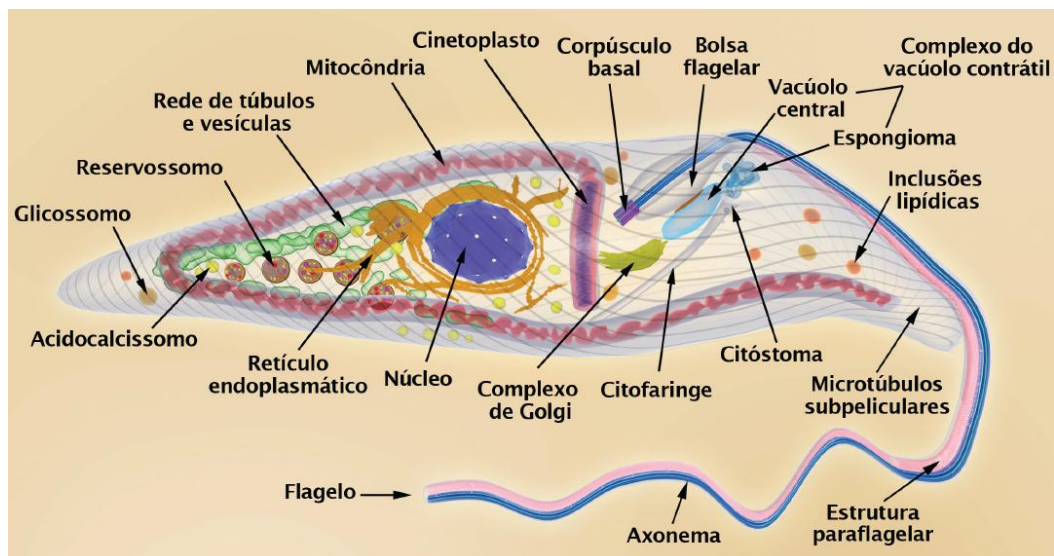


Figura 03. Esquema geral da forma epimastigota do *T. cruzi* mostrando as principais estruturas celulares (Teixeira et al, 2011).

O núcleo deste parasito mede cerca de 2,5 μM de diâmetro, apresentando-se sob a forma arredondada em epimastigotas e amastigotas e sob a forma alongada em tripomastigotas. Ele possui um nucléolo centralizado e poros nucleares em continuidade com o retículo endoplasmático (De Souza, 2002).

Os retículos endoplasmáticos liso e rugoso podem ser vistos em toda a extensão do parasito, para todas as formas de desenvolvimento, sendo responsável pela síntese protéica e lipídica (Teixeira et al, 2011).

O complexo de Golgi, envolvido no processo de modificação de proteínas, está localizado próximo à bolsa flagelar. Em epimastigotas e amastigotas, também se encontra perto do citóstoma, uma profunda invaginação da membrana plasmática envolvida na captação de macromoléculas do meio, formando o complexo citóstoma- citofaringe, responsável pelo processo de endocitose. As macromoléculas ao penetrarem na abertura do citóstoma, seguem pela citofaringe onde são internalizadas em vesículas endocíticas que irão se fundir com uma rede de túbulos e vesículas e, posteriormente, se fundir com os reservossomos (De Souza et al., 2009).

A forma epimastigota de *T. cruzi* é capaz de ingerir macromoléculas do meio por via endocítica. Tal atividade é inexistente, ou muito baixa, nas formas amastigota e tripomastigota (De Souza et al, 2009). Todas as macromoléculas ingeridas pela célula, independentemente da sua natureza, se concentram na organela, chamada reservossomo. Nela também encontramos proteases sintetizadas pela célula, como

é o caso de uma cisteína proteinase conhecida como cruzipaina. O pH do interior do reservossomo é de cerca de 6,0, o que o faz se comportar como um compartimento pré-lisossomal. As formas tripomastigotas e amastigotas, apesar de não possuírem um reservossomo típico, possuem organelas relacionadas a lisossomos, denominadas “reservossomos-like” (De Souza et al, 2009).

A única mitocôndria desses parasitos, se ramifica por todo o corpo e apresenta um DNA mitocondrial que se organiza na forma de minicírculos e maxicírculos se associando de forma concatenada e se concentrando numa região da mitocôndria, abaixo do corpúsculo basal, denominada cinetoplasto (Teixeira et al, 2011).

O cinetoplasto é uma estrutura altamente organizada com uma alta concentração de DNA, característica de protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida. Ele pode variar de acordo com o estágio de desenvolvimento do parasito, apresentando-se sob a forma de bastão levemente curvado em amastigotas e epimastigotas e arredondado em tripomastigotas (Teixeira et al, 2011).

Todos os tripanossomatídeos apresentam um flagelo que emergem de uma invaginação da membrana plasmática, conhecida como bolsa flagelar. Esta bolsa é um importante sítio de endocitose e exocitose principalmente em tripomastigotas e amastigotas, pois em epimastigotas, o principal sítio de endocitose é o citóstoma (De Souza et al., 2009). O flagelo encontra-se intimamente associado ao corpúsculo basal. Este apresenta caracteristicamente nove triplete de microtúbulos. Já o flagelo é formado por um axonema, com nove pares de microtúbulos e um par central, envoltos pela membrana flagelar e responsáveis pela motilidade do parasito (Teixeira et al, 2011).

O corpo paraxial ou estrutura paraflagelar possui função ainda desconhecida, podendo atuar na motilidade e na adesão ao epitélio intestinal de insetos. Ela é formada por um complexo de filamentos protéicos que se associam ao axonema de epimastigotas e tripomastigotas (Teixeira et al, 2011).

Os microtúbulos subpeliculares, localizam-se abaixo da membrana plasmática e estão distribuídos por todo o corpo do parasito, sendo o principal componente do citoesqueleto (Teixeira et al, 2011).

O complexo do vacúolo contrátil é uma organela importante para o controle osmótico, formado por um conjunto de túbulos e vesículas localizados próximo à bolsa flagelar (Teixeira et al, 2011).

Os acidocalcissomos são organelas ácidas distribuídas por toda a célula, ricas em cálcio, polifosfato e outros íons. Eles possuem canais, bombas e trocadores iônicos, sendo responsáveis pela manutenção da homeostasia intracelular e pH, pela osmorregulação e pelo armazenamento de cátions e fósforo (Teixeira et al, 2011).

Os glicossomos são um tipo especial de peroxissomo. eles são designados assim por armazenarem no seu interior enzimas da via glicolítica (De Souza, 2002; Parsons, 2004). Eles possuem matriz homogênea densa, distribuídas por todo o corpo do parasito.

As inclusões lipídicas são estruturas arredondadas de diâmetro variável envoltas por uma monocamada de fosfolipídeos, podendo ser elétronalucientes ou com densidade média (Soares e Souza, 1987).

2.4 Processo de infecção por *T. cruzi* em células de mamífero

Em hospedeiros vertebrados, o processo de invasão das células pelo *T. cruzi*, se divide em três fases: adsorção do parasito à membrana plasmática da célula hospedeira, internalização com formação do vacúolo parasitóforo, e a ruptura da membrana vacuolar, na qual o parasito é liberado no citoplasma e onde se diferencia em amastigotas e se replica (de Souza, 2002).

Após a fixação na membrana celular do hospedeiro, sinais são desencadeados pelo parasito dando início ao gradual processo de entrada na membrana vacuolar que é realizada em cerca de 10 minutos (Rodriguez e cols., 1996), dependendo da cepa. Após a diferenciação para amastigotas, ocorre a proliferação destas por divisão binária, ao longo de 2-9 ciclos, preenchendo completamente o citoplasma das células hospedeiras em 4-5 dias. A diferenciação das formas amastigotas em tripomastigotas ocorre anteriormente à ruptura celular e liberação dos parasitos para um novo ciclo infeccioso. O parasito demora cerca de 30 minutos desde a invasão até a saída do vacúolo parasitóforo (Burleigh & Andrews 1995), 2-3 horas para se transformar em amastigotas, e entrar na fase G1/G2 do ciclo celular, levando de 24-

44 horas 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 minutos (Hyde & Dvorak 1973), considerando condições naturais de infecção.

Em todos os tipos de células estudadas foi observada a mesma distribuição binomial negativa de células-infectadas (Hyde & Dvorak 1973, Pécora et al. 1980), indicando que, durante as primeiras 24 horas de contato do parasito com as células, as que já estão infectados são mais suscetíveis a uma segunda invasão, provavelmente porque a superfície celular sofre mudanças após a infecção (Soeiro et al. 1994).

A aderência do parasito é um processo dependente de energia e requer a presença de moléculas específicas na superfície celular (Schenkman et al. 1991a, 1991b, 1991c). A internalização, além de ser um processo dependente de energia, necessita da presença de glicoproteínas específicas (Abuin et al. 1989; Ouaisi et al. 1990; Yoshida et al. 1990; Ortega-Barria et al, 1991), mucinas (Acosta-Serrano et al, 2001), atividades de proteínas quinases (Vieira et al. 1994; Yoshida et al. 2000) e o aumento da concentração de cálcio tanto no parasito quanto na célula hospedeira (Moreno et al. 1994; Burleigh et al 1998).

Somente as formas tripomastigotas, e amastigotas em menor proporção (Ley e cols., 1990; Carvalho & de Souza, 1986), são capazes de serem internalizadas por células de mamífero e portanto infectantes para o hospedeiro vertebrado devido a suas propriedades antigênicas. As formas epimastigotas do parasito são incapazes de infectar as células do hospedeiro vertebrado (Burleigh & Woolsey, 2002; Yoshida, 2005).

A sinalização para invasão pode ocorrer de diferentes maneiras, seja pela indução da cascata de sinalização de Ca^{2+} dependente de fosfatidilinositol-3-P (IP3), recrutamento e fusão de lisossomos na região plasmática onde ocorreu a invasão, levando a formação de um vacúolo com propriedades lisossomais (Andrade & Andrews, 2004), ou pelo recrutamento e fusão de lisossomos mediados pela ativação da fosfatidilinositol-3 cinase (Woolsey e cols., 2003).

A internalização também depende de enzimas cujos sítios ativos estão localizados tanto na face externa da membrana plasmática quanto no citoplasma

(Souto-Padro'n et al. 1990; Meirelles et al. 1992; Colli 1993; Schenkman et al, 1993; Schenkman et al. 1994; Scharfstein et al. 2000). Uma enzima que recentemente foi sugerida como moduladora da infecciosidade de *T. cruzi* é a NTPDase-1, proteína pertencente à super-família das ecto-nucleotidases e à sub-família das E-NTPDases, capazes de hidrolisar nucleotídeos extracelulares.

2.5 Nucleotídeos extra-celulares e purinoreceptores

Até os dias atuais, muito se estudou sobre a variedade de funções biológicas dos nucleotídeos, sendo os mais estudados o ATP, o UTP e seus metabólitos (ADP, UDP e adenosina).

Até a década de 70 pensava-se que estes eram artefatos gerados em processos de danificação celular. Mas atualmente se sabe que vários nucleotídeos extracelulares e seus metabólitos regulam diversas funções biológicas, além de fornecer energia química para todas as células vivas (Dombrowski et al., 1998).

Nucleosídeos e nucleotídeos extracelulares são componentes normais do meio extracelular e encontrados em quase todos os sistemas orgânicos, sendo liberados a partir de uma grande variedade de células.

O ATP age como mediador de interação célula-célula, por intermédio de comunicações baseadas na sinalização mediada por Ca^{2+} intracelular, em vários tipos celulares como neurônios, células da glia e queratinócitos (Abbranchio & Burnstock, 1998; Novak, 2003; Koizumi e cols., 2004).

O ATP_e está envolvido em efeitos citostáticos e citotóxicos em vários tumores, sendo também necessário para a secreção de algumas citocinas (Langston et al., 2003).

O ADP extracelular estimula a agregação plaquetária e não apresenta efeito sobre os linfócitos (Dombrowski et al., 1998; North RA., 2002).

Outra molécula presente no meio extracelular é a adenosina, que pode ser liberada diretamente de nucleosídeos endógenos ou como resultado da quebra sequencial de ATP e ADP exógenos por reações de ectonucleotidases (Martin, 2007). O acúmulo de adenosina extracelular contribui para a imunodeficiência, pois apresenta efeitos tóxicos frente ao desenvolvimento dos linfócitos. E, sabe-se também que, tanto a adenosina quanto seu produto de degradação, a inosina,

possuem efeitos imunomodulatórios relacionados à inibição do processo inflamatório (Jijon HB et al., 2005; Nemeth ZH, et al., 2005).

O UDP parece exercer efeitos biológicos importantes em células T infiltrantes existentes em alguns estados inflamatórios (Somers et al., 1998). Os monócitos podem ser estimulados por UDP extracelular via ligação ao seu receptor. Este evento leva à produção de IL-8, um quimioatrativo de neutrófilos em células humanas. A produção desta interleucina é inibida pela degradação do UDP via uma nucleotidase heteróloga em monócitos (Warny et al., 2001).

Os nucleotídeos extracelulares são incapazes de atravessar as membranas celulares, sendo assim, eles alcançam o espaço intracelular se associando a proteínas ligadoras de nucleotídeos extracelulares, como os purinoreceptores e as ecto-nucleotidases.

Os purinorreceptores são proteínas transmembranares que medeiam funções sinalizadoras rápidas na neurotransmissão, secreção e vasodilatação, e funções sinalizadoras lentas como regeneração, proliferação e morte celular. Esses receptores são caracterizados de acordo com os efeitos farmacológicos de agonistas e antagonistas de nucleosídeos e nucleotídeos extracelulares (BOURS *et al.*, 2006), se dividindo assim, em dois grandes grupos: P1 e P2.

Os receptores do tipo P1 respondem especificamente a adenosina ou inosina, e agem pela modulação de proteínas-G que induzem uma variedade de respostas celulares, incluindo inibição da adenilato ciclase e estimulação da fosfolipase C e proteína kinase C. Estruturalmente, pertencem à superfamília de receptores do tipo serpentina, com sete domínios transmembranares, sendo subdivididos em receptores dos subtipos A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, que se ligam à adenosina extracelular com diferentes afinidades (Bours et al, 2006).

Os receptores do tipo P2 se ligam a ATP, UTP, ADP e UDP, sendo subdivididos em duas subfamílias: os receptores P2Y e P2X (Abbracchio & Burnstock, 1994; Jacobson e cols., 2002; Burnstock & Knight, 2004 - Tabela 01). Os receptores P2X são também conhecidos como receptores ionotrópicos, pois são proteínas transmembranares do tipo canal iônico, que realizam o transporte de diferentes íons como Na⁺, K⁺, Ca²⁺. Sete subtipos destes receptores já foram caracterizados até o momento (P2X₁₋₇) (Khakh e cols., 2001; North, 2002). Os receptores P_{2Y} ou receptores metabotrópicos, são receptores do tipo serpentina

acoplados à proteína G, que mobilizam cálcio por uma via mediada pela fosfolipase C. Destes, os subtipos P2Y_{1,2,4,6,11-14} já estão bem caracterizados, sendo que o receptor P2Y₁₄ responde a UDP-glicose, UDP-galactose e UDP N acetilglicosamina (Gounaris & Selkirk, 2005). O ligante natural dos receptores P2X é o ATP, enquanto os receptores P2Y apresentam responsividade subtipo específico para ATP, UTP, ADP e UDP.

Recentemente, Schicker e seus colaboradores (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, com NTPDases. Além disso, seus efeitos fisiológicos 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.

A distribuição dos receptores purinérgicos pode ser observada em todos os tecidos, sendo expressos também numa variedade de células imunes e não imunes. De uma maneira geral, a concentração extracelular dos nucleotídeos e a presença de subtipos diferentes de receptores nas células regulam a resposta celular a estas moléculas. Por sua vez, a presença e concentração dos nucleotídeos são reguladas pela ação de enzimas metabolizadoras destes (ectonucleotidases), presentes na membrana das células ou excretadas em formas solúveis.

Um esquema dos purinorreceptores em membranas celulares é mostrado na figura 4.

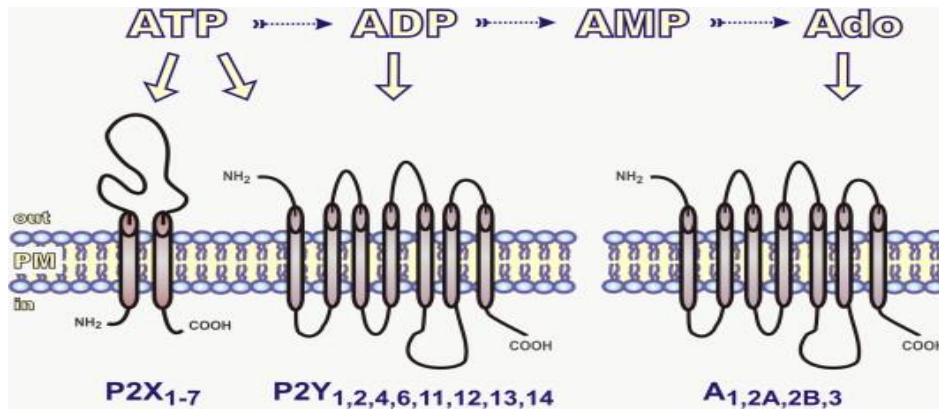


Figura 04. Modelo topológico de receptores de vias de sinalização purinérgica. Nucleotídeos medeiam efeitos sinalizadores em uma série de receptores ionotrópicos P2X e receptores metabotrópicos P2Y, que são classificados de acordo com sua afinidade por ATP, ADP e outros nucleotídeos alternativos agonistas ligados a açúcares. A geração de adenosina derivada de nucleotídeo age em quatro receptores específicos (Yegutkin, 2008).

Tabela 01. Subtipos de receptores P1 e P2, ligantes fisiológicos e distribuição em células do sistema imune (adaptado de Bours e Cols., 2006).

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

2.6 As ecto-nucleotidases e a família E-NTPDase

As ectonucleotidases são enzimas que catalisam a hidrólise de nucleotídeos extracelulares, como o ATP, UTP, GTP, ADP, UDP, GDP, dinucleotídeos e moléculas polifosfatos. Inicialmente, essas enzimas foram nomeadas de acordo com o substrato que hidrolisam. Assim, denominaram-se como ecto-ATPases, as enzimas que hidrolisam preferencialmente ATP e ecto-ADPase, as que preferem ADP. Aquelas que hidrolisam esses dois substratos eram chamadas de ecto-ATP difosfohidrolase ou ecto-apirases. Posteriormente, com a caracterização funcional e molecular de várias famílias de novas enzimas que hidrolisam os mesmos substratos, surgiu-se a necessidade de rever esta nomenclatura (Zimmermann e cols., 2000).

Assim, as ectonucleotidases, também conhecidas por ecto-apirases, ecto-ATPDase ou CD 39, foram denominadas de NTPDases por Zimmermann e cols. em 2001. Elas atuam na conversão dos nucleotídeos tri e difosfatados em seus componentes monofosfatados. As NTPDases não hidrolisam nucleotídeos monofosfatados, nem fosfatos não nucleosídeos. As ecto-5'-nucleotidases (Figura 5D) são responsáveis por hidrolisar os componentes monofosfatados em nucleosídeos, usualmente AMP até adenosina que por sua vez pode ser convertida em inosina pelas adenosinadeaminases. As ectopirofosfatases/fosfodiesterases (família E-NPP) (Figura 5B), utilizam diferentes substratos e possuem atividade fosfodiesterásica e nucleotídeo pirofosfatásica. As fosfatases alcalinas (Figura 5C) são capazes de liberar o fosfato livre a partir de uma variedade de substratos, incluindo nucleotídeos (Zimmermann, 1996; Zimmermann & Braun, 1996; Zimmermann, 2000).

Já se sabe que as E-NTPDases (Figura 5A), família que inclui a NTPDase 1 de *T. cruzi*, podem ser tanto secretadas (proteína solúvel) quanto localizadas na porção externa de membranas celulares ou membranas de organelas (proteínas transmembranas) (Ivanenkov, Murphy-Piedmonte et al., 2003; Leal, Strecher et al., 2005; Murphy-Piedmonte, Crawford et al., 2005). Estas enzimas na sua maioria catalisam a hidrólise dos nucleotídeos no espaço extracelular ou intracelular, dependendo da localização (se voltadas para o meio extracelular ou em organelas internas voltadas para o citosol) e já foram descritas em tecidos de plantas e

animais. Elas hidrolisam ligações pirofosfato de nucleosídeos di e trifosfatados, na presença de cátions divalentes (Ca^{2+} ou Mg^{2+}), com liberação de ortofosfato, em um mecanismo sequencial onde ADP aparece como intermediário (Laliberte & Beaudoin 1983).

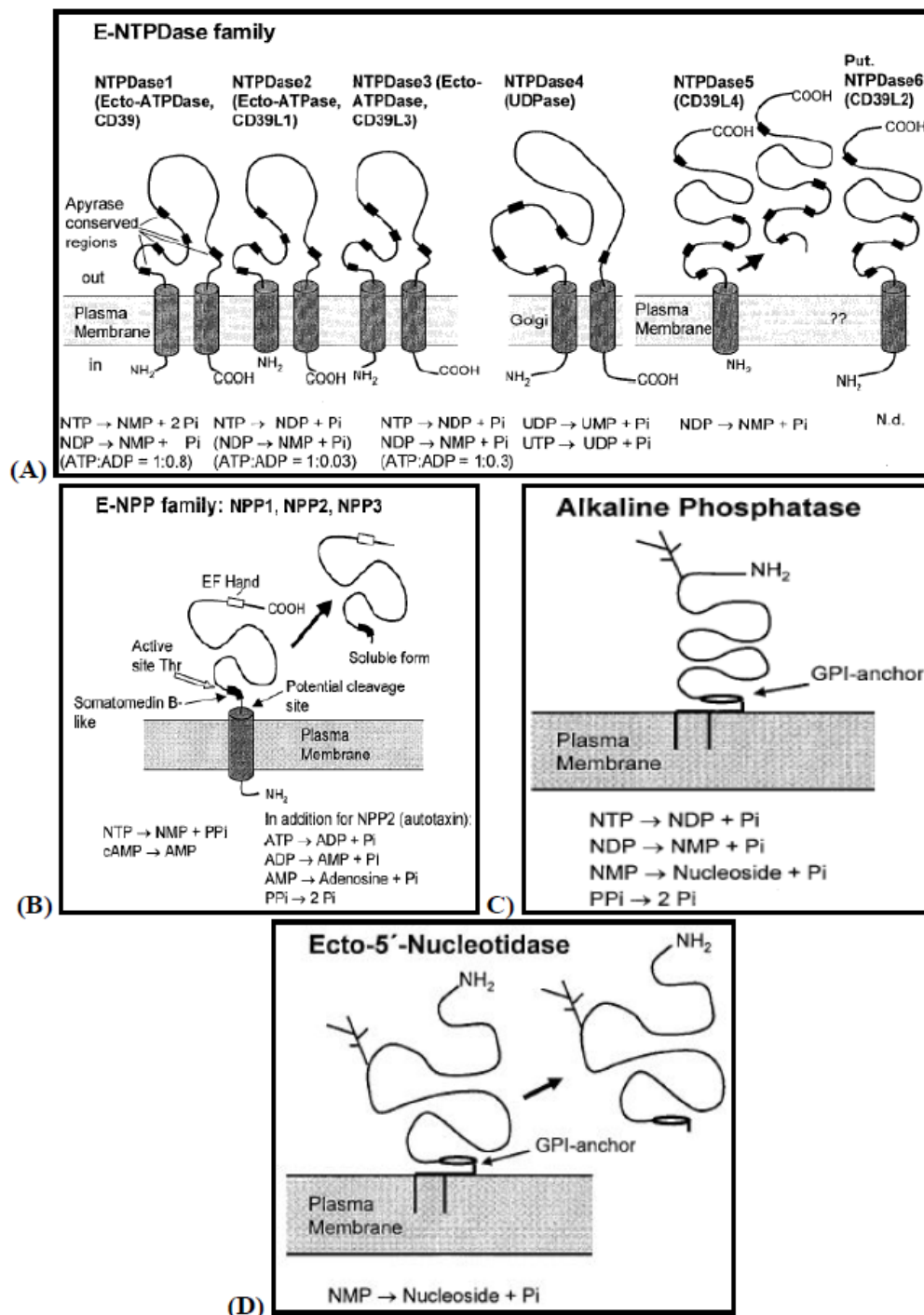


Figura 05. Topologia de membrana e propriedades catalíticas das diferentes famílias de ecto-nucleotidases. (A) Família E-NTPDase. As enzimas podem ocorrer como homodímeros. A NTPDase 5 pode ocorrer como uma proteína solúvel (seta). Uma possível NTPDase 6 solúvel, de estrutura primária conhecida está 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 ectp-5'-nucleotidase de mamíferos. A enzima ocorre em dímeros e pode ser liberada da membrana por uma fosfolipase endógena GPI- específica (Zimmermann, 2000).

Os papéis fisiológicos das E-NTPDases ainda não são totalmente conhecidos, mas algumas funções atribuídas a elas são sugeridas, como a participação na

imunorregulação, na adesão celular, sinalização em terminações purinérgicas (Zebisch & Sträter, 2007), secreção e tráfego em vesículas e, ainda, reciclagem de purinas. Também tem sido proposto uma associação entre uma ecto-NTPDase e uma 5'-nucleotidase na modulação destes processos biológicos, regulando a quantidade local de nucleotídeos.

As ectonucleotidases foram descritas na superfície externa do *T. cruzi* (cepa Y) e sua atividade de hidrólise de nucleotídeos tri e di fosfatados, característica da família E-NTPDase, foi demonstrada por Fietto et al., em 2004. Também neste trabalho, um gene da família E-NTPDase foi isolado e sequenciado, e a proteína deduzida foi denominada NTPDase-1. Além disto, sugeriu-se que esta proteína seria importante para a via de salvação de purinas, essencial a este parasito. Ainda sugeriu-se uma possível participação desta enzima na infecção pelo parasito, devido à maior atividade presente nas formas tripomastigotas do que epimastigotas.

Vários trabalhos corroboram a hipótese acima, sugerindo uma correlação entre a capacidade de hidrólise de ATP extracelular por parasitos e processos como virulência, sobrevivência intracelular e adesão celular e, mais recentemente modulação do sistema imune do hospedeiro (Asai et al., 1995; Nakaar et al., 1998; Barros, FS., et al., 2000; Berredo-Pinho et al., 2001; De Jesus et al., 2002; Tasca T., et al., 2004; Maioli et al., 2004; Marques-da-Silva, et a., 2008).

Em 2009, demonstrou-se pela primeira vez em *T. cruzi*, que as E-NTPDases, especificamente a NTPDase-1, tem ação facilitadora da infecção *in vitro* e *in vivo* (Santos et al., 2009).

2.7 NTPDase-1 de *T. cruzi*

A proteína deduzida denominada NTPDase-1, isolada e sequenciada a partir de um gene da família E-NTPDase, possui uma região codificante predita de 2282 pares de bases, relativa a uma proteína de 70,8 kDa de massa molecular (Fietto et al., 2004).

Análises de bioinformática sugerem que exista um peptídeo-sinal amino terminal contendo uma região de membrana e um sítio proteolítico. Esses dados sugerem a possibilidade da proteína ser direcionada ao retículo endoplasmático e seguir a rota de secreção celular, podendo atuar como proteína de membrana

plasmática (caso não haja proteólise do peptídeo-sinal) ou ser secretada para o meio extracelular (caso haja proteólise do peptídeo-sinal), gerando uma proteína de aproximadamente 66 kDa (Fietto et al., 2004; Santos et al., 2009).

Santos et al. (2009), demonstraram a atividade apirase da NTPDase 1 expressa em sistema bacteriano, com capacidade de hidrolizar ATP/ADP numa razão de 1,7 e sendo parcialmente inibida por suramina, um inibidor conhecido de E-NTPDases. Neste mesmo trabalho, foi visto também que o soro policlonal anti-NTPDase-1 de *T. cruzi*, apesar de não afetar significativamente a atividade da enzima recombinante, diminui em mais de 50% a capacidade infecciosa dos tripomastigotas em células de mamífero *in vitro*, quando analisadas após 24 horas de interação e 48 horas de infecção, sugerindo assim um papel para a NTPDase-1 na infecção experimental independente da atividade enzimática. Este mesmo soro, quando usado sobre o parasito previamente à infecção em modelo murino, mostrou um aumento da sobrevivência dos animais e diminuição do pico de parasitemia.

É importante salientar que uma nova busca por outros genes codificantes de isoformas da NTPDase-1 na sequência completa do genoma do *T. cruzi* (Najib M. El-Sayed et al., 2005) foi feita e que não foram encontrados outros genes homólogos (Santos et al., 2009).

Os trabalhos de Fietto et al (2004) e Santos et al (2009) evidenciaram a presença da NTPDase-1 de *T. cruzi* como uma molécula facilitadora da infecção, abrindo novas perspectivas de trabalho em relação ao seu uso como alvo para uma quimioterapia alternativa.

2.8 Metabolismo de purinas e papel das apirases em endoparasitas

As purinas são de importância vital para todos os organismos vivos, sendo essenciais para a síntese de várias macromoléculas, como ácidos nucleicos, proteínas e reações que requerem energia. Considerando a elevada taxa metabólica e de replicação dos parasitos, estes requerem uma ativa síntese de ácidos nucleicos, necessitando, conseqüentemente, de uma ampla demanda de nucleotídeos purínicos. Esses nucleotídeos, de uma maneira geral, podem ser sintetizados pela via da biossíntese de novo e, ou pela via de salvação. A via de novo utiliza componentes simples para a síntese de nucleotídeos purínicos. Já a via

de salvação (Figura 06) é uma via alternativa, a qual consiste de uma rota de reutilização de nucleotídeos, onde a célula satisfaz suas necessidades purínicas a partir de fontes endógenas e/ou exógenas de purinas pré-formadas.

Todos os parasitos estudados por el Kouni, 2003, 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).

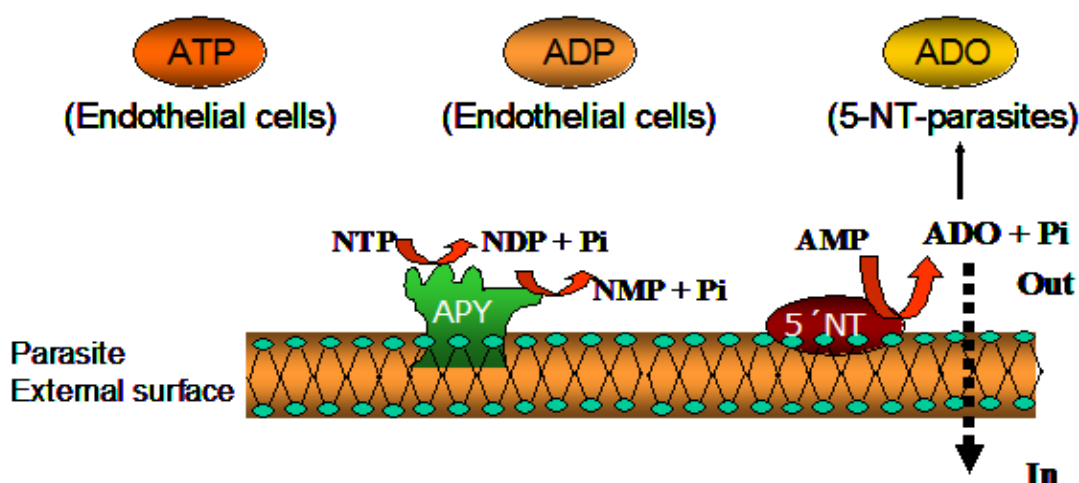


Figura 06. Desenho esquemático da via de salvação de purinas extracelulares e do contexto dos nucleotídeos extracelulares na interação parasito-hospedeiro (cedido por Juliana Lopes Rangel Fietto). As NTPDases hidrolizam nucleotídeos de ATP liberados pelas células do hospedeiro evitando a ativação dos receptores de ATP e da resposta inflamatória. O produto desta hidrólise, AMP pode ser hidrolizado pelas 5'NTs levando a produção de adenosina que pode ser captada pelo parasito suprimindo a necessidade de purinas e evitando a ativação dos receptores de adenosina. APY: NTPDase; 5'-NT: 5'-nucleotidase; NTP: Nucleotídeo trifosfatado; NDP: Nucleotídeo difosfatado; NMP: Nucleotídeo monofosfatado; Pi: Fosfato inorgânico; AMP: 5'-monofosfato de adenosina; ADP: 5'-difosfato de adenosina; ATP: 5'-trifosfato de adenosina; ADO: Adenosina; Out: Extracelular; In: Intracelular.

A primeira NTPDase descrita em parasitos foi a de *Toxoplasma gondii* (Asai, Miura et al. 1995), secretada na forma de grânulos densos, no interior do vacúolo parasitóforo da célula hospedeira. Quando ativada na presença de ditióis tais como o ditiotretol, resulta na ativação da enzima e numa rápida diminuição dos níveis de ATP na célula hospedeira. Este evento está associado à saída dos parasitos das células (Silverman Qi et al., 1998).

O *T. gondii*, assim como o *T. cruzi*, por ser um protozoário incapaz de utilizar a síntese “de novo” de purinas, necessita captar purinas do meio externo presentes na corrente sanguínea do hospedeiro e, ou no ambiente interno da célula. Esta hipótese foi sugerida por Bermudes, Peck et al., 1994, devido à diminuição da expressão das

NTPDases por RNA antisenso levar à consequente queda do número de *T. gondii* por vacúolo parasitóforo (Nakaar, Beckers et al. 1998).

Em trabalhos com *Schistosoma mansoni*, a participação da ATPDase no mecanismo de escape do parasito por cisão do ATP ou ADP, que podem ser liberados na superfície levando à ativação plaquetária ou de linfócitos T citotóxicos, foi proposta por Vasconcelos e cols., 1996.

A relação entre a atividade ectoATPásica e virulência também foi demonstrada em *Entamoeba histolytica*, onde as cepas patogênicas possuem maior atividade que as cepas não invasivas da mesma espécie (Barros e cols., 2000).

Atividade NTPDásica dependente de Mg^{2+} foi descoberta em *Leishmania tropica* e *Leishmania amazonensis* (Meyer-Fernandes, Dutra et al. 1997; Berredo-Pinho, Peres-Sampaio et al. 2001).

Em *L. amazonensis*, a atividade de clivagem de nucleotídeos até adenosina pela ecto-ATPase também está relacionada com a virulência (Berredo e cols., 2001). A atividade na forma amastigota, estágio obrigatoriamente intracelular, é dez vezes maior quando comparada com a forma promastigota (forma encontrada no tubo digestivo do inseto vetor) (Berredo-Pinho, Peres-Sampaio et al. 2001; Pinheiro, Martins-Duarte et al. 2006). A localização desta enzima nesta espécie foi confirmada por microscopia eletrônica utilizando anticorpos anti-CD39, sugerindo que essa proteína faça parte da família da NTPDase 1/ CD39 (Pinheiro, Martins-Duarte et al. 2006).

O agente causador da doença do sono, *Trypanosoma brucei brucei*, mostrou atividade de hidrólise de nucleotídeos em sua superfície externa desses dependente de Mg^{2+} , ou estimulada por outros cátions divalentes incluindo zinco, sugerindo, segundo os autores, que esta enzima desempenha algum papel no salvamento de purinas em meio extracelular (de Souza Leite, Thomaz et al. 2007).

Os componentes da via de salvação de purinas de parasitos são considerados bons alvos para o desenho de novas drogas (el Kouni 2003). Porém, apesar destas suposições e evidências, poucos trabalhos mostram de forma mais clara a correlação entre a ativação de hidrólise de ATP e o efeito biológico (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).

Bisaggio et al, 2003, sugeriram um possível papel da atividade Ecto-ATPase dependente de Mg^{2+} na interação *Trypanosoma cruzi*- célula hospedeira (macrófagos). Fietto e colaboradores, corroborando esta idéia, demonstraram, em 2004, a presença da atividade de hidrólise de nucleotídeos tri e di fosfatados (NTPDase) na superfície externa de *T. cruzi* (cepa Y), constatando que a atividade NTPDásica está presente em todas as formas do parasito. Neste trabalho foi demonstrado que o parasito possui atividade ecto-nucleotidásica em sua superfície e imunolocalização utilizando antissoro policlonal anti- NTPDase de *T. gondii* nas três formas do parasito (tripomastigota, amastigota e epimastigota) também foi realizada.

Adicionalmente, Santos e seus colaboradores (2009), expressaram a NTPDase-1 de *T. cruzi* em sistema heterólogo bacteriano em sua forma solúvel e observaram diminuição significativa da infecciosidade *in vitro* e da virulência *in vivo* (em camundongos) quando a enzima e, ou alguma homóloga eram inibidas por inibidores da atividade ou pela ação de antisoro policlonal anti-NTPDase-1.

Diante da importância comprovada da NTPDase-1 na infecciosidade e virulência de *T. cruzi*, e da sugestão de uma participação independente de atividade enzimática (Santos et al., 2009), este trabalho aborda o estudo da participação da NTPDase-1 na adesão de *T. cruzi* em célula de mamífero e a imunolocalização da proteína usando anticorpos específicos anti-NTPDase-1.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Aprofundar os conhecimentos sobre as funções biológicas da NTPDase-1 de *T. cruzi*, especialmente em relação à adesão em célula de mamífero e à sua localização subcelular.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar o papel biológico da NTPDase-1 nos momentos iniciais (30 minutos) da infecção em células de mamífero: por ensaios de competição da NTPDase-1 com os parasitos na adesão às células alvo; e por ensaios de bloqueio parcial da NTPDase-1 parasitária com o uso de anticorpos policlonais purificados. Além de verificar a imunolocalização da NTPDase-1 em epimastigotas, utilizando anticorpos policlonais anti-NTPDase-1 de *T. cruzi* por microscopia confocal e eletrônica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Parasito

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.

4.2 Meio Grace

O meio Grace foi originalmente formulado para dar suporte ao crescimento de células derivadas da *Antherea eucalypti*. Este meio é uma modificação do meio de Wyatt, se assemelhando ainda mais à hemolinfa da *Anthera*.

O meio basal quando adequadamente suplementado, é utilizado para cultura de células de uma variedade de insetos, incluindo várias espécies de lepidópteros, bem como alguns dípteros.

O preparo deste meio de cultura, comercializado em pó (Sigma, St Louis MO, USA), foi realizado a partir da dissolução em qsp 1000 mL de água mili Q autoclavada, o pH acertado para 6,5 e, para cada 100 mL deste, foram adicionados 10 mL de soro fetal bovino, 1 mL de penicilina (solução estoque de 16,8mM) e 1 mL de L- glutamina (solução estoque de 200 mM). O meio foi então, filtrado em membrana de éster de celulose com poros de 0,22 µM (Millipore Indústria e Comércio LTDA) e estocadas a 4°C em frascos esterilizados.

4.3 Cultivo do parasito

As amostras de *T. cruzi*, após serem descongeladas do nitrogênio líquido, foram crescidas em meio Grace (Sigma Cell Culture) a 28°C. Para os repiques dessas células, uma alíquota foi retirada para contagem em câmara de Neubauer, e volume de suspensão correspondente a 1×10^6 células foi transferido para uma nova garrafa de cultivo de 25 cm³ e completados com novo meio de Grace em quantidade suficiente para 10 mL.

4.4 Curva de crescimento

Para obtenção da curva de crescimento de epimastigotas de *T. cruzi*, foi realizado, em triplicata, um repique inicial com 1×10^5 células/mL em garrafas de cultivo de 25 cm³ e completados com um novo meio de Grace em quantidade suficiente para 10 mL. Este foi considerado o dia zero da curva. A partir deste dia, foram feitas contagens em câmara de Neubauer do número de parasitos em dias sucessivos, duas vezes ao dia. As médias diárias dos parasitos contados foram usadas para plotar a curva de crescimento.

4.5 Células VERO

As células VERO são células de carcinoma derivadas de rim de embrião de macaco verde africano (*Chlorocebus aethiops*). Esta linhagem foi obtida da American Type Culture Collection e armazenada em tubos de criopreservação em nitrogênio líquido (-196°C).

4.6 Meio RPMI

O meio de cultura RPMI 1640 foi desenvolvido por Moore (1966) no Roswell Park Memorial Institute (Moore e cols., 1967; Moore e cols., 1976).

O preparo deste meio de cultura, comercializado em pó (Sigma, St Louis MO, USA), foi realizado a partir da dissolução em 1000 mL de água destilada, o pH acertado para 7,2 e, para cada 100 mL de meio foram adicionados 5 mL de SFB, 1 mL de penicilina (solução estoque de 16,8 mM) e 1 mL de L- glutamina (solução estoque de 200 mM), 100 µL de 2-β-Mercaptoetanol (solução estoque de 50 mM) e 2,5 mL de Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) 1 M. Posteriormente, o meio foi filtrado em membranas de éster de celulose com poros de 0.22 µm (Millipore Indústria e Comércio LTDA) e estocados a 4°C em frascos esterilizados.

4.7 Cultivo de células VERO

Para a manutenção das células VERO foram utilizadas garrafas de cultura de 25 cm³ contendo 10 mL de meio de cultura RPMI adicionado de 5% 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% (esterilizada), adição de 5 mL de tripsina (100 mL de PBS 1X, 0,5 g de tripsina e 0,02 g de EDTA) e incubação por 2 a 3 minutos em estufa a 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 em tubo Falcon de 15 mL, centrifugada por 10 minutos a 152 g (5° C). O sobrenadante foi descartado e o “pellet” suspenso em 10 mL de solução salina 0,9% esterilizada. 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 x 10⁶ células foram semeadas em 15 mL de meio de cultura RPMI 5% SFB em garrafas de 75 cm³ e incubadas em estufa a 37° C, 5% CO₂ e atmosfera umidificada a 95%.

4.8 Obtenção da NTPDase-1 recombinante

A porção solúvel da NTPDase-1 da cepa Y de *T. cruzi* foi expressa em sistema heterólogo bacteriano de *E. coli* pET21b (Novagen) como descrito por Santos, e seus colaboradores (2009).

A purificação dos corpos de inclusão foi realizada como previamente descrito por Areas *et al.* (2002) com modificações (semi-purificação). Foram utilizados tampão de lise composto de 50 mM de Tris pH8,0, 100 mM de NaCl e os inibidores de proteases aprotinina (1 g/mL), pepstatina (1 g/mL), leupeptina (1 g/mL). Foi adicionado 1 mg/mL de lisozima para auxiliar no processo de lise, feita por sonicação em 6 pulsos de 10 segundos intercalados com intervalos de 10 segundos no gelo, e amplitude de 20 Hz. Os passos de centrifugação foram realizados a 12500 g e o “pellet” solubilizado foi suspenso em 10 mL de tampão (50 mM de Tris pH 8,0; 500 mM de NaCl) e armazenado a 4°C por 24 h antes de ser utilizado. A

purificação da fração solúvel e dos corpos de inclusão em resina de Ni⁺⁺ (Sigma St Louis MO, USA), em condições nativas, foi feita de acordo com o manual do fabricante, com tempo de ligação de 1 h e 30 min. O tampão de lavagem continha 50 mM de tris pH 8,0, 100 mM de NaCl, 10 mM de imidazol e 8 M de uréia. Para o tampão de eluição foi utilizado 250 mM de imidazol mantendo os demais constituintes e suas respectivas concentrações.

4.9 Determinação da Concentração da Proteína

A concentração de proteína utilizada para os demais ensaios foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) para microplaca, segundo instruções do fabricante (Biorad®). As concentrações padrão foram determinadas com BSA (Soroalbumina bovina).

4.10 Análises em SDS-PAGE

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

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

A produção de anticorpos foi realizada conforme Cunha, 2010. Resumidamente, um coelho, fêmea, adulta jovem, proveniente do biotério de criação de coelhos da Universidade Federal de Viçosa (UFV) foi utilizado. Antes da imunização, uma amostra de sangue foi obtida por punção da veia marginal da orelha (soro pré-imune). Foram realizadas três imunizações, intradérmicas, com 200µg/500µL de proteína, com intervalos de 21 e 15 dias, respectivamente. Na primeira imunização foi adicionado, em igual volume, adjuvante completo de Freund, e nas outras duas, adjuvante incompleto. No sétimo dia após a terceira imunização foi colhida uma amostra de sangue para verificar se a imunização havia sido efetiva.

Para a determinação do título do antissoro, um *Dot Blot* foi realizado, com 0,5 µg/µL de proteína no volume de 2 µL por círculo de membrana de nitrocelulose. Para o bloqueio, BSA na concentração de 0,3% foi utilizado por trinta minutos. Após três

lavagens de cinco minutos com PBS-T, os soros policlonal ou pré-imune foram adicionados em diferentes concentrações e a incubação ocorreu por uma hora. Em seguida, três lavagens de cinco minutos com PBS-T foram realizadas para posterior incubação com o anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich®) na diluição 1: 20.000. A reação foi revelada com solução contendo 0,1% de 3,3'-diaminobenzidina, 0,01% de H₂O₂, 1% de cloreto de níquel em Tris-HCl pH 7,6.

4.12 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 por 30 minutos em 20 mL de HCl 1 mM “gelado”, 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 (5 mL). Posteriormente a resina foi lavada por duas vezes 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 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. 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 por oito vezes alternadamente com tampão acetato 0,1 M, NaCl 0,5 M pH 3,5 e tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,5. Finalmente a resina foi lavada com PBS 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 antissoro 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.

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

As IgGs específicas anti-NTPDase-1 de *T. cruzi* foram purificadas de acordo com Chandler, 2007, com algumas adaptações. O soro total foi diluído na proporção de 1 mL de soro para 10 mL de tampão de ligação (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 pela coluna em 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 10 mM, 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 eluídos com 5 mL de tampão glicina 100 mM pH 2,5, e os anticorpos ligados por interações básica-sensíveis foram eluídos com 2 mL de tampão trietilamina pH 11,5.

Finalmente o pH das amostras de eluição contendo os anticorpos foi acertado para 7,2. As amostras foram reunidas e concentradas utilizando Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (Milipore®).

4.14 Avaliação da especificidade dos anticorpos purificados

A avaliação da especificidade dos anticorpos purificados foi feita por imunodeteção por *Western blot*, tendo sido utilizada metodologia de acordo com Sambrook e Russel, 2001.

Amostras de 1 µg da proteína NTPDase-1 de *T. cruzi* foram aplicadas em 3 canaletas de gel de poliacrilamida 10%. Como controle negativo foi utilizado extrato de *E. coli* BL 21 pet vazio. A eletroforese foi realizada com tampão de corrida (Tris 25 mM, 250 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,3) em condições constantes de voltagem (80V), utilizando-se o sistema *Mini Protean Dual Slab Cell* (Bio-Rad®). Após a separação protéica, deu-se início à 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 4° C. Decorrido esse tempo, foram efetuadas 3 lavagens de 5 min com PBS-T 0,1% e as membranas foram incubadas por 12 horas com o anticorpo primário (anticorpo anti-NTPDase-1 de *T. cruzi*), nas seguintes diluições: 1:250, 1:500 e 1:1000 em PBS-T. 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 (qsp 10 ml de 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.

4.15 Ensaios de adesão na presença da proteína recombinante NTPDase 1 de *T. cruzi*

Os ensaios de adesão por competição com a proteína recombinante NTPDase 1 de *T. cruzi* foram realizados na presença de diferentes concentrações da proteína (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 µg/mL).

Para isto, células VERO foram cultivadas por 48 horas em lamínulas de vidro redondas de 13 mm na concentração inicial de 5×10^4 células/ lamínula em meio RPMI 5% SFB. Após este tempo, as células foram colocadas em contato por 5 minutos com as diferentes concentrações da proteína recombinante. Os parasitos, na forma epimastigota, crescidos em meio de Grace foram centrifugados, contados e ressuspendidos na concentração desejada em meio RPMI 5% SFB. Após o tempo de 5 minutos, estes, por sua vez, foram adicionados às células VERO para posterior incubação por 30 minutos a 4°C.

Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS a 4°C, fixadas com solução de Bouin por 15 minutos, coradas pelo método de Giemsa a lento, e analisadas no microscópio, como realizado por Santos et al. (2009).

Como controles deste ensaio, utilizou-se: albumina na concentração de 4µg/mL em lugar da proteína recombinante NTPDase 1 de *T. cruzi*, o tampão de

eluição (no qual está a proteína recombinante) sem nenhuma proteína e um controle sem adição de nada(contendo somente as células VERO, o parasito e o meio de cultura RPMI).

A porcentagem de parasitos aderidos foi determinada por contagem em triplicata de 300 células, para cada lamínula testada. Foram realizados três experimentos independentes.

4.16 Ensaio de adesão com o anticorpo anti- NTPDase 1 de *T. cruzi*

Os ensaios de adesão foram realizados na ausência ou presença de anticorpos policlonais anti-NTPDase-1 de *T.cruzi* purificados na diluição de 1:100.

Os parasitos na forma epimastigota crescidos em meio de Grace foram centrifugados, contados e ressuspensos na concentração desejada em meio RPMI 5% SFB, sendo posteriormente incubados com os anticorpos (na concentração 1:100) por 10 minutos, lavados gentilmente com PBS e colocados em contato com as células VERO (previamente cultivadas por 48 horas em meio RPMI 5% SFB em lamínulas na concentração inicial de 5×10^4 células/lamínula) a 37°C na proporção de 20:1 (parasitos/célula). Estes foram então deixados interagir por 30 minutos a 4°C, como descrito por Bisaggio et al, 2003. Em seguida, as lamínulas foram lavadas delicadamente com PBS a 4°C, fixadas com solução de Bouin por 15 minutos, coradas pelo método de Giemsa a lento, e analisadas no microscópio, como realizado por Santos et al. (2009).

Como controle negativo deste ensaio, foi utilizado anticorpo comercial dog IgG (Santa Cruz Biotechnology) em lugar do anticorpo anti NTPDase 1 de *T. cruzi*; e um controle sem adição de nenhum outro componente (contendo somente células VERO, epimastigotas de *T. cruzi* e o meio de cultura RPMI).

A porcentagem de parasitos aderidos foi determinada por contagem, em triplicata, de 300 células para cada lamínula testada. Foram realizados três experimentos independentes.

4.17 Expressão da proteína NTPDase 1 de acordo com a curva de crescimento do parasito

A expressão da proteína NTPDase 1 de acordo com as diferentes fases de crescimento do parasito foi analisada por ensaio de “western blot” com o extrato total

de epimastigotas crescidos em meio de Grace a 28°C de diferentes dias referentes à curva de crescimento.

Para isso, os parasitos de um mesmo cultivo em meio de Grace foram aliquotados na concentração total de $5,0 \times 10^7$ epimastigotas, nos dias: 5, 10, 14 e 21, referentes respectivamente às fases lag, log, estacionária e declínio/morte. Os parasitos aliquotados após lavagem com PBS foram congelados à -80°C.

Após obtenção de todas as alíquotas, os precipitados de parasitos congelados foram ressuspensos em tampão de lise (Tris-CL 50 mM pH8,0 e NaCl 0,3 M) adicionado de um mix de inibidores (1 µg/ml de aprotinina, 1 µg/ml de leupeptina, 5 µg/ml pepstatina) e DNase I (1 u/µl – Thermo Scientific®). Após 10 minutos no gelo, as alíquotas foram aplicadas no gel de SDS- PAGE em canaletas de 1mm, a 100 volts por 2 horas. O anticorpo primário usado foi o anti- NTPDase 1 purificado na concentração 1:100 em PBS 1x- tween 0,1%, e o anticorpo secundário foi o anti-IgG de coelho produzido em cabra conjugado a peroxidase na diluição 1:20000.

4.18 Microscopia confocal

Análises por microscopia confocal de epimastigotas (de passagem em cultura axênica indeterminada) permeabilizadas foram realizadas. Para isso, as células foram aderidas à lamínulas com poli-lisina 0,1%, fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos e lavadas com PBS por 5 minutos. Três alíquotas de uma mesma amostra de parasitos foram utilizadas. A primeira alíquota de parasitos não foi permeabilizada, permanecendo no PBS; a segunda alíquota foi permeabilizada por 10 minutos com tampão fosfato salino (PBS)/ 0,3% Triton X-100; e a terceira alíquota foi permeabilizada com acetona -20°C por 4 minutos.

Todas as alíquotas foram lavadas com PBS e bloqueadas com PBS/ soro albumina bovina 1%/ soro de cabra 1% por 30 minutos. As alíquotas foram lavadas novamente com PBS e incubadas com os anticorpos por 30 minutos, conforme descrito a seguir: uma marcação dupla foi realizada utilizando anticorpo purificado anti-NTPDase-1 a 1:50, juntamente com anti-α-tubulina produzida em camundongo comercial MILLIPORE® a 1:200. Como anticorpo secundário foram utilizados anti-IgG de coelho conjugado a Alexa 488 e anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa 594 da Invitrogen®, conforme especificação do fabricante.

As lâminas foram montadas com Prolong Gold com DAPI e lavadas em etanol absoluto.

As imagens foram obtidas em microscópio confocal Leica® modelo TCS-SP5 AOBS do Laboratório Multiusuário de Microscopia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo, com auxílio do estudante de iniciação científica Felipe Freitas de Castro e da Profa. Munira Muhammad Abdel Baqui.

4.19 Análise por microscopia eletrônica

Para imunocitoquímica, os parasitos foram fixados por 2 horas em temperatura ambiente em uma solução de glutaraldeído 0,5%, paraformaldeído 4%, cloreto de cálcio 5 mM, sacarose 3,7% e cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2. Após a fixação, os parasitos foram lavados com tampão cacodilato de sódio 0,1M por 2 vezes. A desidratação foi realizada inicialmente com etanol 50%, seguida de etanol 70%, etanol 90% e etanol absoluto. Em todas as etapas, o material foi incubado por 15 minutos em temperatura ambiente, com exceção do etanol absoluto, que foi incubado por 30 minutos. Após a desidratação, os parasitos foram emblocados com resina LR White. Para isso, inclui-se os parasitos em mistura 1:1 resina/ etanol absoluto por 18 horas a 4°C, seguida da inclusão em mistura 2:1 resina/ etanol absoluto por 18 horas a 4°C e finalmente em resina pura a 60°C por 48 horas.

Os ultracortes foram obtidos com navalha de diamante no ultramicrotomo Du Pont-Sorvall®, modelo Porter-Blum MT2-B e colocados em grades de níquel de 300 mesh. As grades foram incubadas em cloreto de amônio 50 mM em PBS 7,2 por 20 minutos em temperatura ambiente, seguida de incubação em albumina 1,5% em PBS pH 8,0 tween 20 0,01% por 20 minutos em temperatura ambiente.

O anticorpo policlonal purificado anti-NTPDase-1 foi diluído 1:100 em PBS com albumina 1,5% pH 8,0, adicionado às grades e incubados overnight a 4°C. As grades foram lavadas duas vezes em PBS e, em seguida, adicionou-se o anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em cabra conjugado a partículas de ouro de 10 nM, diluído 1:30 em PBS com albumina 1,5% pH 8,0, por 1 hora. Após quatro lavagens com água destilada, secaram-se as grades em papel de filtro. O contraste foi realizado no dia seguinte com acetato de uranila 5% por 30 minutos e citrato de chumbo 0,2% por 5 minutos.

As análises foram realizadas no microscópio eletrônico de transmissão EM 109 da Zeiss® do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, com auxílio da pesquisadora Cláudia Vânia Miranda de Oliveira.

4.20 Fixação e coloração pelo método de Giemsa

Inicialmente as lamínulas foram fixadas por 15 minutos em solução de Bouin - 10 mL de formol [40%], 2 mL de ácido acético e 30 mL de solução saturada de ácido pícrico. Em seguida, foram lavadas delicadamente com água destilada, até o desaparecimento da cor amarelada do fixador e imersas na solução de Giemsa - 1 mL de Giemsa [Merck], 1mL de álcool metílico, 0,1 mL de Na_2CO_3 0.5%, 40 mL de água destilada. Após 18 horas, as lamínulas foram lavadas com água destilada, mergulhadas rapidamente em álcool 70%, tratadas em mistura de acetona-xilol e clarificadas, por último, em xilol.

4.21 Análise estatística dos dados

Todos os experimentos foram realizados em triplicata em três experimentos independentes.

Os dados foram analisados estatisticamente pelo software ASSISTAT Versão 7.6 beta (2011), utilizando o Teste Tukey. Os valores de P iguais ou menores que 0,05 foram considerados significantes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da fase log do crescimento de epimastigotas de *T. cruzi*

A curva de crescimento das formas epimastigotas para a cepa Y de *T. cruzi* foi realizada durante 22 dias consecutivos em três experimentos independentes, conforme descrito anteriormente. O gráfico da curva de crescimento mostrado é resultante das médias de contagens feitas em duplicata longo dos 20 dias dos três experimentos independentes (Figura 07).

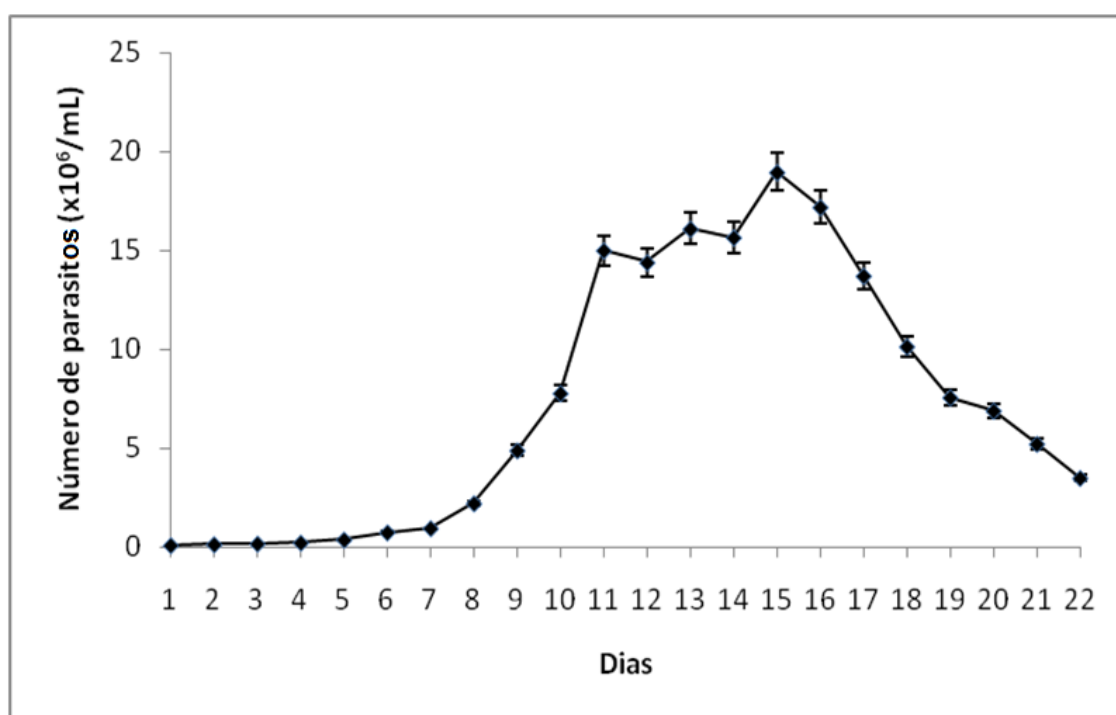


Figura 07. Curva de crescimento de epimastigotas de *T. cruzi*. Os parasitos foram cultivados em meio Grace's a 28°C durante 22 dias. Os dados são relativos à média de três experimentos independentes.

Analisando-se o gráfico, pode-se observar que a fase lag de crescimento dos parasitos durou até, aproximadamente, o 7º dia, a fase log, do 8º ao 11º dia e a fase estacionária do 12º ao 16º dia. A partir do 16º dia a mortalidade dos parasitos foi alta. Para os ensaios de adesão, é desejado utilizar o maior número de parasitos vivos e viáveis possível. Assim poderia ser escolhido qualquer dia do intervalo entre o 8º e 11º dias. Foi escolhido o décimo dia de crescimento para a realização dos ensaios, dia este em que os parasitas se encontravam em um ponto intermediário da fase log.

5.2 Padronização da melhor concentração de células VERO para os ensaios de adesão e infecção

Após cultivo, em triplicata, de diferentes quantidades de células VERO (5×10^4 , 1×10^5 , $2,5 \times 10^5$, 5×10^5 e 1×10^6 células) em meio RPMI completo por 48 horas e subsequente coloração das células pelo método de Giemsa a lento, as mesmas foram avaliadas quanto ao estado de confluência por microscopia de luz e coloração por Giemsa (Figura 08).

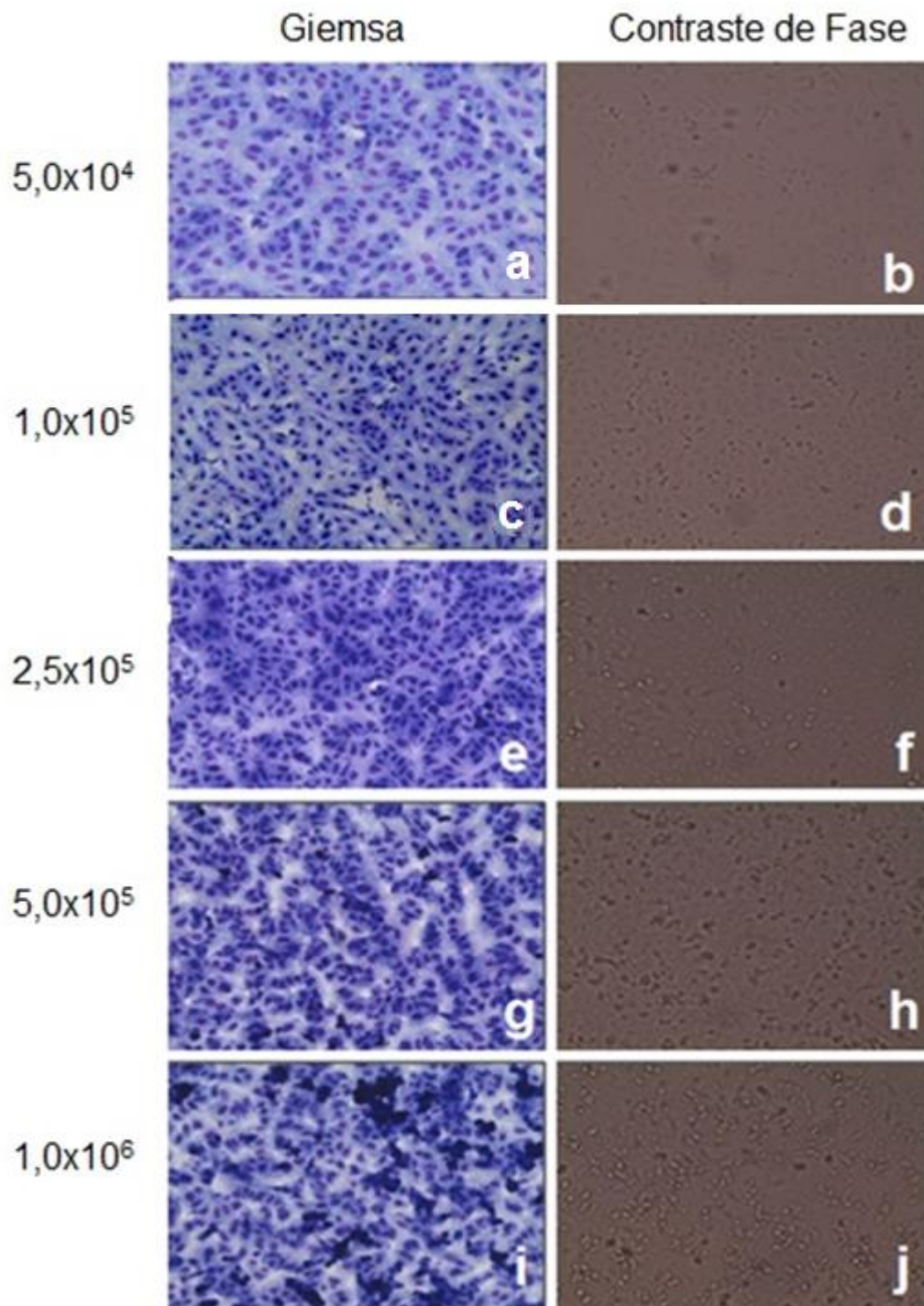


Figura 08. Avaliação do número de células VERO por lamínula para o ensaio de adesão. a e b: $5,0 \times 10^4$ células VERO/ lamínula; c e d: $1,0 \times 10^5$ células VERO/ lamínula; e e f: $2,5 \times 10^5$ células VERO/ lamínula; g e h: $5,0 \times 10^5$ células VERO/ lamínula; i e j: $1,0 \times 10^6$ células VERO/ lamínula. a, c, e, g e i: células VERO observadas ao microscópio no aumento de 20X - após coloração pelo método de GIEMSA a lento. b, d, f, h e j: células VERO observadas ao microscópio no aumento de 20X - contraste de fase

Conforme se pode-se observar, os cultivos feitos com 1×10^6 , 5×10^5 e $2,5 \times 10^5$ de células VERO resultaram em um grau de confluência alto. Isso pôde ser observado pela ausência de espaço entre as células, que por serem tumorais, e

assim terem perdido a sua capacidade de inibição por contato, ainda crescem formando bicamadas quando o espaço na monocamada já está saturado. Os inóculos de 1×10^5 e 5×10^4 não apresentaram 100% de confluência, porém, apesar da pouca distinção apresentada nas fotografias anteriores, o grau de confluência do cultivo de 5×10^4 células, quando comparadas as lamínulas como um todo, em relação ao de 1×10^5 , foi ainda menor.

Para a realização dos ensaios de adesão, é ideal tanto que o crescimento das células VERO no período de 48 horas resulte em uma monocamada de células bem desenvolvida, porém sem confluência alta, para que a visualização da adesão dos parasitos às mesmas seja favorecida. Em um estado de excesso de confluência e de consequente bicamada, os citoplasmas das células se confundem, o que dificultaria o cálculo do índice de adesão que se baseia no número de parasitos aderidos por célula.

Com base no exposto, o inóculo de 5×10^4 células VERO foi considerado ideal para a realização dos ensaios de adesão e utilizado para os demais experimentos.

5.3 Obtenção da NTPDase-1 recombinante purificada

Para realização dos demais experimentos (produção e purificação de anticorpos específicos e ensaios de competição) foi necessário produzir a NTPDase 1 recombinante, conforme descrito anteriormente por Santos et al., 2009.

Conforme se pode observar na figura 09, após a purificação, observa-se a presença de uma banda com cerca de 70 kDa no gel de SDS-PAGE referente às eluições. A massa molecular observada para a NTPDase 1 recombinante purificada é de aproximadamente 66 kDa. Esses resultados são corroborados por Fietto, et al (2004), que a partir do RNAm de epimastigotas, isolaram um gene da suposta NTPDase 1, cujo transcrito possuiria tamanho de aproximadamente 69 kDa. Como a expressão é feita retirando-se o peptídeo sinal amino-terminal (Santos et al., 2009) a massa molecular da proteína recombinante é um pouco menor do que da proteína natural predita contendo o peptídeo sinal. Para os ensaios posteriores, foram utilizados a segunda e terceira eluições, como apresentado na figura 09.

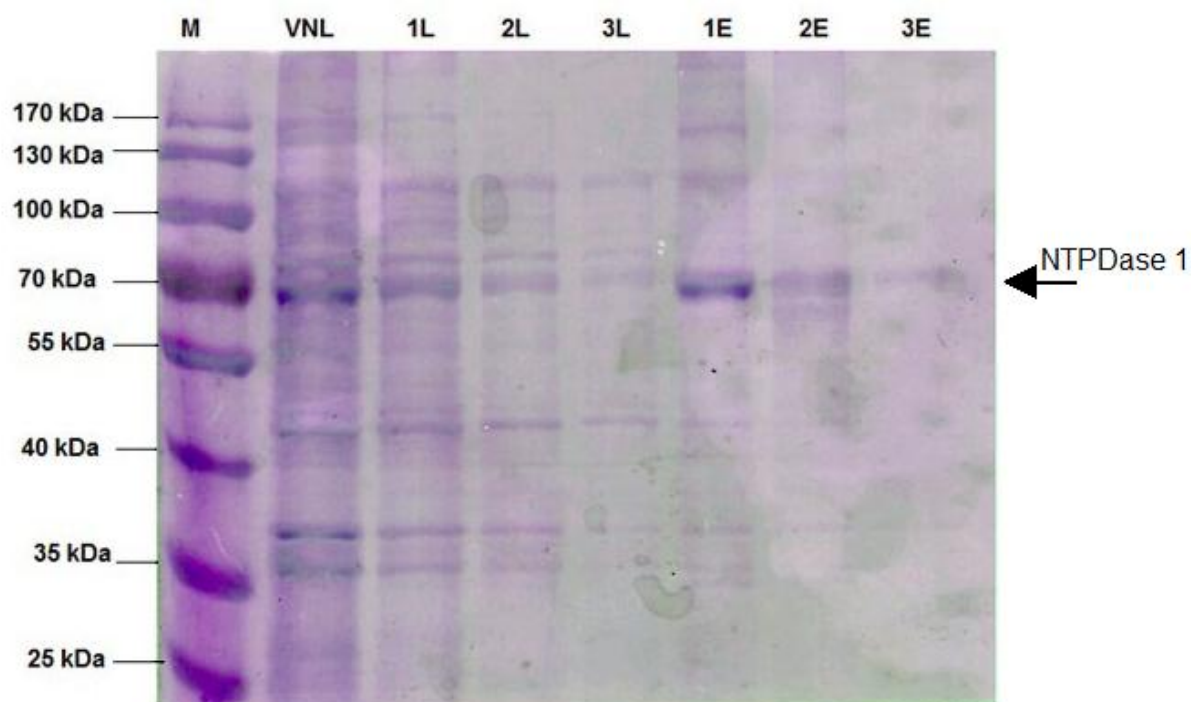


Figura 09. Purificação dos corpos de inclusão solubilizados contendo a proteína heteróloga E-NTPDase-1 de *T. cruzi*. Uma amostra de 15 µL foi aplicada em cada canaleta. A visualização das bandas no gel de SDS-PAGE 10% se deu pela coloração com Azul de Coomassie. M: Marcador de massa molecular (PageRuler™ Prestained Protein Ladder – Thermo Scientific); VNL: Volume Não Ligado; 1 L: Primeira Lavagem; 2 L: Segunda Lavagem; 3 L: Terceira Lavagem; 4 E: Quarta Eluição; 3 E: Terceira Eluição; 2 E: Segunda Eluição; 1 E: Primeira Eluição.

5.4 Determinação do título dos anticorpos anti- NTPDase 1 de *T. cruzi* purificados

Os anticorpos anti- NTPDase 1 de *T. cruzi* purificados em coluna de afinidade acoplada a NTPDase 1, foram titulados por western blot e dot blot. Por dot blot, os anticorpos mostraram reconhecimento até a concentração de 1:128.000, tendo como controle positivo o antissoro anti NTPDase 1 de *T. cruzi* policlonal e como controle negativo um anticorpo não relacionado anti- IgG de camundongomouse (Figura 10).

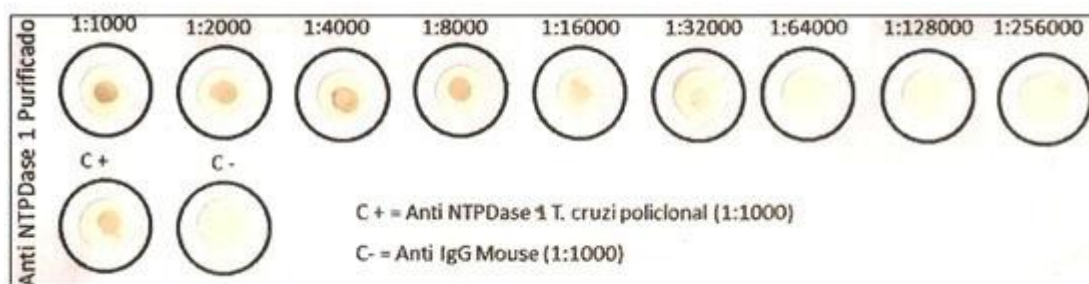


Figura 10. Titulação do Anticorpo policlonal purificado por DOT-ELISA. Foram realizadas um total de 8 diluições 1:1000; 1:2000; 1:4000; 1:8000; 1:16000; 1:32000; 1:64000; 1:128000; 1:256000. Título igual ou maior a 128000. C+: Controle positivo; C-: Controle negativo.

Análises feitas por “western-blot” (figura 11) confirmaram a presença de uma única banda referente a uma proteína de aproximadamente 66 kDa representando a NTPDase 1. Porém analisando a canaletas correspondentes ao controle negativo, contendo extrato protéico de *E. coli* com vetor vazio, observa-se a presença de uma forte banda de baixa massa molecular (menor que 35 kDa). Esta banda pode ser relativa à banda da proteína inespecífica produzida pela presença do vetor vazio que mesmo sem um gene específico clonado produz uma pequena proteína com cauda de histidina, e o reconhecimento ocorre via anticorpos anti-cauda de histidina e não via anticorpos anti NTPDase 1 específicos.

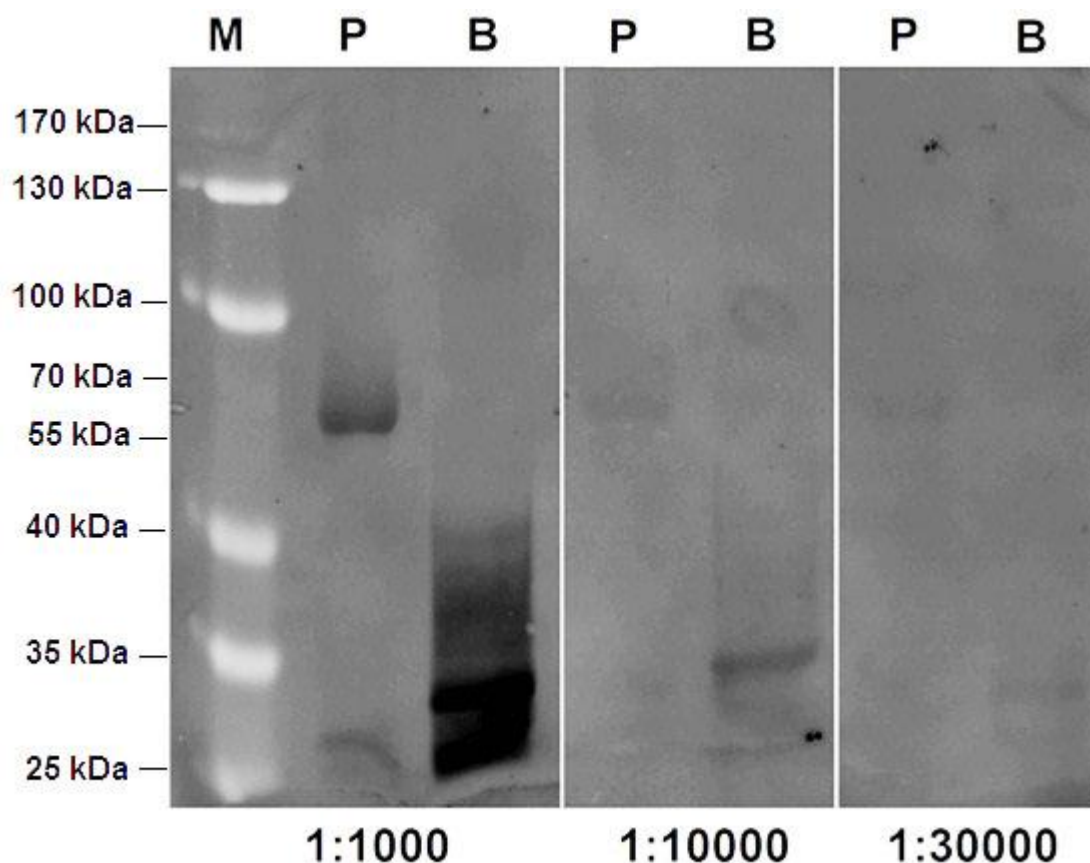


Figura 11. Titulação do Anticorpo policlonal purificado por Western- blot. Foram realizadas um total de 3 diluições, 1:1000; 1:10000; 1:30000. M: Marcador de massa molecular (PageRuler™ Prestained Protein Ladder – Thermo Scientific); P: Proteína NTPDase 1 Purificada; B: BL 21 pet 21b 1:1000, 1:10000 e 1:30000 correspondem à diluição do anticorpo anti-NTPDase 1 policlonal purificado utilizado para cada reação.

5.5 Avaliação do índice de adesão na presença da proteína recombinante NTPDase 1 de *T. cruzi*

Um considerável progresso vem sendo obtido no estudo das ectonucleotidases em geral, e também particularmente sobre as ectoATPases.

A atividade ectonucleotidásica nas formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi* vem sendo estudada desde 2004 por Fietto e colaboradores, que observaram maiores níveis de hidrólise de ATP em relação ao ADP para as tripomastigotas em relação às epimastigotas.

Em 2009, Santos e colaboradores mostraram que a atividade ecto-ATPase é superior às atividades ecto-ADPase ou ecto-AMPase, possivelmente por causa do conhecido papel do ATP como molécula pró- inflamatória. Esta alta razão de hidrólise do ATP em relação ao ADP extracelulares é importante para manter a

capacidade do parasito de infectar células VERO. Neste mesmo trabalho, foi demonstrado que antissoro policlonal anti-NTPDase-1 de *T. cruzi* não purificado (1:50 e 1:100) é capaz de bloquear a infecção celular em até 53% em 24 horas de infecção. No entanto, nenhum efeito inibidor direto na atividade da enzima foi obtido quando se utilizou ensaios “in vitro”, a NTPDase-1 de *T. cruzi* recombinante e o antissoro policlonal anti-NTPDase-1 de *T. cruzi* não purificado.

Desta forma, o propósito deste presente trabalho é obter maiores evidências para esse possível papel da NTPDase 1 de *T. cruzi* no processo de infecção utilizando a forma epimastigota do parasito nos momentos iniciais da infecção.

A comparação entre os dados aqui obtidos com os dados de infecção para tripomastigotas obtidos na publicação de Santos e colaboradores de 2009 é válida, uma vez que algumas publicações demonstram a capacidade dos epimastigotas em adentrar às células hospedeiras, ainda que, subsequentemente, sejam mortas no vacúolo parasitóforo (Martínez et al, 2010). Além disso, Cunha e colaboradores em 2010, demonstraram por microscopia de fluorescência confocal a presença da NTPDase-1 na superfície da forma epimastigota do parasito (crescidos em meio rico LIT), ainda que em menor quantidade quando comparada às marcações obtidas para as formas infectantes tripomastigotas e amastigotas.

Assim, foram realizados experimentos para avaliação do papel da NTPDase-1 na adesão de epimastigotas em células VERO. As epimastigotas foram crescidas em meio de GRACE (um meio mais limitado que o meio LIT usado por Cunha (2010). Para evitar a internalização dos parasitos, os ensaios foram feitos a 4°C por 30 min, conforme descritos por Bisaggio et al, 2003. Foram realizados ensaios na presença da proteína recombinante purificada e na presença dos anticorpos anti-NTPDase 1 purificados. Imagens dos experimentos mostrando o parasito aderido às células VERO podem ser visualizadas na figura 12.

Os ensaios de competição com a proteína recombinante mostram expressiva inibição da adesão das epimastigotas quando em presença de quantidades crescentes da proteína. Considerando 100% de adesão para o controle negativo composto apenas de células VERO e parasito, obteve-se 14,53% de adesão na presença de 4 µg/ml de NTPDase 1 recombinante. Para as demais concentrações da proteína em ordem crescente, obteve-se 26,50%; 22,22% e 23,08% de adesão respectivamente. Enquanto os outros controles negativos do ensaio alcançaram

106,84% para 4µg/ml de albumina e 118,80% para o controle negativo na presença do tampão da proteína (Figura 13).

A partir desses resultados, pode-se observar a influência da proteína perante a adesão do parasito às células VERO. A capacidade de adesão pelo parasito diminuiu gradativamente à medida que aumentou a concentração da proteína recombinante purificada, quando comparado com os controles da reação. Este fato pode ser explicado pela competição ocorrida entre a proteína NTPDase 1 do parasito e a proteína recombinante pelo mesmo sítio receptor. Desse modo, ao adicionarmos maiores concentrações da proteína recombinante, maior a possibilidade desta interagir com o receptor presente na células hospedeira e portanto, menor a capacidade de adesão dos parasitos às células VERO. Indicando assim, a presença de sítios ligantes na célula hospedeira que estariam sendo parcialmente bloqueados pelas proteínas recombinantes. A especificidade desta ligação é demonstrada pela ausência de efeito inibidor quando o ensaio foi realizado na presença de uma proteína não relacionada (albumina).

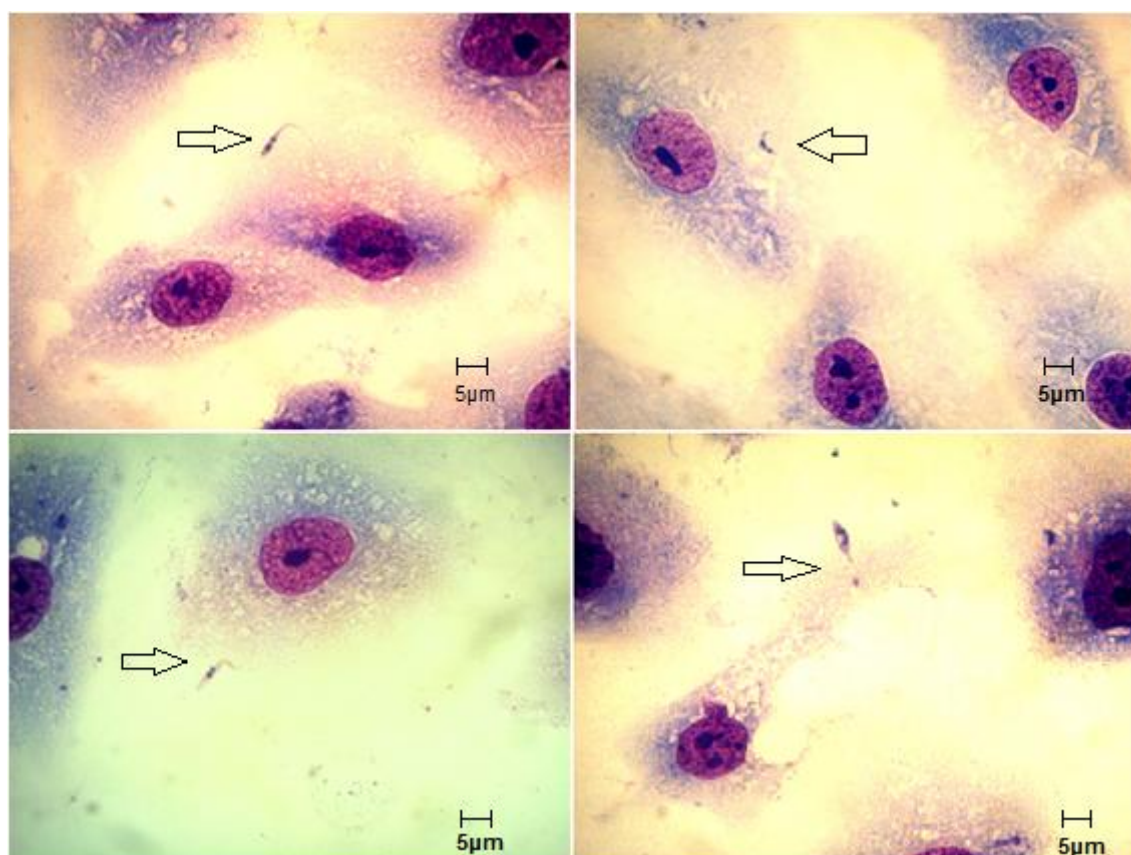


Figura 12. Imagens do *T. cruzi* aderido a célula VERO após lavagem da lamínula e coloração pelo método de GIEMSA a lento. Imagens obtidas por contraste de fase em aumento de 100x.

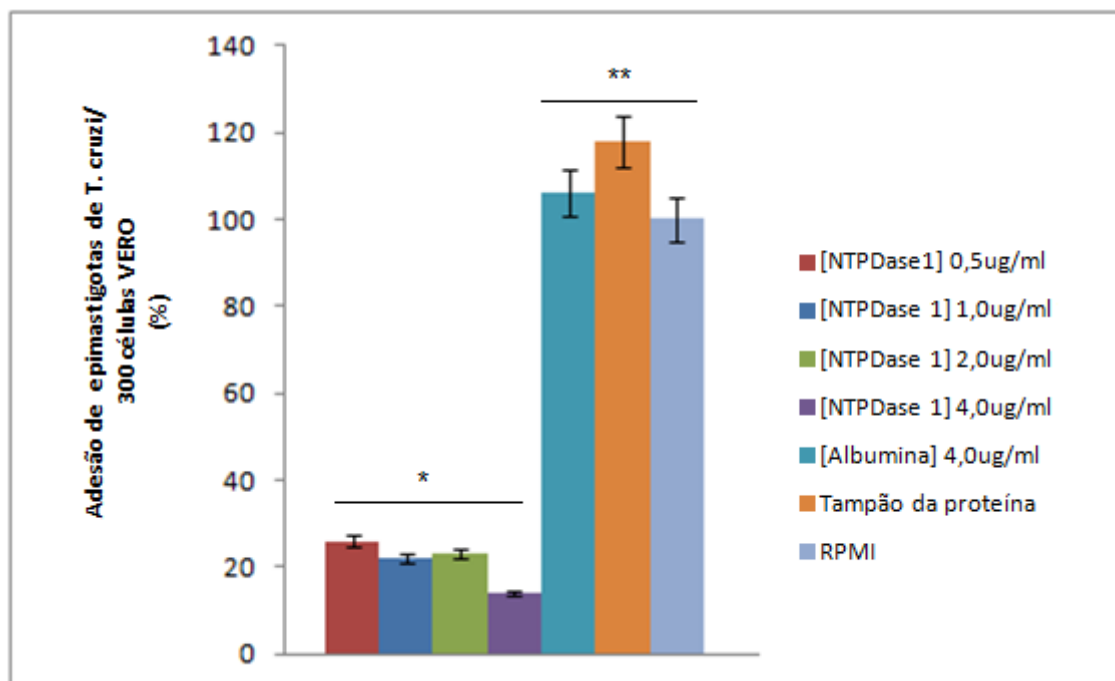


Figura 13: Ensaio de adesão com epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) e células VERO utilizando diferentes concentrações de NTPDase 1 e os controles da reação: Albumina, Tampão da proteína, e o meio de cultura RPMI. Os dados são relativos a média de três experimentos independentes.

5.6 Avaliação do índice de adesão na presença do anticorpo anti-NTPDase 1 de *T. cruzi*

Também foram realizados ensaios de inibição da adesão celular na presença de anticorpos anti-NTPDase-1 purificados.

Ao colocar as células VERO em contato com o parasito previamente incubado com o anticorpo policlonal purificado anti NTPDase 1, observa-se uma considerável diminuição na mobilidade dos parasitos tratados com os anticorpos (dados não mostrados) e uma significativa diminuição na adesão dos parasitos às células VERO, em comparação com os controles. Considerando 100% de adesão para o controle negativo composto apenas de células VERO e parasito, houve 39,41% de adesão na presença do anticorpo anti NTPDase 1 (na concentração 1:100), frente a 104,70% de adesão na presença de um anticorpo não relacionado (Figura 14). O efeito dos anticorpos anti-NTPDase-1 foi específico e independente da porção conservada de IgG pois o controle utilizando o anticorpo não relacionado (anti IgG) não diferiu significativamente do controle sem anticorpos.

Estes resultados indicam uma participação efetiva da NTPDase-1 de *T. cruzi* no processo de adesão celular em células VERO. Para justificar tal hipótese, poderíamos supor três diferentes mecanismos. Um deles seria que os anticorpos estariam se ligando a regiões moduladoras da enzima, impedindo assim, a resposta da mesma a certos estímulos. O segundo seria de que a ligação do anticorpo poderia estar gerando um impedimento estérico na superfície do parasito, dificultando assim, a adesão às células hospedeiras. Uma terceira hipótese seria supor uma possível interação sinérgica entre enzima e receptor, onde o bloqueio deste pelo anticorpo anti-NTPDase-1 de *T. cruzi* seria também capaz de inibir o processo de infecção.

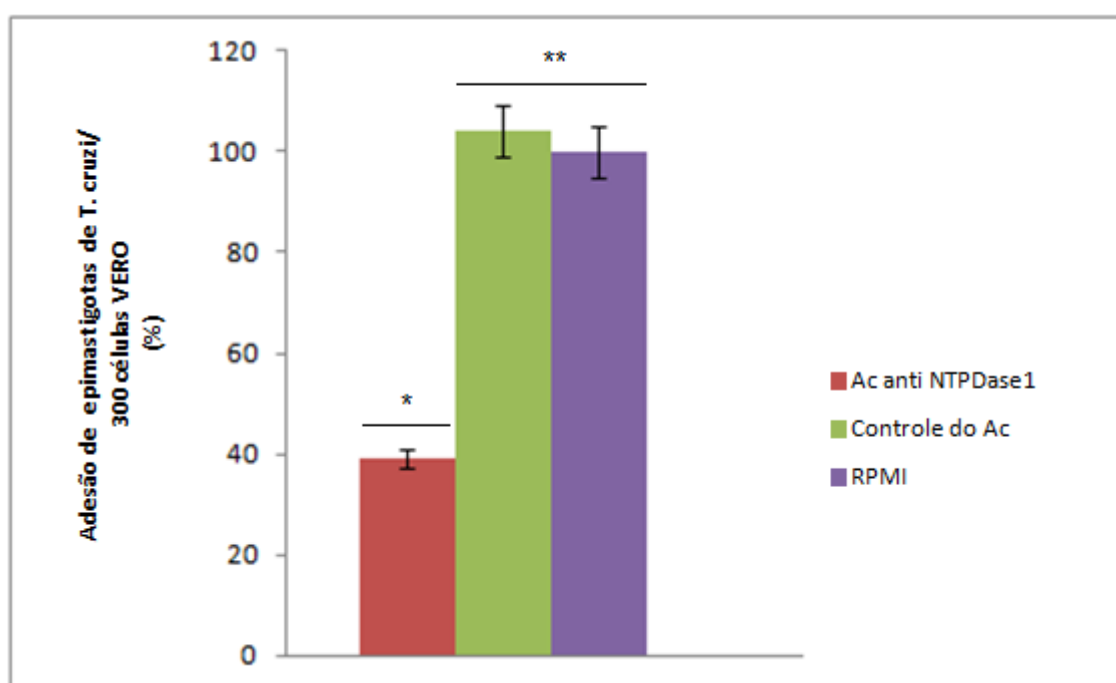


Gráfico 03: Ensaio de adesão com epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) e células VERO utilizando o anticorpo policlonal purificado anti- NTPDase 1 na diluição de 1:100, e os controles da reação: Anticorpo anti-IgG de cão, e o meio de cultura RPMI. Os dados são relativos a média de três experimentos independentes.

5.7 Expressão da proteína NTPDase 1 de acordo com a curva de crescimento do parasito

A fim de verificar a expressão da proteína NTPDase 1 de acordo com as diferentes fases de crescimento do parasito, realizou-se um ensaio de “western blot” em extrato total de epimastigotas, crescidos em meio de Grace. A análise realizada

por SDS-PAGE mostra a presença de inúmeras bandas referente ao extrato de epimastigotas de *T. cruzi* (Figura 15A). A revelação por “western blot” utilizando o anticorpo anti NTPDase 1 purificado possibilitou a imunodeteção de apenas duas bandas, em todos os dias da curva analisados: dia 5 (fase lag), 10 (fase log), 14 (fase estacionária) e 21(declínio/morte), conforme figura 12B.

Essas duas bandas são menores do que a proteína predita completa ou sem o peptídio sinal (96 e 66 kDa, respectivamente) pois têm cerca de 25 e 45 kDa no dia 5 e 45 e 47 kDa nos demais dias da curva. Estes dados sugerem que em epimastigotas a NTPdase-1 se encontra proteolizada , informação até então nova. Se esta proteólise é controlada pelo parasito ou se ocorreu devido a alguma falha dos inibidores de protease usados no extrato protéico ainda é preciso investigar. Outra possibilidade seria a de que estes parasitos expressam uma proteína homóloga a NTPDase 1 porém com massa molecular menor, podendo haver variações da massa molecular por adição de modificações pós-traducionais como glicosilação que é predita inclusive para a NTPDase 1 (dados não mostrados). Corroborando com esta hipótese, Fietto et al., mostraram a presença de uma banda de aproximadamente 50 kDa imunoprecipitada em extrato de epimastigota de *T. cruzi* usando anticorpo policlonal anti NTPDase 1 de *T. gondii*. Cunha (2010) mostrou que extratos de epimastigotas podem expressar proteína reconhecida pelo anti-NTPDase 1 com massa molecular aproximada de 70 kDa e uma banda menor, também reconhecida por anti-CD39 comercial, com cerca de 45 kDa. Além disto, Fietto e colaboradores (2004) evidenciam a presença de dois genes codificantes de NTPDases em *T. brucei* e diferentes espécies de *Leishmania*, sendo que as massas moleculares das proteínas deduzidas são compatíveis com a NTPDase 1 (cerca de 70 kDa) e com uma segunda isoforma menor denominada NTPDase 2 (com cerca de 45 kDa).

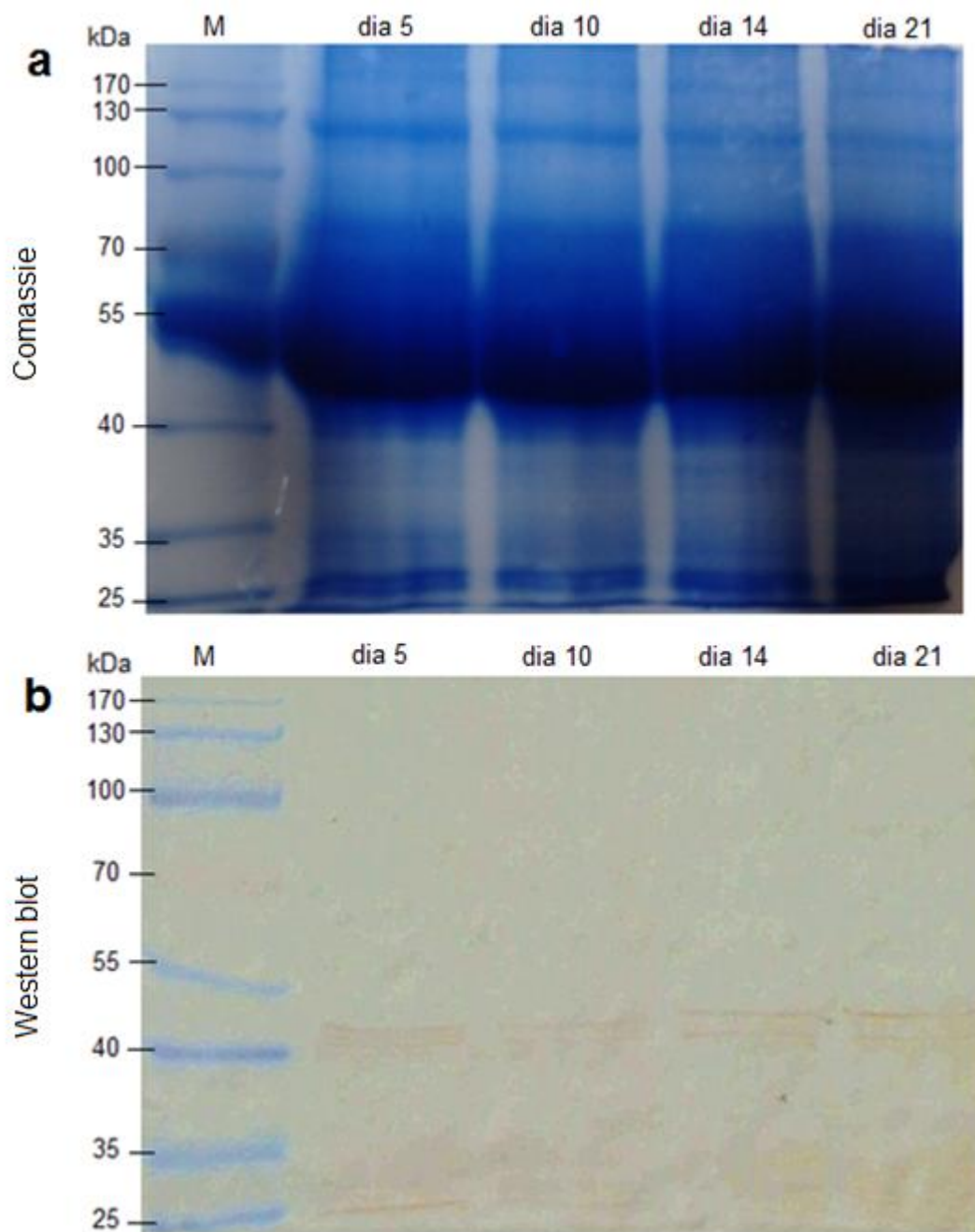


Figura 15. Expressão da proteína NTPDase 1 de acordo com a curva de crescimento do parasito. Amostra de 100 μ L foi aplicada em cada canaleta, o que corresponde a $5,0 \times 10^7$ parasitos. **a** - SDS-PAGE: o gel corado com Azul de Coomassie. **b** - "Western blot": o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose e incubado com anticorpo policlonal não purificado na concentração de 1:1000. A revelação foi realizada por peroxidase. M: Marcador de massa molecular (PageRuler™ Prestained Protein Ladder – Thermo Scientific); dias 5, dia 10, dia 14 e dia 21, correspondem aos respectivos dias da curva de crescimento do parasito.

5.8 Imunolocalização da NTPDase 1 em epimastigotas por microscopia confocal

Para o estudo da imunolocalização da NTPDase 1 em epimastigotas, foram utilizadas 3 alíquotas de uma mesma amostra de parasitos, sendo uma sem permeabilização e as outras com permeabilização com triton X 0,3% ou com acetona a -20°C.

A razão para isto se deve ao fato desses compostos agirem diferentemente sobre a membrana celular dos parasitos, permitindo, assim, nos indicar a localização da proteína de interesse, a NTPDase 1 de *T. cruzi*.

Na primeira alíquota que não houve permeabilização, pode-se avaliar a marcação externa, uma vez que a membrana permanece íntegra. Na segunda alíquota, o uso do detergente triton X 0,3% é responsável por solubilizar os lipídeos da membrana e, conseqüentemente, remover as proteínas ancoradas externamente, marcando aquelas transmembranas e as intracelulares. Já o uso da acetona, na terceira alíquota, ocasiona a precipitação das proteínas, fortalecendo a marcação das mesmas.

Na alíquota em que não houve a permeabilização da membrana dos parasitos, as epimastigotas apresentaram marcações verdes (referente ao anticorpo conjugado ao fluóforo Alexa 488) espalhadas pela região mediana do corpo e algumas marcações mais intensas e pontuais próximas a região de inserção do flagelo (Figura 16a). Para as alíquotas permeabilizadas com acetona, observou-se uma marcação mais pronunciada, também espalhada pela região central do parasito (Figura 16b). Os controles não exibiram marcação (não representado).

Nos ensaios com epimastigotas permeabilizados com triton-X observou-se uma marcação verde referente à enzima mais pontual e em maior concentração na região central do parasito (Figura 17a), indicando serem os corpos vesiculares.

Para esta última condição de ensaio, a marcação dupla foi realizada utilizando o anticorpo policlonal purificado anti-NTPDase 1 na diluição de 1: 50, juntamente com a anti- α -tubulina, que resulta na marcação vermelha (referente ao anticorpo conjugado ao fluóforo Alexa594). A marcação vermelha referente a tubulina (Figura 17 c) sugere a presença da NTPDase 1 parcialmente co-localizada com a tubulina, especialmente na região central do corpo do parasito e próximo a região de inserção flagelar (região rica em α - tubulina).

A análise conjunta desses resultados indica um dos papéis da NTPDase 1 de *T. cruzi* na aquisição de nucleosídeos e purina, uma vez que a região da bolsa flagelar é a principal região envolvida nas atividades endocíticas e exocíticas em epimastigotas (Figura 17 d).

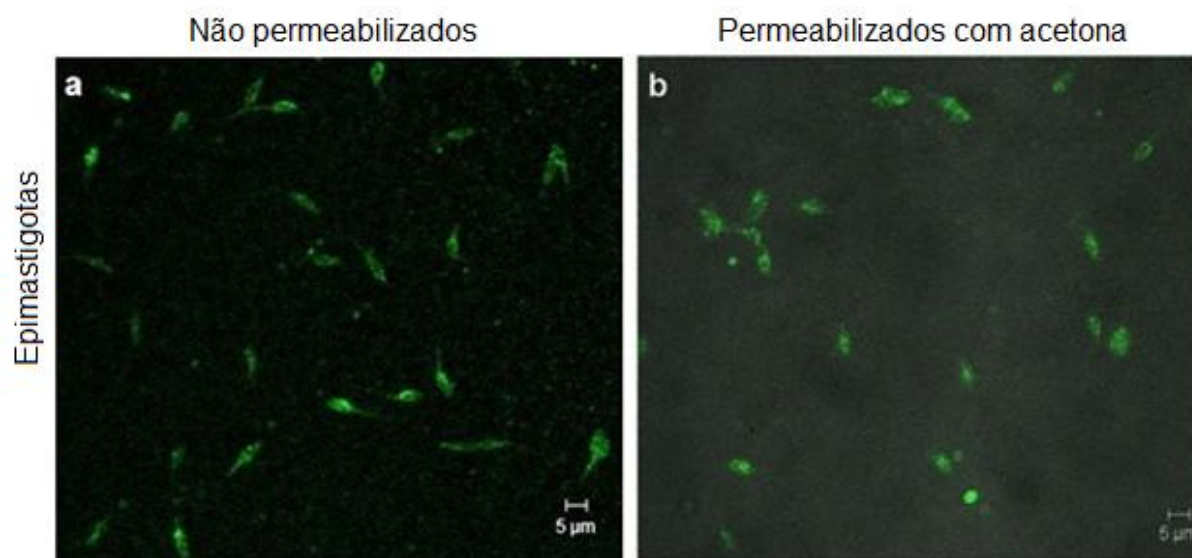


Figura 16. Distribuição da NTPDase 1 de epimastigotas de *T. cruzi* (cepaY), pela técnica de Microscopia confocal. Marcação em parasitos não permeabilizados (a) e em parasitos permeabilizados com acetona (b), utilizando anticorpo anti- NTPDase 1 (1:50) conjugado a Alexa 488 (verde).

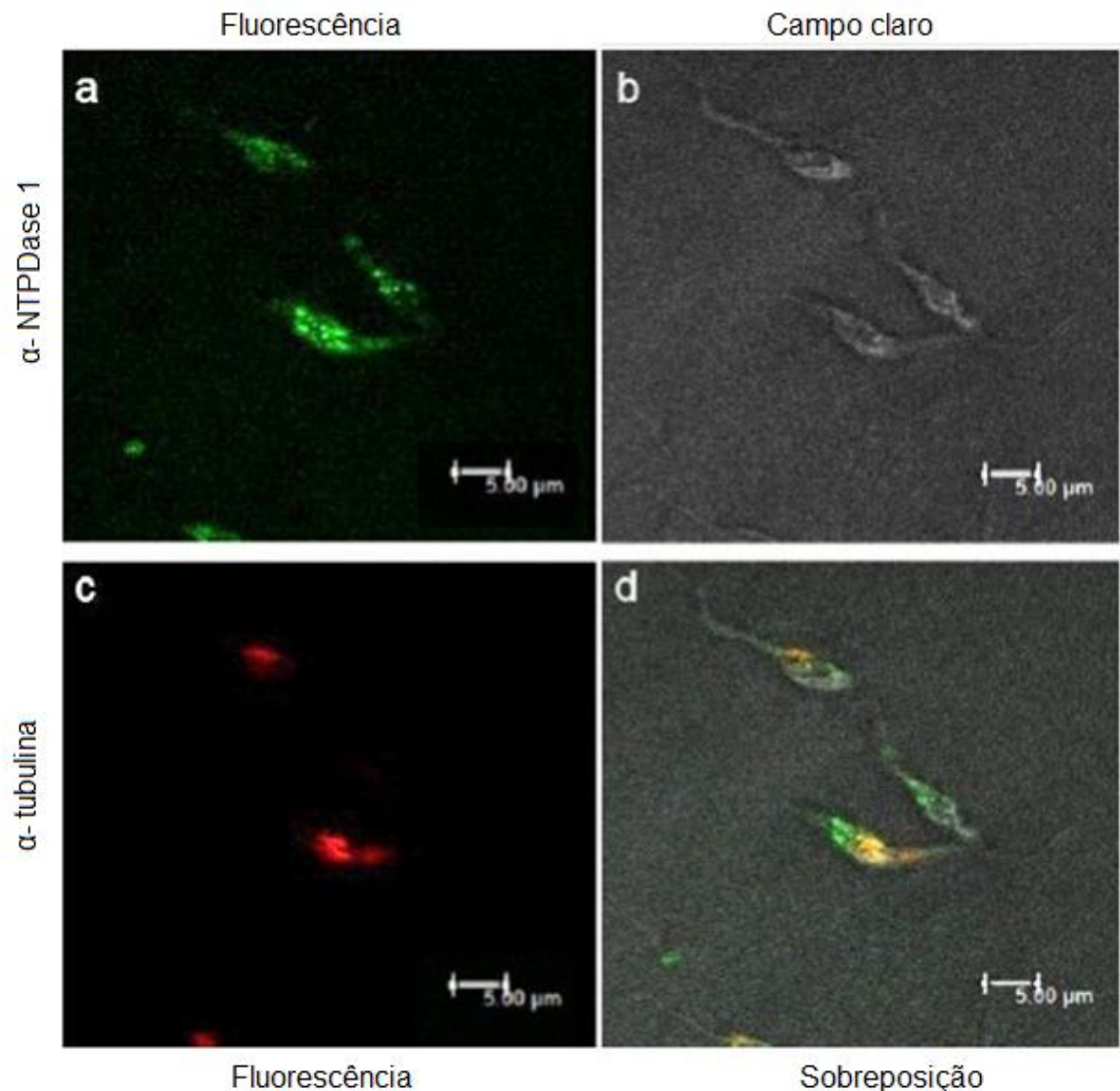


Figura 17. Distribuição da NTPDase 1 de epimastigotas de *T. cruzi* (cepaY), pela técnica de Microscopia confocal. Marcação em parasitos permeabilizados com triton X, utilizando marcação dupla com anticorpo anti- NTPDase 1 (1:50) e anti- α - tubulina (1:200) marcados com Alexa 488 (verde) e Alexa 594 (vermelho) respectivamente. Fluorescência Alexa (a, c); campo claro (b) e sobreposição (d).

5.9 Imunolocalização da NTPDase 1 em epimastigotas por Microscopia Eletrônica

A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada pela técnica de *Immunogold* pós inclusão, com partículas de ouro coloidal de 15nm em epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*.

Nestas análises ultraestruturais da localização subcelular da NTPDase 1, podem- se observar marcações distribuídas em diversas regiões da célula, encontrando algumas marcações pontuais na membrana celular (Figura 18 – cabeça de seta branca: membrana externa; cabeça de seta preta: membrana interna), como

esperado. Porém na técnica usada (marcação pós-inclusão), os cortes das membranas não ficam íntegros, sendo portanto mais difícil observar a presença de esferas de ouro em regiões de membrana. Para facilitar este tipo de visualização, deve ser realizada, futuramente, uma marcação pré-inclusão.

Várias marcações foram visualizadas em regiões próximas ao flagelo, bolsa flagelar, zona de adesão do flagelo e vesículas semelhantes a reservossomos, corroborando os resultados obtidos por microscopia confocal. Nenhuma marcação foi observada no controle (dados não mostrados).

É interessante ressaltar que a região de bolsa flagelar, uma invaginação da membrana plasmática de onde emerge o flagelo, é um importante sítio de endocitose e exocitose. Esta estrutura está presente somente em epimastigotas e suas membranas levam a uma abertura para passagem de macromoléculas que serão internalizadas e depois fundidas aos reservossomos. Estes, são descritos como corpos multivesiculares responsáveis pelo armazenamento de proteínas e lipídeos ingeridos, bem como de proteínas secretórias sintetizadas pelo parasito. Complementando, é importante ressaltar, aqui, que a NTPDase 1 de *T. cruzi* possui um peptídeo sinal no domínio amino terminal, podendo, portanto, ser secretada (Fietto et al., 2004)

Estes resultados reforçam mais uma vez que a NTPDase1 pode estar envolvida na aquisição de nutrientes pelas epimastigotas, sendo de suma importância para o parasito uma vez que esta forma replicativa possui alto nível metabólico e necessita de purina e seus derivados para a replicação do DNA e transcrição do RNA.

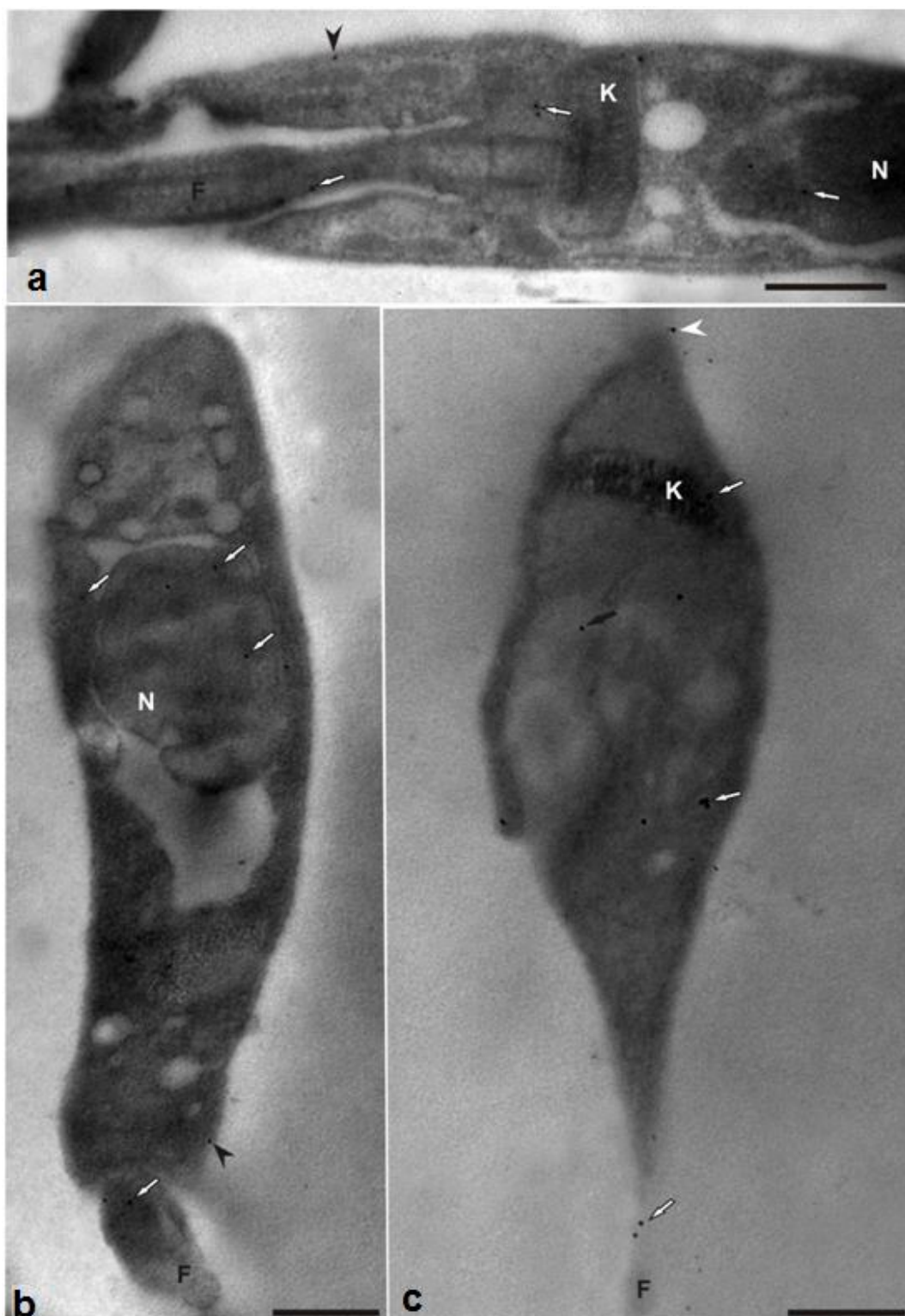


Figura 18. Eletromicrografias (1,2,3) mostrando a localização subcelular da NTPDase1 em formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y), usando um anticorpo policlonal anti-NTPDase 1 e um anticorpo secundário conjugado a ouro coloidal de 10 nm. Formas epimastigotas mostrando imunolocalização no núcleo (N) (setas), cinetoplasto (K) (seta), vesículas internas (seta preta), flagelo (F) (setas), na região de inserção do flagelo (setas) e na superfície celular externa (cabeça de seta branca) e interna (cabeça de seta preta). Nenhuma marcação foi observada no controle (dados não mostrados). Núcleo (N), Cinetoplasto (K), Flagelo (F). Barras: 1 e 3 = 0,3 μ m; 2 = 0,5 μ m.

6. CONCLUSÕES

Após análise dos resultados apresentados neste trabalho, podemos sugerir que a NTPDase 1 possui uma participação efetiva no processo de adesão celular em epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* pela ligação de sítios de reconhecimento específicos. Além disso, as imagens obtidas por microscopia confocal e imunoeletrônica revelam novos aspectos da localização subcelular da proteína pelo uso de anticorpos específicos.

Sendo assim, este trabalho apresenta mais uma razão para se apostar na NTPDase 1 como um bom alvo no desenvolvimento de novas drogas para a prevenção/ tratamento da Doença de Chagas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G. (1994). "Purinoreceptors: are there families of P2X and P2Y purinoreceptors?" **Pharmacol. Ther.** v. 64, p: 445-475, 1994.

ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G. "Purinergic signaling: pathophysiological process." **The Japanese Journal Pharmacology**. v. 78, p. 113-145, 1998.

ABUIN, G.; COLLI, W.; 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, p. 229-237, 1989.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. "Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells." **The Journal of Experimental Medicine**. v. 200, p. 1135-1143, 2004.

ASAI, T.; MIURA, S.; ET AL. "Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*." **J. Biol. Chem.** v. 270, p. 11391-11397, 1995.

BARROS, F. S.; DE MENEZES, L. F.; ET AL. "Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in *Entamoeba histolytica*." **Arch. Biochem. Biophys.** v. 375, p. 304-314, 2000.

- BERMUDES, D.; PECK, K. R.; ET AL. "Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*." **J. Biol. Chem.** v. 269, p. 29252-29260, 1994.
- BERREDO-PINHO, M.; PERES-SAMPAIO, C. E.; ET AL. "A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence." **Arch. Biochem. Biophys.** v. 391, p. 16-24, 2001.
- BIGONNESSE, F.; ET AL. "Cloning and Characterization of mouse Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-8." **Biochemistry.** v. 43, p. 5511-5519, 2004.
- BISAGGIO, D. F.; PERES-SAMPAIO, C. E.; 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, p. 273-282, 2003.
- BOCK, M.; GÖNNERT, R. "The effects of Nifurtimox on *Trypanosoma cruzi* in tissue cultures" **Arzneimittel-Forschung.** v. 22, p. 1582–1586, 1972.
- BOURS, M. J.; SWENNEN, E. L.; ET AL. "Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation." **Pharmacol. Ther.** v. 112, p. 358-404, 2006.
- BRENER, Z. "A new aspect of *Trypanosoma cruzi* life-cycle in the invertebrate host." **Jornal Protozool.** v. 19(1), p. 23-27, 1972.

- BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. "The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells." **Annu. Rev. Microbiol.** v. 49, p. 175-200, 1995.
- BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. "Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*." **Curr. Opin. Microbiol.** v. 1, p. 461-465, 1998.
- BURLEIGH, B. A.; WOOLSEY, A. M. "Cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion." **Cellular Microbiology** v. 4, p. 701-711, 2002.
- BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. "Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems." **Int. Rev. Cytol.** v. 240, p. 31-304, 2004.
- BURNSTOCK, G. "Potential therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signaling." **Clinical Medicine.** v. 2, p. 45-53, 2002.
- CARLIER, Y. T. "Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control." **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 36, p. 767-771, 2003.
- CARVALHO, T. U.; DE SOUZA, W. "Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*." **Rev. Inst. Med. Trop.** v. 28, p. 205-212, 1986.
- CUNHA, L. C. S. "Imunolocalização da Nucleosídeo Difosfato Trifosfo Hidrolase 1 (NTPDase-1) de *Trypanosoma cruzi*", 2010. Dissertação (Mestrado em

Biologia Celular e Estrutural) – Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

COHN, C. S.; GOTTLIEB, M. "The acquisition of purines by trypanosomatids." **Parasitol. Today**. v. 13, p. 231-235, 1997.

COLLI, W. "Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*." **FASEB J**. v. 7, p. 1257-1264, 1993.

COURA, J. R. "Chagas disease: what is known and what is needed – A background article". **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 102, p. 113-122, 2007.

DE SOUZA, W.; SANT'ANNA, C.; CUNHA-E-SILVA, N. "Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa." **Prog. Histochem. Cytochem**. v. 44, p. 67-124, 2009.

DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA, E.; DE OLIVEIRA, J. C.; ET AL. "Extracellular nucleotide metabolism in Leishmania: influence of adenosine in the establishment of infection." **Microbes Infect**. v. 10, p. 850-857, 2008.

DE SOUZA LEITE, M.; THOMAZ, R.; ET AL. "*Trypanosoma brucei brucei*: biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities." **Exp. Parasitol**. v. 115, p. 315-23, 2007.

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

DE SOUZA, W.; CARREIRO, I. P.; ET AL. "Two special organelles found in *Trypanosoma cruzi*." **An. Acad. Bras. Cienc.** v. 72, p. 421-432, 2000.

DIAS, J. C. P. "Epidemiological surveillance of Chagas disease." **Cad. Saúde Pública.** v. 16, p. 43-59.

DIAZ DE TORANZO, E. G.; CASTRO, J. A.; FRANKE DE CAZZULO, B. M.; CAZZULO, J.J. "Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*." **Experimentia** v. 44, p. 880-881, 1988.

DOMBROWSKI, K. E.; KE, Y.; ET AL. "Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function." **Immunol. Rev.** v. 161, p. 111-118, 1998.

DO CAMPO, R.; MORENO, S. N. J. "Free radical metabolism of antiparasitic agents." **Fed Proceed.** v. 45, p. 2471-2476, 1986.

EL KOUNI, M. H. "Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites." **Pharmacol. Ther.** v. 99, p. 283-309, 2003.

FIETTO, J. L.; DEMARCO, R.; ET AL. "Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*." **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 316, p. 454-460, 2004.

GARCIA, E.; GONZALEZ, M.; AZAMBUJA, P. "Biological factors involving *Trypanosoma cruzi* life cycle in the invertebrate vector, *Rhodnius prolixus*." **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 94, p. 213-216, 1999.

GOUNARIS, K.; SELKIRK, M. "Parasite nucleotide – metabolizing enzymes and host purinergic signaling." **Trends in Parasitology.** v. 21, p. 17-21, 2005.

GUEDES, P. M.; URBINA, J. A.; ET AL. "Activity of the new triazole derivative albaconazole against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in dog hosts." **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 48, p. 4286-4292, 2004.

HANDA, M.; GUIDOTTI, G. "Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*)."
Biochem. Biophys. Res. Commun. v. 218, p. 916-923, 1996.

HERWALDT, B. L. "Leishmaniasis." **Lancet.** v. 354, p. 1191-1199, 1999.

HIGUCHI, M. L. "Chagas disease: Importance of the parasite in pathogenesis of the cardiac chronic disease." **Arg. Bras. Cardiol.** v. 64, p. 251-254, 1995.

HYDE, T. P.; DVORAK, J. A. "*Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. 2. Quantitative analysis of the penetration phase." **Exp. Parasitol.** v. 34, p. 284-294, 1973.

IVANENKOV, V. V.; MURPHY-PIEDMONTE, D. M.; ET AL. "Bacterial expression, characterization, and disulfide bond determination of soluble human NTPDase6 (CD39L2) nucleotidase: implications for structure and function." **Biochemistry.** v. 42, p. 11726-11735, 2003.

JACOBSON, K. A.; JARVIS, M. F.; ET AL. "Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets." **J. Med. Chem.** v. 45, p. 4057-4093, 2002.

JESUS, J. B.; LOPES, A. H.; ET AL. "Characterization of an ecto-ATPase of *Trichomonas foetus*." **Vet. Parasitol.** v. 103, p. 29-42, 2002.

JIJON, H. B.; WALKER, J.; ET AL. "Adenosine is a negative regulator of NF-kappaB and MAPK signaling in human intestinal epithelial cells." **Cell Immunol.** v. 237, p. 86-95, 2005.

KHAKH, B. S.; BURNSTOCK, G.; ET AL. "International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits." **Pharmacol. Rev.** v. 53, p. 107-118, 2001.

KOIZUMI, S.; FUJISHITA, K.; INOUE, K.; SHIGEMOTO-MORGAMI, Y.; TSUDA, M.; INOUE, K. "Ca²⁺ waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons: the

- involvement of extracellular ATP and P2Y2 receptor activation." **Biochem. J.** v. 380, p. 329-338, 2004.
- KOLIEN, A. H.; SCHAUB, G. A. "The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae." **Parasitology Today.** v. 16, p. 381-387, 2000.
- LALIBERTE, J. F.; BEAUDOIN, A. R. "Sequential hydrolysis of the gamma- and beta-phosphate groups of ATP by the ATP diphosphohydrolase from pig pancreas." **Biochim. Biophys. Acta.** v. 742, p. 9-15, 1983.
- LANGSTON, H. P.; KE, Y.; 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, p. 2962-2970, 2003.
- LEAL, D. B. R.; STRECHER, C. A.; ET AL. "Caracterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.15) activity in human lymphocytes." **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 1721, p. 9-15, 2005.
- LEY, V.; ROBBINS, E. S.; ET AL. "The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments." **J. Exp. Med.** v. 171, p. 401-413, 1990.
- MAIOLI, T. U.; TAKANE, E.; ET AL. (2004). "Immune response induced by New World Leishmania species in C57BL/6 mice." **Parasitol. Res.** 94(3): 207-12.

Marques-da-Silva, E. A.; Oliveira, J. C.; Figueiredo, A. B.; Júnior, D. S. L.; Carneiro, C. M.; Fietto, J. L. R.; Crocco Afonso, L. C. "Extracellular nucleotide metabolism in leishmania: influence of adenosine in the establishment of infection." **Microbes and Infection**. v. 10, p. 850-857, 2008.

MARTIN, E. D.; FERNANDEZ, M.; PERES, G.; PASCUAL, O.; HAYDON, P. G.; ARAQUE, A.; CENA, V. "Adenosine released by astrocytes contributes to hypoxia-induced modulation of synaptic transmission." **Glia**. v. 55, p. 36-45, 2007.

MARTÍNEZ, L. F.; DUEÑAS, C. M.; RODEA, G. B.; CALVILLO, S. M.; CELA, R. M. "Cellular analysis of host cell infection by different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*." **Experimental Parasitology**. v. 126, p. 332–336, 2010.

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA- VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. "Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host." **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part A, v. 146, p. 601-620, 2007.

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, p. 175-184, 1992.

MEYER-FERNANDES, J. R.; DUTRA, P. M; ET AL. "Mg-dependent ecto-ATPase activity in *Leishmania tropica*." **Arch. Biochem. Biophys.** v. 341, p. 40-46, 1997.

- MILES, M. A.; FELICIANGELI, M. D.; DE ARIAS, A. R. "American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies." **BMJ.**, v. 326, p. 1444-1448, 2003.
- MURPHY-PIEDMONTE, D. M.; CRAWFORD, P. A.; ET AL. "Bacterial expression, folding, purification and characterization of soluble NTPDase5 (CD39L4) ecto-nucleotidase." **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1747, p. 251-259, 2005.
- NAJIB, M.; EL-SAYED; ET AL. "The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas' Disease". **Science.** v. 309, p. 409-415, 2005.
- NAKAAR, V.; BECKERS, C. J.; ET AL. "Basis for substrate specificity of the *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase." **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 97, p. 209-220, 1998.
- NEMETH, Z. H.; LUTZ, C. S.; ET AL. "Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism." **J. Immunol.** v. 175, p. 8260-8270, 2005.
- NORTH, R. A. "Molecular physiology of P2X receptors." **Physiol. Rev.** v. 82, p. 1013-1067, 2002.
- NOVAK, I. "ATP as a signaling molecule: the exocrine focus." **News Physiol. Sci.** v.18, p. 12-17, 2003.

ORTEGA-BARRIA, E.; PEREIRA, M. E. "A novel *T. cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells." **Cell**. v. 67, p. 411-421, 1991.

OUAISSI, M. A.; TAIBI, A.; ET AL. "Characterization of major surface and excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of potential protective antigen." **Parasitology**. v. 100, p. 115-24, 1990.

PARSONS, M. "Glycosomes: parasites and the divergence of peroximal purpose." **Mol. Microbiol**. v. 53, p. 717-724, 2004.

PÉRCORA, I.L.; DOS REIS, G. A.; BARCINSKI, M. A.; DORIGO, D. D. "Frequency distribution of *Trypanosoma cruzi* in macrophages from resistant and susceptible strains of mice." **Experientia**. v. 36, p. 942-944, 1980.

PINHEIRO, C. M.; MARTINS-DUARTE, E. S.; ET AL. "*Leishmania amazonensis*: Biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities." **Exp. Parasitol**. v. 114, p. 16-25, 2006.

POLAK, A.; RICHLE, R. "Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative benznidazole." **Ann. Trop. Med. Parasitol**. v. 72, p. 45-54, 1978.

RODRIGUEZ, A.; SAMOFF, E.; RIOULT, M.G.; CHUNG, A.; ANDREWS, N.W. "Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/ kinesin-mediated transport." **J. Cell Biol**. v. 134, p. 349-362, 1996.

SANSOM, F. M.; NEWTON, H. J.; ET AL. "A bacterial ecto-triphosphate diphosphohydrolase similar to human CD39 is essential for intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*." **Cell Microbiol.** v.9, p.1922-1935, 2007.

SANSOM, F. M.; ROBSON, S. C.; ET AL. "Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions." **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 72, p. 765-781, 2008.

SANTOS, R. F.; POSSA, M. A.; ET AL. "Influence of Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence." **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 3, p. 387, 2009.

SCHARFSTEIN, J.; SCHMITZ, V.; ET AL. "Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors." **J. Exp. Med.** v. 192, p. 1289-1300, 2000.

SCHENKMAN, S.; DIAZ, C.; ET AL. "Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains." **Exp. Parasitol.** v 72, p. 76-86, 1991.

SCHENKMAN, S.; EICHINGER, D. "*Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion." **Parasitol. Today.** v. 9, p. 218-222, 1993.

SCHENKMAN, S.; EICHINGER, D.; ET AL. "Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase." **Annu. Rev. Microbiol.** v. 48, p. 499-523, 1994.

SCHENKMAN, S.; JIANG, M. S.; 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, p. 1117-1125, 1991.

SCHENKMAN, S.; ROBBINS, E. S.; 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, p. 645-654, 1991.

SCHICKER, K.; HUSSL, S.; ET AL. "A membrane network of receptors and enzymes for adenine nucleotides and nucleosides." **Biochim. Biophys. Acta**. v.1793, p. 325-334, 2009.

SILVERMAN, J. A.; QI, H.; 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, p. 12352-12359, 1998.

SOARES, M. J.; DE SOUZA, W. "Ultrastructural visualization of lipids in trypanosomatids." **J. Protozool.** v. 34, p. 199-203, 1987.

SOEIRO M. N.; SILVA-FILHO F. C.; MEIRELLES M. N. "The nature of anionic sites and the endocytic pathway in heart muscle cells." **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.** v. 26, p. 121-130, 1994.

SOMERS, G. R.; HAMMET, F. M.; ET AL. "Expression of the P2Y6 purinergic receptor in human T cells infiltrating inflammatory bowel disease." **Lab. Invest.** v. 78, p. 1375-1383, 1998.

SOUTO-PADRON, T.; CAMPETELLA, O. E.; ET AL. "Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction." **J. Cell Sci.** v. 96, p. 485-490, 1990.

Tanowitz, H. B.; Kirchhoff, L. V.; Simon, D.; Morris, S. A.; Weiss, L. M.; Wittner, M. "Chagas' disease." **Clin. Microbiol.** v. 4, p.400–419, 1992.

TASCA, T.; BONAN, C. D.; DE CARLI, G. A.; SARKIS, J. J. "*Trichomonas vaginalis*: cytochemical localization of a NTPDase I and an ecto-5'-nucleotidase and effects of adenine nucleotides on cellular viability." **Parasitology Research.** v. 93, p. 300-303, 2004.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; CREPALDI, P. H.; DE SOUZA, W. "**Atlas didático ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.**" Rio de Janeiro: Fundação Cecierj, 2011.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. "The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited." **International Journal for Parasitology.** v. 31, p. 472-481, 2001.

VASCONCELOS, E. G.; FERREIRA, S. T.; ET AL. "Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma*

mansoni. Immunological cross-reactivities with potato apyrase and *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase." **J. Biol. Chem.** v. 271, p. 22139-22145, 1996.

VIEIRA, M. C.; DE CARVALHO, M. U.; ET AL. "Effect of protein kinase inhibitors on the invasion process of macrophages by *Trypanosoma cruzi*." **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 203, p. 967-971, 1994.

WARNY, M.; ABOUDOLA, S.; ET AL. "P2Y(6) nucleotide receptor mediates monocyte interleukin-8 production in response to UDP or lipopolysaccharide." **J. Biol. Chem.** v. 276, p. 26051-25056, 2001.

WERNER APT B.; INÉS ZULANTAY A. "Estado actual en el tratamiento de la enfermedad de Chagas." **Rev. Med. Chile.** v. 139, p. 247-257, 2011.

WHO. (2012). **Chagas disease (American trypanosomiasis)**, 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>>. Acesso em 11 de agosto de 2012.

WOOLSEY, A. M.; SUNWOO, L.; PETERSEN, C. A.; BRACHMANN, S. M.; CANTLEY, L. C.; BURLEIGH, B. A. "Novel PI-3-Kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation." **J. Cell Sci.** v.116, p. 3611-3622, 2003.

- YEGUTKIN, G. G. "Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade." **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1783, p. 673-694, 2008.
- YOSHIDA, N.; BLANCO, S. A; ET AL. "The stage-specific 90-kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*." **Mol Biochem Parasitol.** v. 39, p. 39-46, 1990.
- YOSHIDA, N.; FAVORETO, S.; ET AL. "Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells." **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 33, p. 269-278, 2000.
- YOSHIDA, N. "Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*." **Annals of the Brazilian Academy of Sciences.** v. 78, p. 87-111, 2005.
- ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. "Characterization of rat NTPDase 1, -2, and -3 ectodomains refolded from bacterial inclusion bodies." **Biochemistry.** v. 46, p. 11945-11956, 2007.
- ZELEDON, R. "Some morphological and molecular aspects of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector." **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 94, p. 217-218, 1999.
- ZIMMERMAN, H. "Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature." **Drug rev. Res.** v. 52, p. 44-56, 2001.

ZIMMERMANN, H. "Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides." **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** v. 362, p. 299-309, 2000.

ZIMMERMANN, H. AND N. BRAUN. "Extracellular metabolism of nucleotides in the nervous system." **J. Auton. Pharmacol.** v. 16, p. 397-400, 1996.