

MYRIAN AUGUSTA ARAUJO NEVES DO VALLE

**ATIVIDADE ECTONUCLEOTIDÁSICA E LOCALIZAÇÃO
CELULAR DAS NTPDases NOS TRIPANOSOMATÍDEOS
Trypanosoma cruzi E *Leishmania tarentolae***

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T
V181a
2015

Valle, Myrian Augusta Araujo Neves do, 1981-
Atividade ectonucleotídica e localização celular das
NTPDases nos tripanosomatídeos *Trypanosoma cruzi* e
Leishmania tarentolae / Myrian Augusta Araujo Neves do Valle.
– Viçosa, MG, 2015.
xii, 90f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.
Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.78-89.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. *Leishmania*. 3. Microscopia.
4. Protozoário. 5. Células - Metabolismo. 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

MYRIAN AUGUSTA ARAUJO NEVES DO VALLE

**ATIVIDADE ECTONUCLEOTIDÁSICA E LOCALIZAÇÃO
CELULAR DAS NTPDases NOS TRIPANOSOMATÍDEOS
Trypanosoma cruzi E *Leishmania tarentolae***

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 09 de setembro de 2015.

Cláudia Vânia Miranda de Oliveira

Maria Terezinha Bahia

Virginia Ramos Pizziolo

Silvia Almeida Cardoso

Juliana Lopes Rangel Fietto
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de todas as coisas, e, a todas as formas de auxílio que me vieram dos céus, derramando sobre mim inúmeras bênçãos, possibilitando-me alcançar objetivos propostos, e, ajudando-me a tornar-me uma pessoa mais forte e melhor durante esta caminhada.

À professora Juliana Lopes Rangel Fietto, exemplo de profissional competente e ético; compreensiva, amiga e solidária. Agradeço pela confiança e ensinamentos nestes anos de enobrecedora convivência. Obrigada pelas oportunidades e, por contribuir na minha formação tanto intelectual, quanto pessoal.

À minha família pelo incentivo, apoio, amor e carinho. Aos meus pais Affonso e Catarina, dignos exemplos de simplicidade, caridade, abnegação e determinação, pela proteção, amor incondicional, sempre acreditando na minha capacidade, apoiando-me na realização dos sonhos e alcance dos ideais, desde os primeiros passos da minha vida, e também, por cuidarem desveladamente da nossa família. Aos queridos irmãos Luiz, e Ismael agradeço pelo apoio, amor, carinho, bem como, por se preocuparem com minha felicidade.

Especialmente ao meu marido Alex, pelo amor, carinho, companheirismo e amizade e, pela colaboração contínua e eficiente, tanto como, pelo incentivo e sustentação constantes; pelo equilíbrio e paz que me envolvem, tornando meus dias mais felizes; e ainda, por não medir esforços e sacrifícios, viajando mais de 1.000km, a cada final de semana, para estarmos juntos. Também por ter acreditado no meu potencial, ajudando-me a chegar vitoriosa ao final desta etapa. Sou reconhecida pelo seu jeito de lidar com os momentos adversos, sendo tal enobrecimento um dos motivos que não me deixaram desistir nas horas difíceis.

Às cunhadas Michelle, Sandra e Roberta; ao cunhado Alessandro; às sobrinhas Lara e Yasmim, e, à minha sogra Dona Zilka, por todo carinho, compreensão e, momentos de alegria que nos proporcionamos mutuamente...

À Claudinha por sua amizade, carinho, companheirismo e colaboração, assim como, pelas manifestações de apoio e esperança, ainda que tão distante geograficamente.

Aos amigos, funcionários e professores dos laboratórios de Infectologia Molecular Animal, Proteômica e Bioquímica Celular e Bioprodutos; em especial ao técnico Waldir e ao professor Gustavo Bressan.

Aos alunos e ao professor Luciano, do Laboratório de Biotecnologia Molecular, por possibilitar-me a utilização de equipamentos e reagentes.

A todos os amigos e funcionários do Departamento de Veterinária, especialmente às amigas Nívea, Andréa, Hanna e ao professor Abelardo.

Ao Laboratório de Controle de Hematozoários, disponibilizando-me equipamentos e reagentes, em especial ao Márcio Mendes, pela amizade e colaboração.

Aos amigos e funcionários do Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM), Karla, Gilmar e Carlota pela compreensão, nos momentos em que foi necessária à minha ausência para dedicar-me à finalização dos estudos do doutorado; além dos momentos de descontração e boa convivência diária. À amiga Helen, agregada do NMM, pela colaboração, amizade, incentivo e amparo psicológico.

A todos os amigos por alegrarem minha vida!

À professora Terezinha Bahia (UFOP), por receber-me em seu laboratório com carinho e consideração, além de ceder-me as cepas estudadas neste trabalho. Em especial à Lívia Diniz por passar-me um pouco da sua vasta experiência com cultivo de *T. cruzi*, e assim também, à Ludmila, Ana Luiza, Álvaro, Karol e Maycon.

À Universidade federal de viçosa, pela responsabilidade e respeito no trato com seus alunos. Ao programa de Biologia Celular e estrutural, e, de forma especial à secretária Beth; ao coordenador do programa e do NMM, professor José Eduardo Serrão, por sua compreensão e tolerância.

À cidade de Viçosa, minha rua, e meus vizinhos, pelo acolhimento amoroso, fraterno, humano e espiritual.

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

Aos participantes da Banca Examinadora: Dra. Maria Terezinha Bahia (UFOP); Dra. Sílvia Almeida Cardoso (UFV); Dra. Virgínia Ramos Pizziolo (UFV); Dra. Cláudia Vânia Miranda de Oliveira (IFAL); Dra. Lívia Diniz (UNIFAL) e, Dr. Luciano Gomes Fietto (UFV).

Agradeço a todos que, de formas variadas, colaboraram para a conquista de mais uma expressiva vitória, nesta trajetória inesquecível da minha vida!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 Introdução	1
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> e seu ciclo de vida	1
1.2 Tratamento da doença de Chagas e diversidade genética de <i>T. cruzi</i>	4
1.3 O processo de infecção por <i>T. cruzi</i>	5
1.4 O papel das E-NTPDases de tripanosomatídeos	6
1.5 Leishmaniose	12
2 Objetivos	15
2.1 Capítulo 1: Avaliação da atividade ectonucleotidásica e localização celular da NTPDase-1 de <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
2.2 Capítulo 2: Avaliação da atividade ectonucleotidásica e localização celular das NTPDases de <i>Leishmania tarentolae</i>	15
3. Capítulo 1:.....	16
Avaliação da atividade ectonucleotidásica e localização celular da NTPDase-1 em diferentes cepas e clones de <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
3.1 Material e métodos.....	17
3.1.1 Parasitos.....	17
3.1.2 Cultivo de epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	18
3.1.3 Cultivo de células VERO	18
3.1.4 Curvas de crescimento.....	18
3.1.5 Caracterização Bioquímica da NTPDase-1 de <i>T. cruzi</i>	19
3.1.6 Caracterização da expressão da NTPDase-1 de <i>T. cruzi</i>	20
3.1.7 Expressão e purificação da NTPDase-1 de <i>T. cruzi</i> para ensaios de competição	21
3.1.8 Ensaio de adesão de epimastigotas em células VERO.....	21
3.1.9 Análise estatística dos dados.....	23
3.2 Resultados e discussão.....	24
3.2.1 Curva de crescimento de epimastigotas	24
3.2.2 Caracterização da atividade ectonucleotidásica em diferentes cepas/clones de <i>T. cruzi</i>	26
3.2.3 Imunolocalização da NTPDase-1 por microscopia eletrônica transmissão ..	29

3.2.4 Papel da E-NTPDásica <i>in vivo</i> em relação à adesão e infecção em células VERO	40
3.2.5 Efeito do meio de cultura na atividade ectonucleotidásica e localização subcelular da NTPDase-1	42
3.2.6 Comparação da atividade ectonucleotidásica de <i>T. cruzi</i> entre os meios LIT e Grace's à 28 e 37°C	43
3.2.7 Efeito do choque térmico na atividade ectonucleotidásica dos parasitos cultivados em meio LIT e Grace's 20% SFB	46
3.2.8 Participação da NTPDase-1 na atividade ectonucleotidásica em diferentes meios de cultura e sob choque térmico	49
3.2.9 Imunolocalização da NTPDase-1 da cepa Colombiana de <i>T. cruzi</i>	54
3.2.10 Participação da NTPDase-1 da cepa Colombiana de <i>T. cruzi</i> na adesão a célula hospedeira	59
4. Capítulo 2:	62
Avaliação da atividade ectonucleotidásica e localização celular de e-NTPDases em <i>Leishmania tarentolae</i>	62
4.2 Material e Métodos	63
4.2.1 Cultivo de macrófagos	63
4.2.2 Cultivo de <i>Leishmania tarentolae</i>	63
4.2.3 Imunolocalização da E-NTPDase de <i>L. tarentolae</i> por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	63
4.2.4 Imunolocalização da E-NTPDase de <i>L. tarentolae</i> por microscopia confocal	64
4.2.5 Caracterização Bioquímica da NTPDase de <i>Leishmania tarentolae</i>	65
4.2.6 Expressão e purificação da LicNTPDase-2 de <i>Leishmania infantum chagasi</i> para ensaios de competição	66
4.2.7 Papel da LicNTPDase-2 recombinante na adesão <i>in vitro</i> de <i>Leishmania tarentolae</i> em macrófagos RAW 264.7	66
4.3 Resultados e discussão	68
5 Conclusões Gerais	75
Referências	78
Anexo I	90

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	3
Figura 2: Topologia de membrana e propriedades catalíticas das diferentes famílias de ecto-nucleotidases.....	8
Figura 3: Árvores filogenéticas das E-NTPDases de mamíferos, Tripanosomatídeos (<i>Leishmania</i> e <i>T. cruzi</i>), <i>Mus musculus</i> (mm); <i>Homo sapiens</i> (HS).....	10
Figura 4: A análise filogenética realizada por Inferência Bayesiana com base nas sequências de 29 aminoácidos das proteínas NTPDases de tripanossomatídeos (TpNTPDase).....	11
Figura 5: Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania</i>	13
Figura 6: Curva de crescimento das cepas e clones deste estudo.....	24
Figura 7: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão mostrando localização celular da E-NTPDase-1 em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> (cepa Colombiana).....	30
Figura 8: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão mostrando localização celular da E-NTPDase-1 em em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> (cepa Colombiana).....	31
Figura 9: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão mostrando localização celular da E-NTPDase-1 em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> (clone CL-Brener).....	33
Figura 10: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão mostrando localização celular da E-NTPDase-1 em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> (clone CL-Brener).....	34
Figura 11: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão mostrando localização celular da E-NTPDase-1 em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> (clone CL-Brener).....	35
Figura 12: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão mostrando localização celular da E-NTPDase-1 em epimastigotas de fase estacionária de <i>T. cruzi</i> (cepa Berenice 62).....	36
Figura 13: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão de epimastigotas de fase estacionária de <i>T. cruzi</i> (cepa Berenice-62). Controle.....	37
Figura 14: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão de epimastigotas de fase estacionária de <i>T. cruzi</i> (clone CL-14).....	38

Figura 15: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão epimastigotas de fase estacionária de <i>T. cruzi</i> (clone CL-14). Controle.....	39
Figura 16: Avaliação do papel da NTPDase-1 de <i>T. cruzi</i> na adesão celular á célula hospedeira.....	41
Figura 17: Curva de crescimento de epimastigotas da cepa Colombiana em três meios diferentes.....	43
Figura 18: Comparação da atividade ectonucleotidásica de <i>T. cruzi</i> entre o meio LIT e o meio Grace' a 28°C nas fases exponencial e estacionária.....	44
Figura 19: Comparação da atividade ectonucleotidásica de <i>T. cruzi</i> entre o meio LIT e o meio Grace' a 37°C nas fases exponencial e estacionária.....	44
Figura 20: Atividade ectonucleotidásica de <i>T. cruzi</i> em meio LIT sem e com choque térmico e nas fases exponencial e estacionária.....	46
Figura 21: Atividade ectonucleotidásica de <i>T. cruzi</i> em meio Grace's 20% (SFB) sem e com choque térmico e nas fases exponencial e estacionária.....	48
Figura 22: Porcentagem relativa de inibição da atividade NTPDase-1 de <i>T. cruzi</i> em meio LIT sem e com choque térmico e nas fases exponencial e estacionária, na presença de 1 mM de suramina.....	51
Figura 23: Porcentagem relativa de inibição da atividade NTPDase-1 de <i>T. cruzi</i> em meio Grace's 20% SFB, sem e com choque térmico e nas fases exponencial e estacionária, na presença de 1 mM de suramina.....	52
Figura 24: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão mostrando localização celular da E-NTPDase-1 em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> cepa Colombiana, cultivados em meio Grace's 20% SFB, fase exponencial.....	55
Figura 25: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão em epimastigotas da cepa Colombiana de <i>T. cruzi</i> , cultivados em meio Grace's 20% SFB, fase exponencial, sem choque térmico. Controle.....	56
Figura 26: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão mostrando localização celular da E-NTPDase-1 em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> cepa Colombiana, cultivados em meio Grace's 20% SFB, fase exponencial, submetidos a choque térmico de 2 horas a 37°C.....	57
Figura 27: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão de epimastigotas da cepa Colombiana de <i>T. cruzi</i> , cultivados em meio Grace's 20% SFB, fase exponencial, submetidos a choque térmico de 2 horas a 37°C. Controle.....	58
Figura 28: Ensaio de adesão na presença ou ausência de anticorpos policlonais anti-TcNTPDase-1.....	61
Figura 29: Visualização da distribuição das NTPDases em promastigotas por microscopia confocal.....	68

Figura 30: Análise ultra-estrutural da localização subcelular das NTPDases em promastigotas de <i>Leishmania tarentolae</i>	70
Figura 31: Avaliação do papel da NTPDase-2 de <i>Leishmania infantum chagasi</i> (LicNTPDase-2) na adesão celular a célula hospedeira.....	72
Figura 32: Atividade ectonucleotidásica de <i>Leishmania tarentolae</i>	73
Figura 33: Porcentagem relativa de inibição da atividade das E-NTPDases de <i>Leishmania tarentolae</i>	74
Tabela 1: Características das cepas utilizadas no estudo.....	17
Tabela 2: Dia de crescimento relacionado à fase log e estacionária da curva crescimento de cada cepa ou clone, nos quais os parasitos foram obtidos para realização dos ensaios.....	25
Tabela 3: Medida de atividade ectonucleotidásica de <i>Trypanosoma cruzi</i> em formas epimastigotas.....	28
Tabela 4: Atividade relativa NTPDase-1 da cepa Colombiana de <i>T. cruzi</i> em presença de 1mM de suramina.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ACRs: “Apyrase Conserved Regions”: Regiões Conservadas de Apyrase

ATP: Adenosina 5' Trifosfato

ADP: Adenosina 5' Difosfato

AMP: Adenosina 5' Monofosfato

Bz: Benznidazol

BSA: Albumina do soro bovino

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DTUs: Discret Typing Units

DMSO: Dimetil Sulfóxido

DO: Densidade óptica

EDTA: Ácido etilenodietilanolamínico

E-NTPDases: Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases

GDPase: Guanosine Diphosphatase

g: Unidade de força centrífuga relativa

Ig: Imunoglobulina

Ig G: Imunoglobulina G

kDa: Quilodalton

LIT: Liver infusion and Tryptose

LBCHV: Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores

UFV: Universidade Federal de Viçosa

LB: Meio de cultura Luria-Bertani broth

Nfx: Nifutimox

NTPDase: Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

PM: Peso Molecular

pb: Pares de bases

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

PBS: Tampão fosfato salino

q.s.p.: Quantidade suficiente para

RPMI: Roswell Park Memorial Institute-meio de cultura

SFB: Soro Fetal Bovino

WHO: World Health Organization

RESUMO

VALLE, Myrian Augusta Araujo Neves do Valle, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2015. **Atividade ectonucleotídica e localização celular das NTPDases nos tripanosomatídeos *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania tarentolae***. Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto. Coorientadores: Abelardo Silva Junior, Gustavo Costa Bressan e Márcia Rogéria de Almeida Lamego.

Dentre as moléculas utilizadas pelos tripanosomatídeos para invadir a célula hospedeira estão as E-NTPDases, que são enzimas capazes de hidrolisar nucleotídeos tri e/ou difosfatados nos seus produtos monofosfatados. As propostas do presente trabalho foram avaliar a atividade ectonucleotídica e a localização celular da NTPDase-1 nas cepas Berenice-62, Colombiana e nos clones CL-Brener e CL-14 de *T. cruzi* e das NTPDases em *L. tarentolae*, bem como a capacidade dessas enzimas em participar do processo de adesão. Além disto, avaliar o efeito da fase de crescimento, meio de cultura e choque térmico sobre a atividade e localização NTPDase-1 na cepa Colombiana. Os resultados deste trabalho mostraram de forma geral as atividades na fase logarítmica maiores que na fase estacionária. A NTPDase-1 participa da adesão dos parasitos da cepa Y. Pelas análises ultraestruturais da localização subcelular da NTPDase-1 foi possível observar marcações distribuídas em diversas regiões da célula. Quando se analisou a influência do meio de cultivo e choque térmico na atividade ectonucleotídica de *T. cruzi* observou-se maior hidrólise dos nucleotídeos em meio Grace's 20% SFB sem choque térmico, na fase exponencial. O choque térmico em meio LIT mostrou-se mais eficaz quando comparado à temperatura de 28°C e ao meio Grace's 20% SFB. A inibição por suramina mostrou um perfil bem variado. A NTPDase-1 da cepa Colombiana participa da adesão celular. Em *L. tarentolae* os resultados confirmaram por microscopia eletrônica e confocal a presença das NTPDases em diversas organelas e na superfície celular, e mostraram uma preferência pela hidrólise de ATP tanto em formas procíclicas como metacíclicas. As NTPDases foram também parcialmente inibidas na presença de suramina. Além de participarem da adesão celular de *L. tarentolae* em macrófagos. Este trabalho mostrou a importância das E-NTPdases em tripanosomatídeos mesmo em espécie não patogênica para humanos.

ABSTRACT

VALLE, Myrian Augusta Araujo Neves, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2015. **Ectonucleotidase activity and cellular localization of NTPDases in tripanosomatids *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania***. Adviser: Juliana Lopes Rangel Fietto. Co-advisers: Abelardo Silva Junior, Gustavo Costa Bressan e Marcia Rogéria Lamego de Almeida.

Among the molecules used by trypanosomatids to invade the host cell are the E-NTPDase, enzymes capable of hydrolyze nucleotides tri and/or difosfatados in its monofosfatados products. . For this reason, the actual work aimed to assess the ectonucleotidase activity and cellular localization of NTPDase-1 in both strains Berenice-62 and Colombian and in both clones CL-Brener and CL-14 of *T. cruzi*; besides, the ectonucleotidase activity and cellular localization of NTPDases in *L. tarentolae*, as well to investigate the role of these enzymes in the adhesion process. Furthermore, the effects of growth stage, growth medium and heat shock in the activity and localization of NTPDase-1 in the Colombian strain were also evaluated. The results have showed, in general, a higher activity in the logarithmic phase than in the stationary phase. The NTPDase-1 participates cellular adhesion of the parasites of the Y strain. Through ultrastructural analyses of subcellular localization of NTPDase-1 was possible to observe markings distributed on several regions of the cell. Besides, when analyzing the influence of growth medium and heat shock in ectonucleotidase activity of *T.cruzi*, the nucleotide hydrolyses increased in Grace's medium 20% without heat shock and exponential phase. The heat shock seemed to be more effective in comparison to the 28°C heat shock in LIT medium. Inhibition by suramin displayed a well diverse profile. Thus, electronic and confocal microscopies confirmed the presence of NTPDases in diverse organelles as well in the cellular surface of *Leishmania tarentolae*, in addition to the preference for ATP hydrolyses in both procyclic and metacyclic forms of this parasite. Subsequently, the NTPDases were partially inhibited by suramin. Finally, was possible to confirm the involvement of NTPDases in macrophage adhesion process in *L. tarentolae*. These data suggest that E-NTPDases may be important proteins to the infection process of tripanosomatids including nonpathogenic species to humans.

1 Introdução

1.1 *Trypanosoma cruzi* e seu ciclo de vida

A *Trypanosoma cruzi* foi detectado em múmias andinas datando de 4000 antes de cristo (A.C.), começou a se expandir no final do século XIX, e atingiu seu pico na primeira metade do século XX (MONCAYO, 2003). Em 1909, Carlos Chagas, pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), comunicou ao mundo científico a descoberta de uma nova doença humana. No ano anterior, Chagas já havia sido capaz de identificar seu agente causal, o protozoário que denominou de *Trypanosoma cruzi*, em homenagem a Oswaldo Cruz, e o inseto transmissor, conhecido como barbeiro (CHAGAS, 1909). Na história da medicina essa foi a única “tripla descoberta” e constitui um marco na história da ciência e da saúde. Com mais de 100 anos de descoberta a doença de Chagas continua sendo um grave problema de saúde pública, mesmo com tantos esforços utilizados na redução de sua incidência (HUEB, 2006).

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (2015), estima-se que existam 7 a 8 milhões de pessoas infectadas principalmente na América Latina, onde é endêmica em mais de 21 países. Coura e Viñas (2010) destacam a ameaça representada pela disseminação de *T. cruzi* para diversas regiões do mundo, como América do Norte, Europa e oeste do Oceano Pacífico, devido ao fluxo de migração populacional. Além de representar um risco para a saúde pública mundial, revela a urgência da intensificação dos esforços no sentido de ampliar a informação e a vigilância sobre a doença, bem como o diagnóstico e tratamento da doença.

A infecção é transmitida por insetos hematófagos da subfamília Triatominae, o *Triatoma infestans* foi considerado o principal vetor no Brasil. O Brasil é considerado livre desta via de infecção pela Organização Pan-Americana da Saúde. Torna-se importante enfatizar, no entanto, que tal certificação não representa o controle efetivo da doença no Brasil. A certificação representa somente a eliminação (interrupção momentânea) da transmissão da doença especificamente pelo triatomíneo da espécie *T. infestans* e por transfusão sanguínea. Diferentemente da erradicação, que representa a interrupção definitiva da transmissão mesmo na ausência de qualquer ação de

controle, a eliminação pressupõe a manutenção de alguma ação de controle e vigilância para que a interrupção se mantenha (FERREIRA e SILVA, 2006).

O ciclo de vida natural de *T. cruzi* (Figura 1), ocorre em hospedeiros vertebrados e invertebrados. Os triatomíneos vetores se infectam ao ingerir formas tripomastigotas, presentes na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado durante o hematofagismo. Os tripomastigotas possuem cinetoplasto localizado posterior ao núcleo e flagelo que emerge da extremidade posterior e percorre todo o corpo celular do organismo, formando a membrana ondulante. No estômago do inseto eles se transformam em formas epimastigotas. Os epimastigotas são formas alongadas ou fusiformes com flagelo emergente para o meio extracelular formando uma curta membrana ondulante, com o cinetoplasto localizado próximo e anterior a organela nuclear. Estes são encontrados no intestino médio e posterior dos hospedeiros invertebrados onde se multiplicam ativamente por fissão binária. Na porção terminal do tubo digestivo dos insetos os epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas infectantes para os vertebrados e são eliminados nas fezes e urina do vetor, durante ou logo após o repasto sanguíneo. Os tripomastigotas penetram no local da picada ou em mucosas e infectam células nucleadas do hospedeiro vertebrado. No interior das células dos vertebrados ocorre a transformação dos tripomastigotas em amastigotas. A multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado é realizada pelas formas amastigotas, que são formas ovóides, apresentando flagelo muito curto que não emerge para o meio extracelular e cinetoplasto localizado próximo ao núcleo. A seguir, ocorre a diferenciação dos amastigotas em tripomastigotas que são então liberados para o interstício (DE SOUZA, 2002). Os tripomastigotas caem na corrente circulatória, e infectam outras células para cumprir novo ciclo celular. É importante salientar que classicamente, somente as formas tripomastigotas e amastigotas em menor proporção, são infecciosas para os hospedeiros vertebrados (LEY *et al.*, 1990; DE CARVALHO e DE SOUZA, 1986).

Durante seu ciclo de vida, *T. cruzi* sofre adaptações profundas desencadeada por uma variedade de condições ambientais entre os hospedeiros vertebrados ou invertebrados, tais como variações de pH e temperatura. As formas epimastigota e tripomastigota metacíclica interagem com os triatomíneos a temperaturas que variam com as condições climáticas e as formas tripomastigota e amastigotas interagem com o mamífero hospedeiro, a

37 °C. Este choque térmico pode induzir uma resposta a partir do parasita, promovendo a modulação da atividade de várias proteínas dentre elas as ecto-ATPase (GIAROLA *et al.*, 2013).

Outras maneiras de se transmitir os parasitos são através da transfusão sanguínea, transmissão congênita, acidentes de laboratório, infecção oral e transplantes de órgãos. Uma outra via teoricamente possível, mas extremamente rara é a transmissão sexual (CARLIER, 2003). A transfusão sanguínea tem um importante papel na transmissão da doença de Chagas, já que testes sorológicos em bancos de sangue de áreas onde a doença é endêmica mostram de 10 a 15% de positividade e, dessa porcentagem, cerca de 10% do sangue contém parasitos infecciosos (AUFDERHEIDE *et al.*, 2004). Estas vias de transmissão não vetorial, tais como a transfusão de sangue, a transmissão congênita e o transplante de órgãos, descritas acima estão relacionadas também a globalização da doença de Chagas (COURA e VIÑA, 2010).

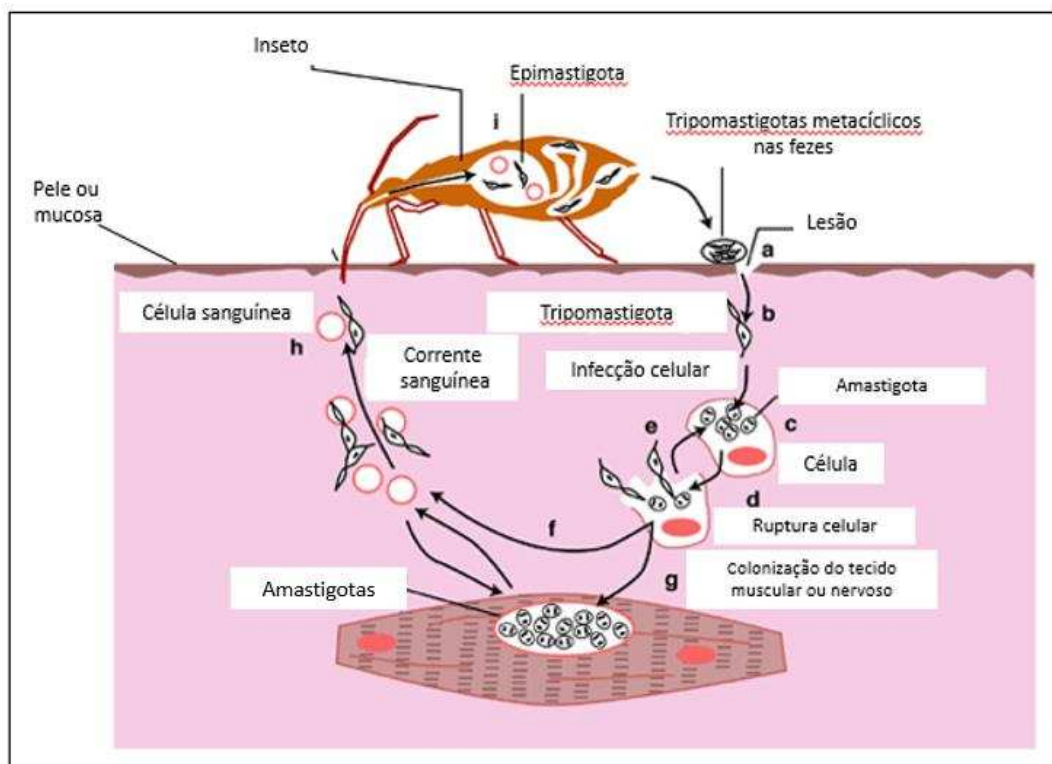


Figura 1: Ciclo de vida de *T. cruzi*. O esquema representa as formas morfológicas vistas nos hospedeiros vertebrados e invertebrados. a) lesão; b) formas tripomastigotas; c) formas amastigotas no interior da célula; d) ruptura celular; e) liberação dos tripomastigotas; f) formas tripomastigotas sanguíneas; 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 modificada).

Segundo Organização Mundial de Saúde (2015) a doença de Chagas se apresenta em duas fases. A fase inicial, aguda tem a duração de cerca de 2 meses após a infecção. Durante a fase aguda, um grande número de parasitos circula no sangue, mas na maioria dos casos, os sintomas estão ausentes ou leves. Em menos de 50% das pessoas picadas por triatomíneos infectados, os primeiros sinais visíveis podem ser chagoma de inoculação (ocular) ou sinal de romaña (cutânea), podendo haver também febre, dor de cabeça, gânglios linfáticos aumentados, palidez, dor muscular, dificuldade em respirar, inchaço e dor abdominal ou no peito. Na fase crônica, os órgãos mais afetados são coração e músculos digestivos. Até 30% dos pacientes sofrem de distúrbios cardíacos e até 10% sofrem de distúrbios digestivo (tipicamente alargamento do esófago ou do cólon), alterações neurológicas ou sintomas mistos. A infecção pode conduzir a morte súbita ou insuficiência cardíaca causada pela destruição progressiva do músculo cardíaco e do seu sistema nervoso. Isto ocorre devido a uma mudança na anatomia do miocárdio e do tubo digestivo, podendo ser observado intenso processo inflamatório com danos teciduais nem sempre relacionado com a quantidade do parasito que se encontra extremamente escasso nesta fase (ENGMAN E BONNEY, 2015). Além disso, observam-se, dentre outras alterações, acometimento do sistema nervoso, alterações neuropsicológicas nos enfermos. Verifica-se, portanto um envolvimento do SNC tanto na fase aguda, quanto na fase crônica (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2008).

1.2 Tratamento da doença de Chagas e diversidade genética de *T. cruzi*

A doença de Chagas figura como negligenciada nas intenções, principalmente, de indústrias farmacêuticas. Assim, o conhecimento produzido por pesquisas relacionadas é de grande relevância, sendo necessário maior esforço da comunidade científica e maior financiamento das pesquisas. Isto se deve ao fato das indústrias farmacêuticas não se interessarem pela maioria das doenças negligenciadas devido ao baixo custo-benefício, pois são geralmente presentes em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, atingem uma parcela menor e menos favorecida financeiramente da população quando comparadas com enfermidades crônicas e disseminadas amplamente no mundo (SOEIRO *et al.*, 2013).

O tratamento da doença de Chagas é realizado atualmente por dois quimioterápicos: Benznidazol (BZ) e Nifurtimox (NF), sendo que o tratamento é mais eficaz se iniciado na fase aguda da infecção e apresenta baixa eficácia na fase crônica da doença com apenas 20% de cura em média (COURA e BORGES-PEREIRA, 2012). Na maioria dos casos a doença é diagnosticada na fase crônica e no Brasil 97% das mortes por Doença de Chagas ocorrem nessa fase. Estas drogas apresentam vários efeitos colaterais severos que limitam seu uso na terapêutica (GUEDES *et al.*, 2006).

É importante salientar que devido a grande variabilidade genética que por sua vez se reflete em diversidade de susceptibilidade das cepas do parasito à ação das drogas ocorrem falhas terapêuticas, pois ainda não se tem conhecimento sobre alguma droga que seja eficiente contra todas as cepas (GUEDES *et al.*, 2006).

A espécie *T. cruzi* é composta por uma diversidade de cepas e clones do parasito, que por sua vez apresentam parâmetros morfológicos semelhantes, os chamados “Biodemas” (ANDRADE *et al.*, 1974; BRENER e CHARI, 1963).

Atualmente, a comunidade científica classifica a diversidade deste parasito em seis distintas DTUs (Discret Typing Units), sendo os grupos denominados *T. cruzi* I a *T. cruzi* VI. As DTUs são descritas como “conjuntos de estoques de células geneticamente mais relacionados entre si do que em relação a outros estoques e que são identificados por possuírem marcadores genéticos, moleculares ou imunológicos semelhantes”. Esta nova nomenclatura tem permitido a melhor comunicação entre os pesquisadores, com relação ao entendimento de questões de biologia básica, de características eco-epidemiológicas e de patogenicidade dos diferentes grupos genéticos. (ZINGALES *et al.*, 2009; ZINGALES, 2011).

A diversidade genética do *T. cruzi* também pode influenciar na susceptibilidade e resistência a droga durante o tratamento da doença e para se validar novos potenciais quimioterápicos é desejável que os mesmos sejam eficientes em várias DTUs do parasito (MORENO *et al.* 2010).

1.3 O processo de infecção por *T. cruzi*

O processo inicial de interação de *T. cruzi* com a célula hospedeira pode ser estudado por etapas: adesão e reconhecimento, sinalização e invasão. O

sucesso destas etapas influencia diretamente no sucesso da infecção e muitos fatores já foram descritos como importantes para o processo de infecção deste parasito (DE SOUZA, DE CARVALHO, BARIAS, 2010).

Como descrito por Burleigh e Woolsey (2002), a invasão de células de mamíferos por *T. cruzi* é crítica para sua sobrevivência no hospedeiro. Sendo a adesão uma etapa importante que pode ser claramente visualizada quando se trata células VERO com inibidores da polimerização de actina (ROSESTOLATO *et al.*, 2002).

Para invadir as células de mamíferos, os tripomastigotas utilizam distintos grupos de moléculas de superfície que interagem diferentemente com os componentes do hospedeiro. Dentre estas moléculas podemos citar: as glicoproteínas de superfície gp82, gp35/50, gp90, gp85, trans-sialidases NTPDases, entre outras (NEIRA *et al.*, 2003; GIORDANO *et al.*, 1994; FIETTO *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2009).

1.4 O papel das E-NTPDases de tripanosomatídeos

Uma nova família de proteínas de superfície importantes para a infecção tem sido estudada por nosso grupo, trata-se das E-NTPDases uma família de ecto-nucleotidases, também chamadas CD39 ou apirases. São proteínas em sua maioria transmembrânicas ou solúveis (secretadas) que têm capacidade de catalisar a hidrólise de nucleotídeos no espaço extracelular ou intracelular, dependendo do local de sua localização. Estas enzimas 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, no qual o ADP aparece como intermediário (LALIBERTE e BEAUDOIN, 1983; ZIMMERMAN, 2001).

Encontram-se caracterizados oito membros dessa família de enzimas em mamíferos, que podem apresentar baixa identidade de aminoácidos, no entanto, possuem cinco domínios de sequências altamente conservadas, denominadas “Regiões Conservadas de Apirase” (ACRs) (Figura 2). Estas regiões são de grande relevância para a atividade catalítica (HANDA e GUIDOTTI, 1996) e mutações dentro das ACRs podem levar a perda da atividade bioquímica (SCHULTE AM ESCH *et al.*, 1999). As NTPDase1, NTPDase2, NTPDase3 e

NTPDase8 de mamíferos, parecem ser essenciais no controle da sinalização de receptores purinérgicos, já que se encontram localizadas na superfície da membrana plasmática e hidrolisam nucleotídeos em uma concentração tal que são capazes de modular esses receptores (SMITH e KIRLEY, 1999; MATEO *et al.*, 1999; LAVOIE *et al.*, 2004; BIGONNESSE *et al.*, 2004). As NTPDases 1, 2, 3 e 8 apresentam dois domínios transmembrana, com o sítio ativo voltado para o meio extracelular (BIGONNESSE *et al.*, 2004). Em contraste, as NTPDases 4-7 estão ancoradas nas membranas plasmáticas através de domínio transmembrana. A NTPDases 5 e 6 estão ancoradas através de um domínio e podem sofrer proteólise e serem secretadas, as NTPDases 4 e 7 estão ancoradas por dois domínios transmembrana e seus sítios catalíticos estão voltados para o lúmen de compartimentos intracelulares, como o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático (ZIMMERMANN, 2001). Como pode ser visto na Figura 2, existe outras ecto-nucleotídates distintas da família E-NTPDase.

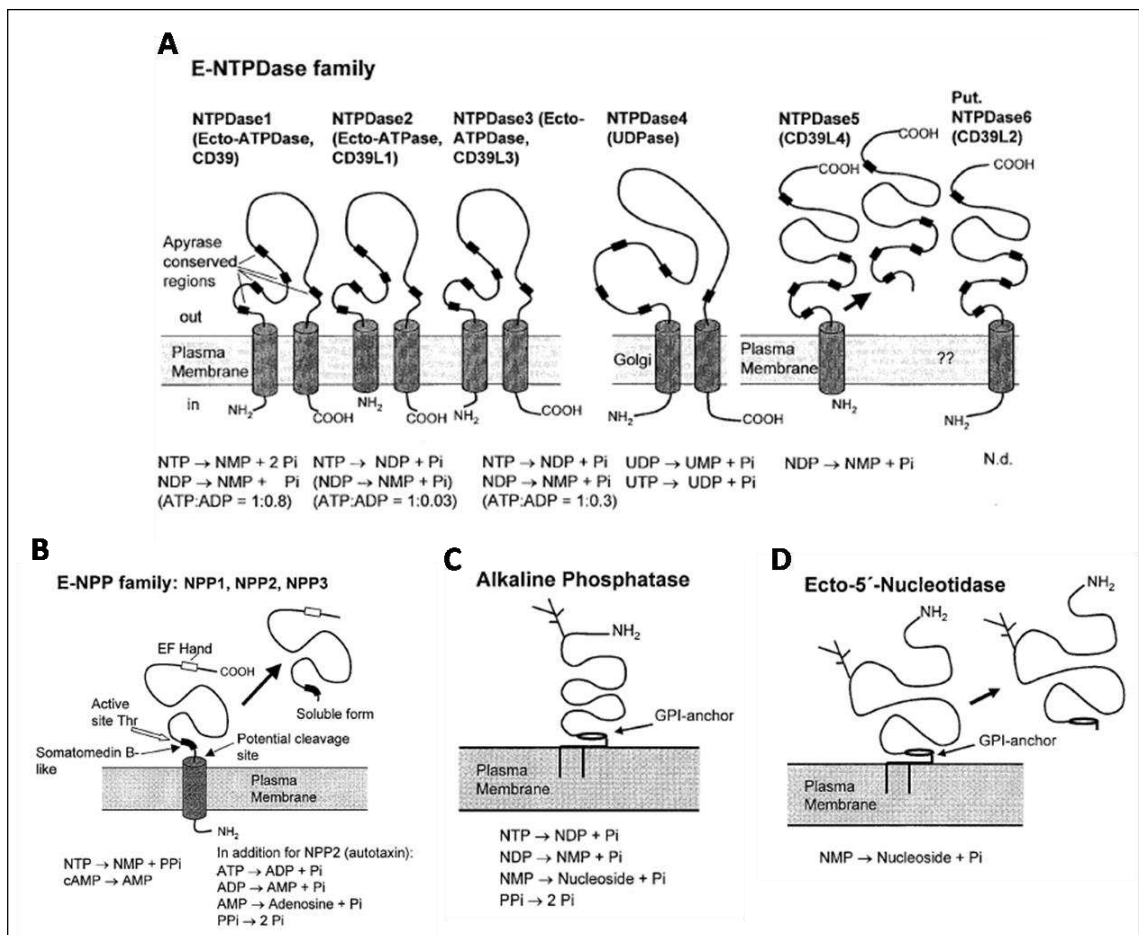


Figura 2: Topologia de membrana e propriedades catalíticas das diferentes famílias de ecto-nucleotidasas. (A) Família E-NTPDase. As enzimas podem ocorrer como homodímeros. A NTPDase 5 pode ocorrer como uma proteína solúvel (seta). Uma possível NTPDase 6 solúvel, de estrutura primária conhecida está também representada. (B) Família E-NPP. As enzimas podem ocorrer como dímeros e podem se tornar solúveis através de clivagem proteolítica, indicados por setas. (C) Família das fosfatases alcalinas. (D) Família ecto-5'-nucleotidase de mamíferos. A enzima ocorre em dímeros e pode ser liberada da membrana por uma fosfolipase endógena GPI-específica (ZIMMERMANN, 2000).

A capacidade dessas enzimas em regular a sinalização purinérgica mediada por nucleotídeos extracelulares, possibilita sua ação como molécula de virulência e facilitadora da infecção por patógenos (SANSOM *et al.*, 2008), além da sua importância em infecções causadas por patógenos tem sido também estudadas como candidatos vacinais (MANQUE *et al.*, 2011; TAN *et al.*, 2011) e como antígeno para desenvolvimento de métodos de imunodiagnósticos (DE SOUZA *et al.*, 2013).

Em se tratando dos tripanosomatídeos, estudos têm relacionado a importância do metabolismo de nucleotídeos extracelulares com o

estabelecimento da infecção pelo gênero *Leishmania* (BERREDO-PINHO *et al.*, 2001; DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2008; LEITE *et al.*, 2012) e *Trypanosoma cruzi* (FIETTO *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2009; MARIOTINI-MOURA *et al.*, 2014).

Asai *et al.* (1983) descreveram a apirase de *Toxoplasma gondii*, sendo a primeira apirase descrita em um parasita sanguíneo, como citado por Santos *et al.* (2009). Desde então esta enzima tem sido estudada e associada a processos biológicos importantes dentro do contexto das relações parasito-hospedeiro. *T. gondii*, como *T. cruzi*, é um protozoário incapaz de realizar a síntese “*de novo*” de purinas, portanto têm necessidade de captar purinas do meio externo, que neste caso é constituído do ambiente do hospedeiro (corrente sanguínea e/ou ambiente interno da célula). A via de salvação de purinas de parasitos é considerada como bom alvo para o desenho de novas drogas para doenças parasitárias (El KOUNI, 2003).

Fietto *et al.* (2004) mostraram através das análises *in silico* que existem duas NTPDases (Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase) mapeadas no genoma de *L. major* chamadas de NTPDase (isoforma menor com cerca de 47,2 kDa) e GDPase (isoforma maior com aproximadamente 73,4 kDa).

Vasconcellos *et al.* (2014), avaliaram as sequências das E-NTPDases de tripanossomatídeos (*Leishmania*, *T. cruzi*) que foram alinhadas com as sequências das E-NTPDases de mamíferos, isoformas de 1-8 de humanos, como grupo externo foi alinhada a NTPDase de *T. gondii*. Como é mostrado na figura 3, as isoformas E-NTPDases se dividem em dois grupos. Um deles inclui as E-NTPDases de mamíferos 1, 2, 3, 4, 7 e 8 e outro grupo inclui as E-NTPDases 5 e 6 e E-NTPDases representantes dos tripanossomatídeos. Devido a maior semelhança entre a NTPDase-1 de *T. cruzi* e a Guanosine difosfatase de *Leishmania*, este grupo foi designado como tripanossomatídeos NTPDase-1 (Figura 3). Todas as NTPDases-1 analisadas são preditas com cerca de ~ 70 kDa. O outro ramo, que inclui NTPDases de *Leishmania* foi nomeado como tripanossomatídeo NTPDase-2 (NTPDase-2) e inclui as proteínas preditas com cerca de ~ 40 kDa (Figura 3 e 4).

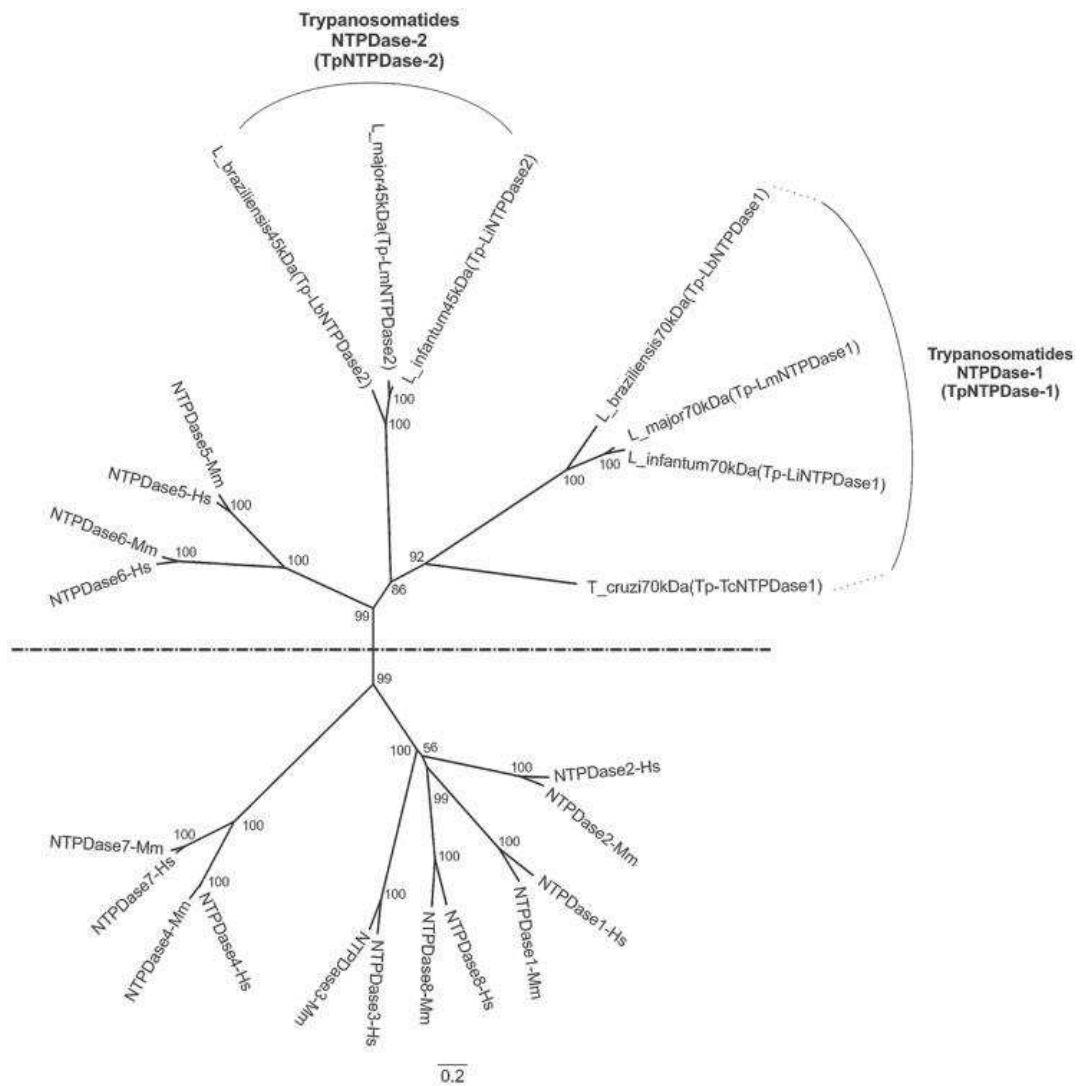


Figura 3: Árvore filogenética das E-NTPDases de mamíferos e Tripanosomatídeos (*Leishmania* e *T. cruzi*). Tripanosomatídeos tem duas E-NTPDases com exceção de *T. cruzi*, que tem apenas uma NTPDase em banco de dados. E-NTPDases tripanosomatídeos são mais semelhantes às isoformas 5 e 6 de mamíferos. *Mus musculus* (mm); *Homo sapiens* (HS). Fonte: (VASCONCELLOS *et al.*, 2014)

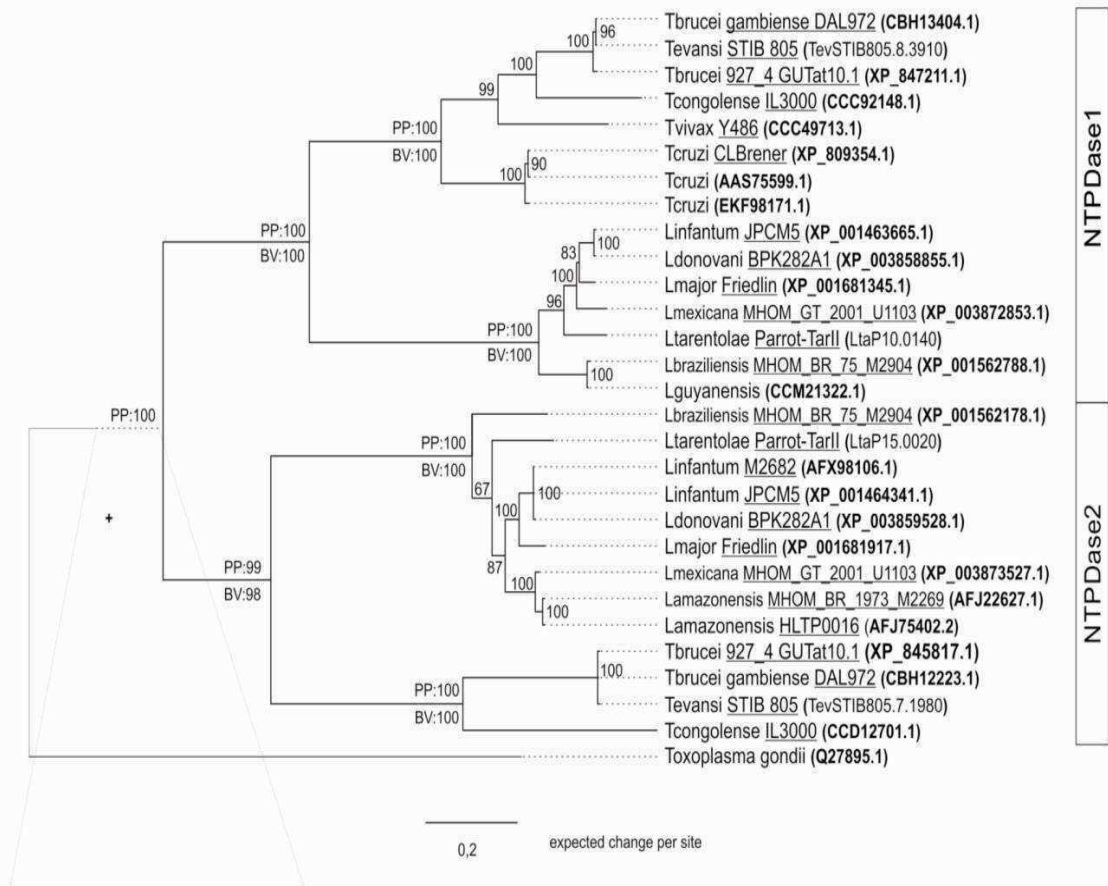


Figura 4: A análise filogenética realizada por Inferência Bayesiana com base nas seqüências de 29 proteínas NTPDases de tripanossomatídeos (TpNTPDase). Os valores de probabilidade a posteriori (PP) foram calculados usando a melhor árvore, e são expressos em percentagens. Valores *Bootstrapping* (BV) também são expressos em percentuais. A BV representam a porcentagem de árvores em que a espécie associada foi agrupadas na árvore produzido pelo método da máxima verossimilhança. Nomes de espécies são representados pela primeira letra do gênero, (L para *Leishmania* e T *Trypanosoma*) seguido pelo nome da espécie. Cepas estão sublinhadas e as seqüências de IDs em negrito correspondem aos seqüências extraída a partir do NCBI ou TriTrypDB. O grupo externo é o táxon *Toxoplasma gondii*. Fonte: (VASCONCELLOS *et al.*, 2014)

Segundo Fietto *et al.* (2004), tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* apresentam maior atividade ecto-ATPásica e ecto-ADPásica do tipo E-NTPDases (Ecto-Nucleosídeo Difosfato Trifosfohidrilases) do que epimastigotas. Ainda neste trabalho os autores clonaram o gene de uma E-NTPDase, que foi denominado NTPDase-1 e sugeriram que através da regulação da concentração de nucleotídeos extra-celulares sinalizadores e através da via de salvação de purinas extra-celulares, a NTPDase-1 poderia ser bom alvo para desenho de

drogas. Em 2009, este mesmo grupo, no trabalho de Santos e colaboradores descreveram que as E-NTPDases, como a NTPDase-1, influenciam a capacidade infecciosa e a virulência da cepa Y de *T. cruzi*. Neste trabalho os autores usaram inibidores da família das E-NTPDases e anticorpos policlonais anti-NTPDase-1 recombinante e mostraram que tanto a inibição enzimática, quanto o bloqueio por anticorpos não inibidores da atividade enzimática, levaram a redução da infecção *in vitro*. Além disso, atenuação da virulência em modelo murino foi verificada após inibição da atividade ecto-ENTPDásica. Sendo, portanto a TcNTPDase-1 um bom alvo em potencial para o desenho racional de drogas para tratamento da Doença de Chagas.

Estes dados mostram a importância de se estudar este fator de infecciosidade e virulência, que neste trabalho será abordado em relação a atividade ectonucleotidásica e localização celular diferentes linhagens de *T. cruzi*. Além disto, estudos com a cepa colombiana foram realizados com a finalidade de se analisar a influência do estágio de crescimento, meio de cultura e choque térmico nas ectonucleotídases desta cepa.

1.5 Leishmaniose

São doenças parasitárias causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* (BRYCESON, 1996). De acordo com World Health Organization, 2015 as leishmanioses são doenças causadas por protozoários de mais de 20 espécies do gênero *Leishmania*, que são transmitidas aos seres humanos pela picada de fêmeas dos flebotomíneos infectados. Existem três formas principais da doença: cutâneas, viscerais e mucocutânea: leishmaniose cutânea, leishmaniose visceral ou calazar, e leishmaniose tegumentar americana.

A figura 5 representa o esquema do ciclo de vida do gênero *Leishmania*. Os macrófagos infectados, com amastigotas, são ingeridos pelo flebotomíneo fêmea durante alimentação de sangue. No intestino do inseto os macrófagos são lisados e são liberados, onde se transformam na forma não infectiva promastigota procíclica. Após a maturação ocorre a colonização da porção superior do intestino e simultânea transformação do parasito para a forma promastigota metacíclica que pode infectar mamífero. O promastigota

metacíclico de *Leishmania* entra no organismo do hospedeiro através da inoculação pela picada do flebotomíneo. Estes são então fagocitados por monócitos, onde se multiplicam (SACKS E NOBEN-TRAUTH, 2002).

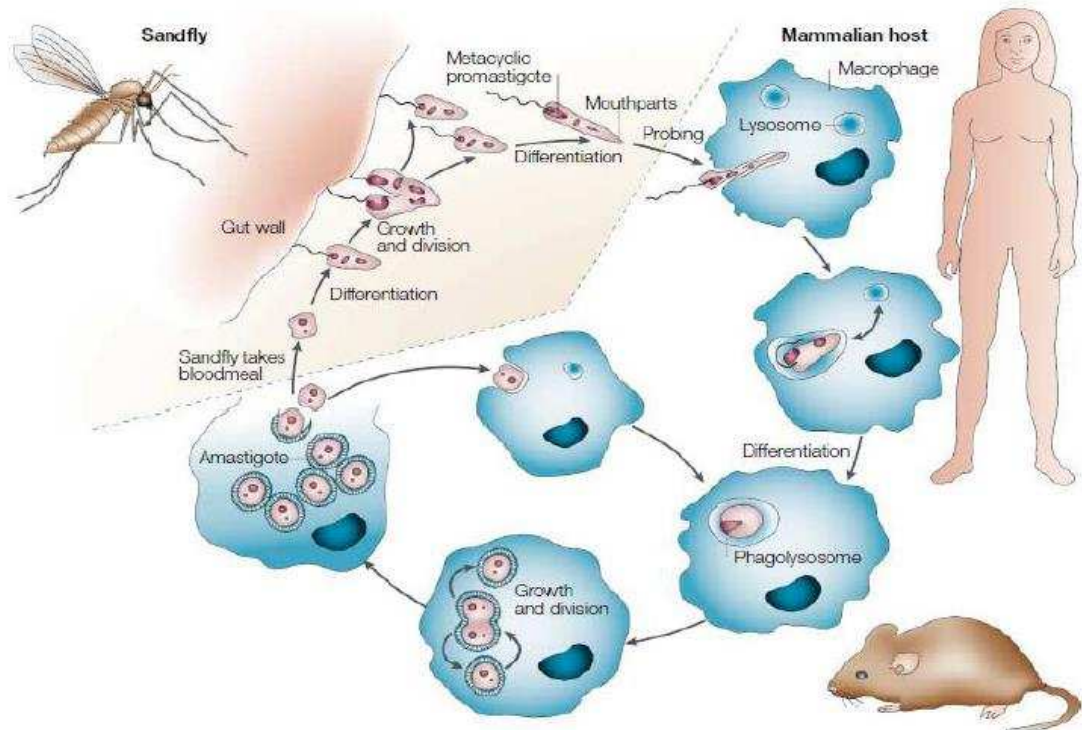


Figura 5: Ciclo de vida do parasito *Leishmania*. O esquema representa as formas morfológicas vistas nos hospedeiros vertebrados e invertebrados (SACKS E NOBEN-TRAUTH, 2002)

Leishmania tarentolae é uma espécie isolada do lagarto *Tarentolae annularis*, e pertencente ao gênero *Sauroleishmania* (LAINSON e SHAW, 1987) não patogênica para humanos. Os relatórios sobre a biologia celular de *L. tarentolae* são escassos e limitados as formas promastigotas. Taylor *et al.*, 2010 apresenta pela primeira vez uma metodologia para cultura axênica de amastigotas de *L. tarentolae* e compara essas condições de cultivo com as usadas para cultura de espécies patogênicas para o homem. Taylor *et al.* (2010), também relataram a infecção *in vitro* de macrófagos com amastigotas e a eficácia da ação leishmanicida do antimônio pentavalente e anfotericina B, sendo um bom mecanismo para triagem de drogas. Esta espécie de *Leishmania* tem sido utilizada na triagem de drogas, em biologia molecular na identificação de novos genes, produção de vacinas e como sistema de produção de proteínas heterólogas, que parece ser muito eficiente, tendo sido desenvolvido um kit de

expressão (*Leishmania tarentolae* Gene Expression Starter Kit-Jena Bioscience). Além disso, através das análises realizadas por Vasconcelos *et al.* (2014) observou-se que *Leishmania tarentolae* possui as duas NTPDases (NTPDase-1 e NTPDase-2) e um melhor estudo das características biológicas das NTPDases constitutivas desse parasito foram necessários e realizados neste trabalho.

2 Objetivos

2.1 Capítulo 1: Avaliação da atividade ectonucleotidásica e localização celular da NTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi*

- Caracterizar a atividade ecto-NTPDásica *in vivo* da forma evolutiva (epimastigota) de algumas cepas e clones de *T. cruzi*.
- Caracterizar a expressão da NTPDase-1 nas formas epimastigotas de diferentes DTUs por microscopia eletrônica de transmissão.
- Quantificar a adesão celular de epimastigotas, em cultura de células VERO através de ensaios de competição com a NTPDase-1 recombinante da cepa Y de *T. cruzi*.
- Avaliar o efeito do estresse térmico, estágio de crescimento em dois meios de cultivos diferentes (LIT e Grace's) sobre a atividade ectonucleotidásica.
- Imunolocalização da NTPDase-1 por microscopia eletrônica de transmissão (MET)
- Avaliar o papel da NTPDase-1 na presença de anticorpos policlonais anti-NTPDase-1 de *T. cruzi*.

2.2 Capítulo 2: Avaliação da atividade ectonucleotidásica e localização celular das NTPDases de *Leishmania tarentolae*

- Caracterizar as E-NTPDases de *L. tarentolae* através de medidas de atividade ecto-NTPDásica *in vivo* das formas evolutivas procíclica e metacíclica (promastigotas).
- Caracterizar a expressão da NTPDase na forma promastigota metacíclica por microscopia eletrônica e confocal.
- Avaliar o papel das E-NTPDases no mecanismo de adesão de *L. tarentolae* em macrófagos, por meio de ensaios de competição com a proteína recombinante LicNTPDase-2.

3. Capítulo 1:

Avaliação da atividade ectonucleotidásica e localização celular da NTPDase-1 em diferentes cepas e clones de *Trypanosoma cruzi*

3.1 Material e métodos

3.1.1 Parasitos

Os parasitos utilizados neste trabalho foram as cepas Colombiana (DTU I), Berenice-62 e Y (DTU II), clones CL-Brener e CL-14 (DTU VI) de *T. cruzi*. Estes foram cedidos pelo grupo da Dra. Maria Terezinha Bahia da coleção do Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal de Ouro Preto.

Essas cepas possuem o perfil de resistência à terapia de referência bem caracterizado, sendo a cepa Berenice-62 e CL-Brener sensíveis, cepa Y parcialmente sensível e a cepa Colombiana resistente ao benznidazol e ao nifurtimox (Filardi e Brener, 1987).

CL-14 e CL-Brener são clones da cepa CL. CL-14 foi usada como modelo de clone não infeccioso, a cepa Y como modelo de alta infecciosidade para termos comparativos, pois é nesta cepa que os estudos da NTPDase-1 foram feitos e as demais cepas como componentes das demais DTUs.

Tabela 1. Características das cepas utilizadas no estudo.

Cepa ou clone	Origem geográfica	Hospedeiro (fase da doença/vetor)	DTU*	Referência Bibliográfica
Colombiana	Colômbia	Homem/Crônica	I	Federici et al., 1964
Y	SP/Brasil	Homem/Crônica	II	Silva e Nussenzweig, 1963.
Berenice-62	MG/Brasil	Homem/Crônica	II	Salgado <i>et al.</i> , 1962.
CL	RGS/ Brasil	<i>Triatoma infestans</i>	VI	Brener e Chiari, 1963.
CL-Brener**				
CL-14**				

*Utilizou-se a nomenclatura proposta por Zingales *et al* (2009), em que as *Discrete Typing Units* (DTU) definem-se como conjuntos de cepas do parasito que são geneticamente relacionados e identificáveis por marcadores genéticos, moleculares ou imunológicos comuns (Zingales *et al.* 2009).

**Clones da cepa CL.

3.1.2 Cultivo de epimastigotas de *T. cruzi*

As culturas das formas epimastigotas foram mantidas em meio LIT (Liver infusion and Tryptose) e meio Grace's (GIBCO), pH 7,2 e suplementado com 10% e 20% de Soro Fetal Bovino (SFB) e incubadas a 28°C. Os parasitos foram congelados, em fase exponencial 1×10^7 parasitos/mL, centrifugados a 2000 g por 10 minutos e ressuspensos em meio de congelamento contendo 10% DMSO, 20% de SFB em meio LIT (Liver infusion and Tryptose), estocados por 24 horas a -80°C e em seguida armazenadas em nitrogênio líquido.

3.1.3 Cultivo de células VERO

As células VERO (células derivadas de carcinoma de rim de embrião de macaco verde africano *Chlorocebus aethiops*) foram cultivadas em meio RPMI-1640 completo [1mL de penicilina (solução estoque de 16,8 mM) e 1 mL de L-glutamina (solução estoque de 200 mM)], 2,5 mL de Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) 1 M para cada 100mL de meio e 10% soro fetal bovino (SFB) em garrafas de cultura de 25 cm³ contendo 5 mL de meio de cultura semeadas com 5×10^5 células VERO.

Os repiques dessas células foram feitos pela remoção do meio de cultura, lavagem da monocamada de células com 10 mL de solução salina 0,9% (estéril), adição de 5 mL de tripsina (100 mL de PBS, 0,5g de tripsina e 0,02g de EDTA) e incubação por 2 a 3 minutos em estufa à 37° C. A reação foi interrompida pela adição de 10 mL RPMI com SFB 10% e posterior homogeneização para ruptura dos grumos celulares. Esta suspensão celular foi transferida para um tubo Falcon de 15 mL, centrifugada por 10 minutos a 2000 g a 5°C, o sobrenadante foi descartado e o pellet suspenso em 10 mL de solução salina 0,9%. As células foram centrifugadas novamente por 10 minutos a 2000 g a 5°C, suspensas em meio RPMI 5% SFB e uma quantidade de 1×10^6 células foram semeadas em 15 mL de meio de cultura RPMI 5% SFB em garrafas de 75 cm³ e incubadas em estufa à 37° C, 5% CO² e atmosfera umidificada à 95%.

3.1.4 Curvas de crescimento

As curvas de crescimento de epimastigotas de *T. cruzi* foram obtidas, nos dois meios LIT e Grace's adicionando-se 1×10^5 parasitos/mL em 50 mL de meio LIT e 50 mL de meio Grace's SFB 10%, e Grace's 20% SFB separadamente.

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 até verificar a morte dos parasitos. As curvas foram realizadas em triplicata. Os valores obtidos foram usados para plotar as curvas de crescimento.

3.1.5 Caracterização Bioquímica da NTPDase-1 de *T. cruzi*

3.1.5.1 Medidas de atividade ectonucleotidásica *in vivo*

As atividades enzimáticas foram realizadas “*in vivo*” com as cepas Colombiana, Berenice-62 e Y, clones CL-Brener e CL-14 pelo método colorimétrico de determinação de fosfato livre gerado pela hidrólise de nucleotídeos, método verde de malaquita (EK MAN e JAGER, 1993). Os parasitos foram mantidos a 28°C, e para estudo do efeito do choque térmico, estes foram previamente incubados em banho-maria a 37°C por duas horas.

As reações foram realizadas, em triplicata de cultura e triplicata de testes para ATP, ADP, AMP e branco.

Os parasitos foram lavados por 3 vezes em salina 0,9% e ressuspensos em tampão de atividade 50mM de TRIS pH 7,2; 50 mM de HEPES pH 7,2; 2,5mM de MgCl₂; 116mM de NaCl; 5,4mM de KCl e 5mM de glicose. Usou-se 1x10⁶ parasitos por reação.

Um mix contendo tampão de atividade e nucleotídeo a 5mM foi feito para cada nucleotídeo, separadamente, em tubos de 1,5mL. Foi adicionado 100µL do mix por poço, a placa foi incubada a 37°C e a reação disparada com 25µL da suspensão de parasitos. Após 30 minutos a reação foi parada com 125 µL de HCl 0,2M inclusive os brancos. Os brancos das reações continham o mix tampão e nucleotídeo, exceto os parasitos que foram adicionados após parada da reação. Centrifugou-se os tubos a 2000 g por 5 minutos a 4°C.

Para determinação do fosfato livre transferiu-se 80µL de sobrenadante para uma placa de 96 poços, adicionou-se 80µL de tampão de atividade, em seguida 40µL de reagente colorimétrico (75% do volume total do reagente verde malaquita 0,2% e 25% do volume total de molibdato de amônio 10%, ambos ressuspensos em HCl 4M), incubou-se por 10 minutos e a leitura foi realizada a 650nm em leitora de microplaca *Thermo Plate* (TP-Reader)[®].

3.1.6 Caracterização da expressão da NTPDase-1 de *T. cruzi*

3.1.6.1 Imunolocalização da NTPDase-1 por microscopia eletrônica de transmissão

Análise por microscopia eletrônica foi realizada para imunolocalizar a NTPDase-1 de *T. cruzi* nas cepas estudadas em nível ultraestrutural. As culturas de parasitos, 1×10^8 parasitos por mL, foram centrifugadas a 2000 g, por 10 minutos a 4°C, o pellet de parasitos foi lavado, duas vezes com PBS pH 7,2.

Os parasitos foram fixados em glutaraldeído 1%; formol 4%; CaCl_2 5mM; 3,7% de sacarose e tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2, por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, os parasitos foram centrifugados nas mesmas condições e lavados, duas vezes, com tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 e centrifugados. A desidratação foi realizada inicialmente com etanol 50%, seguida de etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% duas vezes, por 10 minutos a temperatura ambiente. Logo após, os parasitos foram infiltrados em solução de resina LR White e etanol 100% na proporção de 1:1 por 24 horas a 4°C, seguida de infiltração em solução 2:1 resina/etanol por 24 horas a 4°C, em resina pura por 24 horas a 4°C. Posteriormente, os parasitos foram incluídos em resina pura por 24 horas a 60°C. Seções ultrafinas, foram então cortadas em ultramicrotomo (Power Tome X – RMC products) com navalha de diamante (DiATOME), foram colocadas em grades de níquel 300 mesh. A imunomarcagem foi realizada em câmara úmida, os cortes foram incubados com solução de cloreto de amônio 50mM em PBS, por 20 minutos a temperatura ambiente e passados para solução de bloqueio (albumina 1,5% em PBS pH 8, Tween 20 0,01%) por 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou o anticorpo primário anti-NTPDase-1 (SANTOS *et al.*, 2009) diluído 1:100 em PBS com albumina 1,5% pH 8,0 aos cortes que foram incubados overnight a 4°C. Após, os cortes foram lavados 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 (Sigma), diluído 1:30 em PBS com albumina 1,5% pH 8,0 e incubou-se por 2 horas. Lavou-se os cortes com água destilada, secou-se em papel de filtro. O contraste foi realizado no dia seguinte com acetato de uranila 3% por 20 minutos, lavou-se bem os cortes, secou-se em papel toalha e em seguida incubou-se com citrato de chumbo 0,2% por 5 minutos e secou em papel de filtro.

As amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 no núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (NMM).

3.1.7 Expressão e purificação da NTPDase-1 de *T.cruzi* para ensaios de competição

A NTPDase-1 de *T.cruzi*, cepa Y, foi expressa em sistema heterólogo bacteriano (pET21b/*E.coli* BL21-DE3) de acordo com SANTOS *et al.* (2009). A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade usando resina de níquel-agarose Ni-NTA Sigma® (MARIOTINI-MOURA *et al.*, 2014). As amostras de proteína foram quantificadas pelo método de Bradford (Bio Rad®) e analisadas por SDS-PAGE 10% corado com Coomassie Blue (SAMBROOK E RUSSELL, 2001).

3.1.8 Ensaio de adesão de epimastigotas em células VERO

3.1.8.1 Avaliação do papel da NTPDase-1 na presença de proteína recombinante NTPDase-1 de *T.cruzi*

As condições experimentais para os ensaios de adesão foram de 4°C e o tempo de 30 minutos. Todos estes procedimentos foram feitos de acordo com os procedimentos descritos por Mariotini-Moura *et al.* (2014).

Os ensaios de adesão por competição com a proteína recombinante NTPDase-1 de *T. cruzi* foram realizados, em triplicata, na presença de diferentes concentrações da proteína (0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 µg/mL) diluídas em meio RPMI 5%. Albumina (4 µg/mL), NTPDase-1 desnaturada 0,5 µg/mL por 5 minutos a 95° e tampão de eluição foram usados como controle negativo, e células VERO mais epimastigotas foram usados como controle positivo.

Em uma placa de 24 poços foram colocadas lamínulas de 13mm estéreis e adicionou-se, células VERO na concentração inicial de 5×10^4 células/ lamínula em meio RPMI 5% SFB por 48 horas. Após este tempo, as células foram colocadas em contato por 5 minutos com as diferentes concentrações da proteína NTPDase-1. Passado o tempo de 5 minutos, os parasitos, na forma epimastigota da cepa Y, crescidos em meio LIT foram centrifugados, contados e ressuspendidos na concentração desejada, 5×10^5 parasitos/mL, em meio RPMI

5% SFB, foram adicionados às células VERO (10 parasitos: 1 célula) e incubados 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 óptico em objetiva de 100, como realizado por Santos *et al.* (2009). A porcentagem de parasitos aderidos foi determinada por contagem de 300 células em cada lamínula testada e em triplicata das concentrações. Foram realizados três experimentos independentes.

3.1.8.2 Avaliação do papel da NTPDase-1 na presença de anticorpos policlonais anti- NTPDase-1 de *T.cruzi*

Os ensaios foram realizados na ausência e presença de anticorpos policlonais anti-NTPDase-1 de *T.cruzi* purificados na diluição de 1:100. Como controle negativo, utilizou-se anticorpo comercial anti-IgG de cão (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, *T. cruzi* e meio de cultura RPMI) de acordo com Mariotini-Moura (2014).

Os parasitos na forma epimastigotas, fase exponencial, crescidos em meio Grace's 20% SFB a 28°C e parasitos submetidos a choque térmico por 2 horas a 37°C 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 deixados interagir por 30 minutos a 4°C, onde foi avaliada a adesão. Em seguida, as lamínulas foram lavadas delicadamente com PBS a 4°C e coradas pelo método do panótico rápido, que é um método de coloração em 15 segundos, sendo composto por três soluções, solução 1 (solução de triarilmetano a 0,1), solução 2 (solução de xantenos a 0,1%) e solução 3 (solução de tiazinas a 0,1%) as lamínulas foram mergulhadas 5 segundos em cada solução em movimento contínuo de cima para baixo, deixou-se escorrer bem e lavou-se as lamínulas com água destilada, secaram ao ar na posição vertical. As lamínulas foram aderidas as lâminas com entellan (MERCK) e analisadas em microscópio de luz.

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

3.1.9 Análise estatística dos dados

Todos os experimentos foram em triplicata, com resultados similares obtidos ao menos em três experimentos independentes. Os dados foram analisados estatisticamente pelo software Sigmaplot®, utilizando o Teste T. Os valores de P iguais ou menores que 0,05 foram considerados significantes.

3.2 Resultados e discussão

3.2.1 Curva de crescimento de epimastigotas

As curvas de crescimento foram utilizadas para determinar as fases lag, logarítmica e estacionária de cada cepa ou clone.

A Figura 5 representa as curvas de crescimento das formas epimastigotas para as cepas Colombiana, Berenice-62, Y e os clones CL-Brener, CL-14 de *T. cruzi*. Foi realizada contagem de parasitos, durante 20 dias consecutivos, conforme descrito anteriormente.

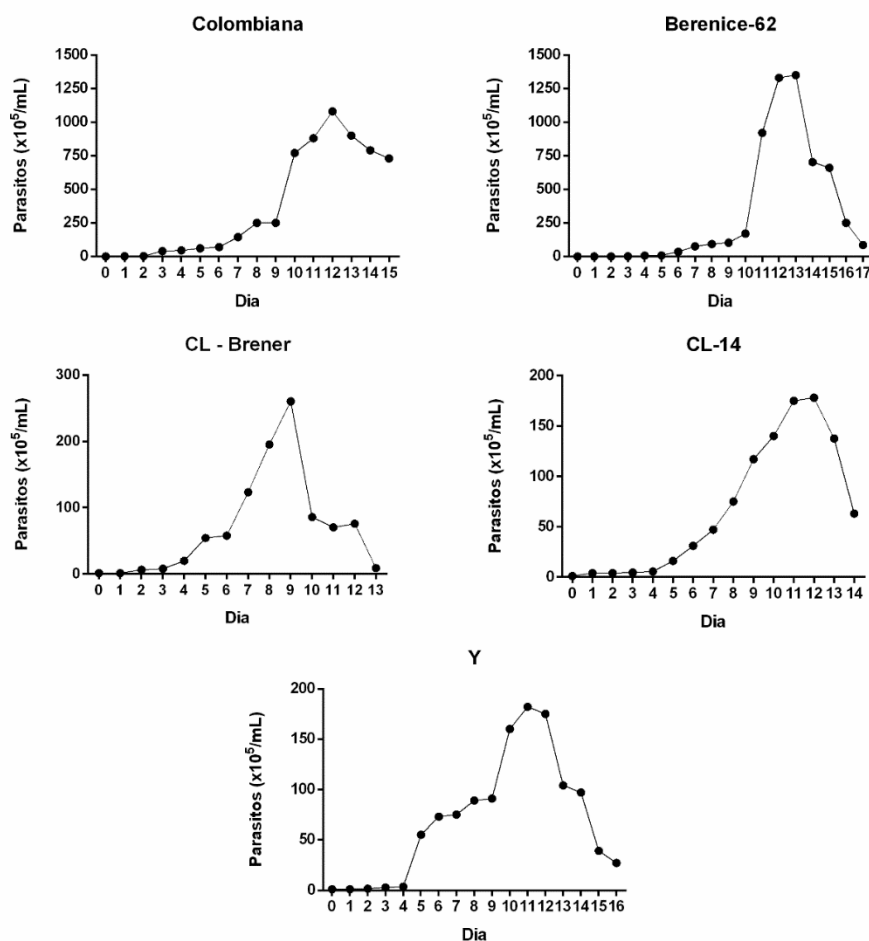


Figura 6: Curva de crescimento das cepas e clones deste estudo. Os parasitos foram cultivados em meio LIT a 28°C durante 20 dias consecutivos. As cepas analisadas foram, Colombiana (DTU I), Berenice-62 e Y (DTU II), clones CL-Brener e CL-14 (DTU VI). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Analisando-se os gráficos, primeiramente observamos variações de crescimento entre as cepas, o que reflete em crescimento distintos partindo de um inoculo de 1×10^5 parasitos/mL.

Para cepa Colombiana a fase lag foi até o 6º dia, a fase logarítmica do 7º ao 10º dia, e a fase estacionária do 11º ao 16º, a partir do 16º dia a mortalidade foi alta. A cepa Berenice-62 apresentou a fase lag e logarítmica parecidas com as da cepa Colombiana, a fase lag foi até o 6º dia, a fase logarítmica do 7º ao 11º dia, porém a fase estacionária apresentou um curto intervalo do tempo do 12º ao 13º dia.

A fase lag do clone CL-Brener foi até o 3º dia e a fase logarítmica do 4º ao 9º dia, a fase estacionária não foi bem caracterizada uma vez que apresentou um pico elevado de crescimento no 9º dia e no 10º dia uma alta mortalidade.

Já para o clone CL-14 a fase lag foi até o 4º dia e a fase log do 5º dia ao 10º dia e fase estacionária do dia 11º ao 12º.

A cepa Y apresentou a fase lag até o 4º dia, a fase log do 5º ao 10º dia e a fase estacionária do 11º ao 12º dia. A partir do 12º dia observou-se alta mortalidade.

Na tabela 2 estão representados os dias em que foram coletados os parasitos para os ensaios de atividade ectonucleotidásica, microscopia eletrônica e ensaio de adesão. Os dias escolhidos foram no meio da fase log e início da fase estacionária.

Tabela 2. Dia de crescimento relacionado à fase log e estacionária da curva crescimento de cada cepa ou clone, nos quais os parasitos foram obtidos para realização dos ensaios.

Cepas ou clones	Dia de crescimento	
	Fase log	Fase estacionária
Y	8º	10º
Berenice-62	10º	12º
Colombiana	9º	11º
CL-Brener	8º	10º
CL-14	9º	11º

3.2.2 Caracterização da atividade ectonucleotidásica em diferentes cepas/clones de *T. cruzi*

3.2.2.1 Medidas de atividade ectonucleotidásica *in vivo*

A fim de se verificar a capacidade das cepas/clones de hidrolisar ATP, ADP e AMP, foram realizadas medidas de atividade ATPDásica com as formas epimastigotas vivas nas fases logarítmica e estacionária (Tabela 2). E também com os parasitos da cepa Colombiana nos meios de crescimento LIT e Grace's 20% SFB, nas fases exponencial e estacionária. A determinação de fosfato livre gerado pela hidrólise de nucleotídeos realizada pelo método colorimétrico verde de malaquita (EK MAN e JAGER, 1993).

Nas medidas de atividade observou-se variações entre as cepas. Conforme pode ser visto na Tabela 3 e descrito abaixo.

Para a Cepa Y encontramos uma hidrólise de ATP ($211,4 \pm 17 \text{ nmol Pi} \times 10^8 \text{ parasitos}^{-1} \text{ h}^{-1}$) na fase estacionária aumentada, cerca de 10 vezes, comparado com a hidrólise na fase logarítmica ($21,9 \pm 3,7 \text{ nmol Pi} \times 10^8 \text{ parasitos}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Para hidrólise de ADP encontrou-se uma atividade de ($115,3 \pm 27 \text{ nmol Pi} \times 10^8 \text{ parasitos}^{-1} \text{ h}^{-1}$) na fase estacionária e nenhuma atividade foi observada na fase logarítmica.

A cepa Berenice-62 na fase logarítmica apresentou hidrólise de ATP de $332 \pm 42,5 \text{ nmol Pi} \times 10^8 \text{ parasitos}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e menor hidrólise de AMP ($18 \pm 5 \text{ nmol Pi} \times 10^8 \text{ parasitos}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e não hidrolisou ADP. Na fase estacionária não foi possível detectar hidrólise de nenhum nucleotídeo na fase estacionária.

O clone CL-14 hidrolisou apenas ATP ($119 \pm 3 \text{ nmol Pi} \times 10^8 \text{ parasitos}^{-1} \text{ h}^{-1}$) na fase logarítmica.

O clone CL-Brener apresentou hidrólise de ATP tanto na fase logarítmica ($126 \pm 2,2 \text{ nmol Pi} \times 10^8 \text{ parasitos}^{-1} \text{ h}^{-1}$) quanto na fase estacionária ($4,4 \pm 2,2 \text{ nmol Pi} \times 10^8 \text{ parasitos}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Porém ao contrário da cepa Y a maior atividade foi observada na fase logarítmica.

A cepa colombiana hidrolisou os nucleotídeos ATP ($435 \pm 66 \text{ nmol Pi} \times 10^8 \text{ parasitos}^{-1} \text{ h}^{-1}$), ADP ($20 \pm 6 \text{ nmol Pi} \times 10^8 \text{ parasitos}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e AMP ($46 \pm 3 \text{ nmol Pi} \times 10^8 \text{ parasitos}^{-1} \text{ h}^{-1}$) na fase logarítmica e não foi detectado nenhuma hidrolise na fase estacionária.

De modo geral esperávamos que a fase estacionária apresentasse aumento da hidrólise dos diferentes nucleotídeos, pois a limitação de nutrientes do meio poderia induzir o aumento da expressão das enzimas NTPDase-1 (ATP e ADP) e 5' NT (AMP). Porém isso não foi observado a não ser para a cepa Y. Na literatura, Silva-Gomes *et al.* (2014) observaram que o cultivo a longo prazo aumenta a expressão da NTPDase-1 de *T. cruzi* cepa Y. Porém, comparando a cepa Y estudada por Fietto *et al.* (2004), verificamos que os epimastigotas apresentaram atividade de aproximadamente 200 nmolPix10⁸ parasitos⁻¹h⁻¹ para ATP, 230 nmolPix10⁸ parasitos⁻¹h⁻¹ para ADP e 170 nmolPix10⁸ parasitos⁻¹h⁻¹ para AMP. O que é compatível com nossos dados para ATP e ADP, mas não para AMP. Esta diferença pode ser devida a diferenças de manipulação, na obtenção de epimastigotas e do meio de cultura que inclui componentes sem composição química definida, meio LIT (Liver infusion Tryptose). Além disto no trabalho de Fietto *et al.* (2004) foram usados azida sódica e vanadato de sódio como inibidores de outras ATPases no meio reacional de atividade E-NTPDásica, o que não foi feito no presente estudo onde nenhum inibidor foi acrescido ao meio reacional.

A atividade aumentada no fim da curva de crescimento pode ser explicada pela carência nutricional como mostrado por Bêrredo-Pinho *et al.* (2001) que mostrou para *L. amazonensis* que na ausência de adenosina a atividade ecto-ATPásica é aumentada.

As demais cepas diferiram significativamente no perfil de atividade das fases, sendo de forma geral as atividades na fase logarítmica maiores que na fase estacionária. Estes resultados precisam ser melhor investigados, mas estão de acordo com o trabalho de Meyer-Fernandes *et al.* (2004), onde ele mostrou que a atividade ecto-ATPDásica decresceu com o tempo de cultivo. Estes dados podem sugerir que a importância da NTPDase-1 e/ou de outras ectonucleotidases como fatores de virulência e infecciosidade seja variável em se tratando do parasito *T. cruzi*, sendo necessário um cuidado maior nesta temática. Além disto, a maior atividade ectonucleotidásica na fase logarítmica da maioria das cepas/clones aqui estudados pode apontar para uma importância maior das enzimas na nutrição dos parasitos, já que esta é a fase de maior proliferação dos mesmos.

Tabela 3. Medida de atividade ectonucleotidásica de *Trypanosoma cruzi* em formas epimastigotas.

Substrato	Atividade ectonucleotidásica nmol Pix10 ⁸ parasitos ⁻¹ h ⁻¹			
	Fase logaritmica	Razão de Hidrólise ATP/ADP	Fase estacionária	Razão de Hidrólise ATP/ADP
Cepa Y				
ATP	21,9 ± 3,7 (2)	ND	211,4 ± 17 (3)	1,83
ADP	0 (3)		115,3 ± 27 (2)	
AMP	0 (3)		0 (3)	
Cepa Berenice-62				
ATP	332 ± 42,5 (2)	ND	0 (3)	ND
ADP	0 (3)		0 (3)	
AMP	18 ± 5 (3)		0 (3)	
Cepa CL-14				
ATP	119 ± 3 (3)	ND	0 (3)	ND
ADP	0 (3)		0 (3)	
AMP	0 (3)		0 (3)	
Cepa CL-Brener				
ATP	126 ± 2,2 (3)	ND	4,4 ± 2,2 (2)	ND
ADP	0 (3)		0 (3)	
AMP	0 (3)		0 (3)	
Cepa Colombiana				
ATP	435 ± 66 (2)	21,75	0 (3)	nd
ADP	20 ± 6 (2)		0 (3)	
AMP	46 ± 3 (3)		0 (3)	

OBS: O número de replicatas biológicas está indicado entre parênteses.

3.2.3 Imunolocalização da NTPDase-1 por microscopia eletrônica transmissão

Para analisar a localização sub-celular da NTPDase-1, especificamente nas cepas e clones deste estudo, foram realizadas microscopia eletrônica de transmissão pela técnica imunocitoquímica pós-inclusão, com partículas de ouro coloidal de 10nm em epimastigotas das cepas Colombiana (DTU I), Berenice-62 e Y (DTU II), clones CL-Brener e CL-14 (DTU VI) de *T. cruzi*. É importante ressaltar que esta técnica é pouco adequada para marcações em membrana plasmática e adequada para visualização de marcações intra-celulares (SOUTO-PADRON, 2007).

Para as microscopias eletrônicas os parasitos foram obtidos no 1º dia da fase estacionária, conforme a Tabela 3. Espera-se encontrar nessa fase a expressão de NTPDase-1 de *T. cruzi* aumentada, pois sua maquinaria celular não estaria mais voltada a multiplicação celular.

Pelas análises ultraestruturais da localização subcelular da NTPDase-1 foi possível observar marcações distribuídas em diversas regiões das células (Figura 7-15).

Assim encontrando algumas marcações intracelulares na cepa Colombiana como, no núcleo (N) (seta preta), cinetoplasto (K) (cabeça de seta branca), flagelo (F) (seta branca) e citoplasma (círculo pontilhado branco) (Figura 7). Na Figura 8A foi observado imunolocalização em vesículas (cabeça de seta preta) próxima da região de emergência do flagelo. Nenhuma marcação foi observada no controle (Figura 8B). Também não se encontrou marcação na superfície celular o que pode corroborar com os dados de atividade ectonucleotidásica, pois conforme a Tabela 3 a cepa Colombiana na fase estacionária não mostrou nenhuma atividade.

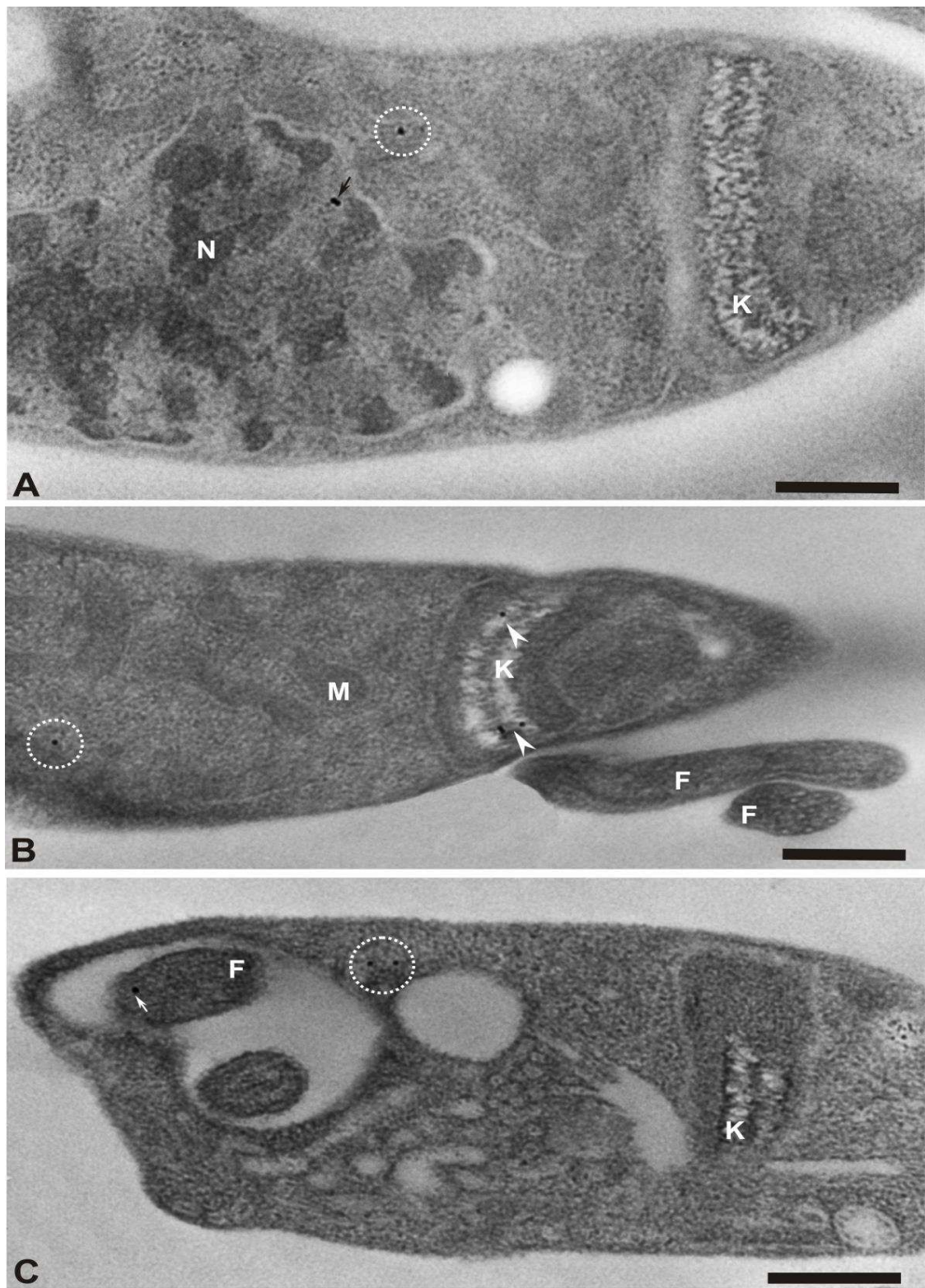


Figura 7: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão mostrando localização celular da E-NTPDase-1 em epimastigotas de fase estacionária de *T. cruzi* (cepa Colombiana). Foi usado anticorpo policlonal anti-NTPDase-1 e anticorpo secundário conjugado a ouro coloidal de 10 nm. (A,B,C) Parasitos mostrando imunolocalização no núcleo (N) (seta preta), cinetoplasto (K) (cabeça de seta branca), flagelo (F) (seta branca) e citoplasma (círculo pontilhado). Barras: A-C = 0,3 μ m.

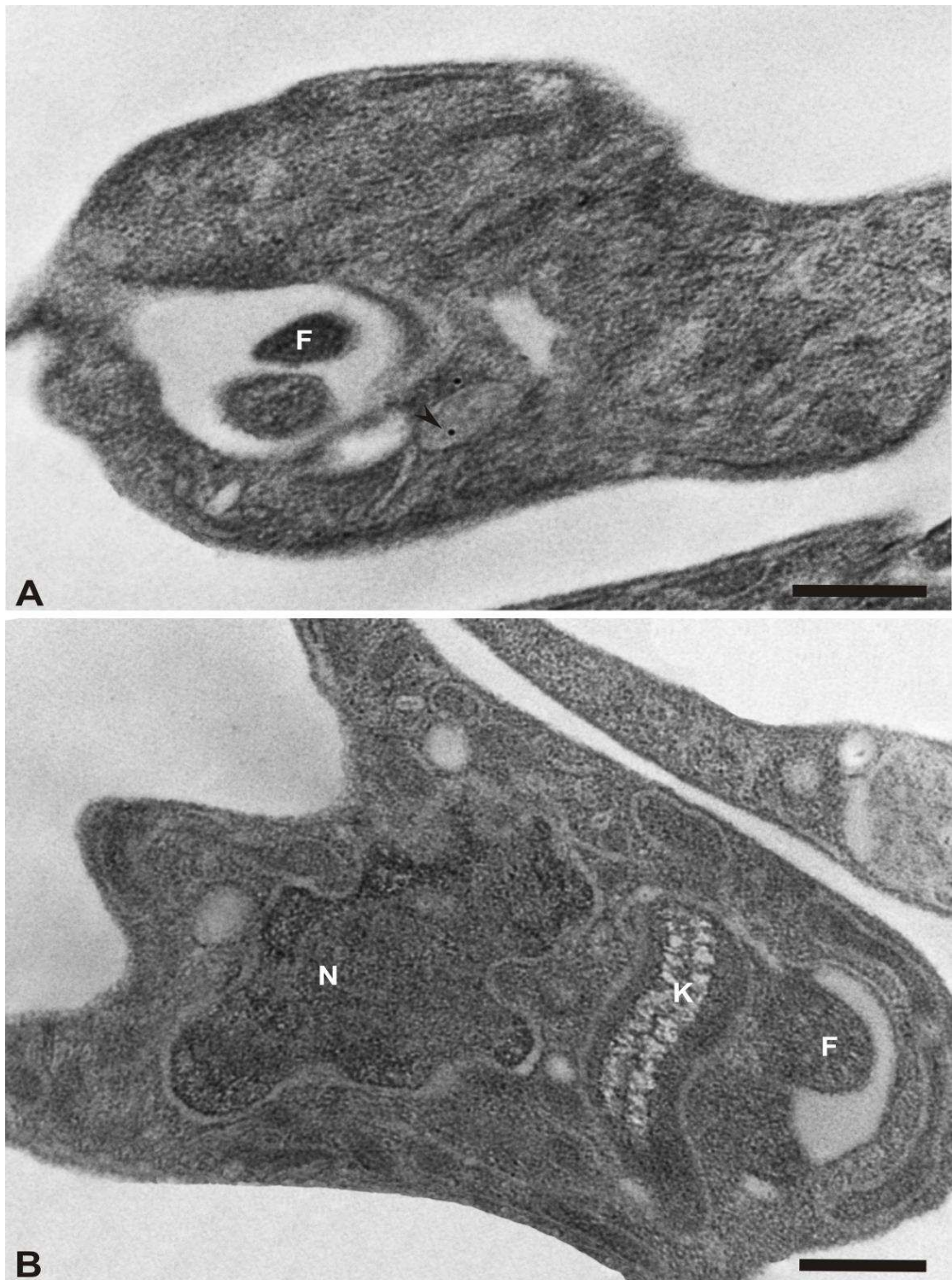


Figura 8: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão mostrando localização celular da E-NTPDase-1 em em epimastigotas de fase estacionária de *T. cruzi* (cepa Colombiana). Foi usado anticorpo policlonal anti-NTPDase-1 anticorpo secundário conjugado a ouro coloidal de 10 nm. (A) Parasitos mostrando imunolocalização em vesícula (cabeça de seta preta). (B) Marcações não foram observadas nos parasitos (controle). (Núcleo (N), Cinetoplasto (K), Flagelo (F)). Barras: A e B = 0,3 μ m.

As figuras 9 a 11 mostram as imunolocalizações da NTPDase-1 no clone CL-Brener. Na Figura 9, observou-se parasitos com imunolocalização no núcleo (N) (seta branca), cinetoplasto (K) (cabeça de seta branca), flagelo (F) (seta preta), superfície celular (seta pontilhada preta), citoplasma (círculo), reservossomo (R) (seta pontilhada branca). Os reservossomos são descritos como corpos multivesiculares responsáveis pelo armazenamento de proteínas e lipídeos ingeridos, bem como de proteínas secretoras sintetizadas pelo parasito. (Soares e De Souza, 1988; Soares, 1999).

A Figura 10, além das imunolocalizações no cinetoplasto (K) (cabeça de seta branca), citoplasma (círculo), reservossomo (R) (seta pontilhada branca), superfície celular (seta pontilhada preta) e flagelo (F) existe também marcação no Complexo de Golgi (G) (seta preta e branca), mitocôndria (M), (seta preta) e bolsa flagelar (PF) e a figura 11 encontramos marcações em vesículas internas (cabeça de seta preta) nos parasitos, não foi observada marcações no controle (Figura 11C).

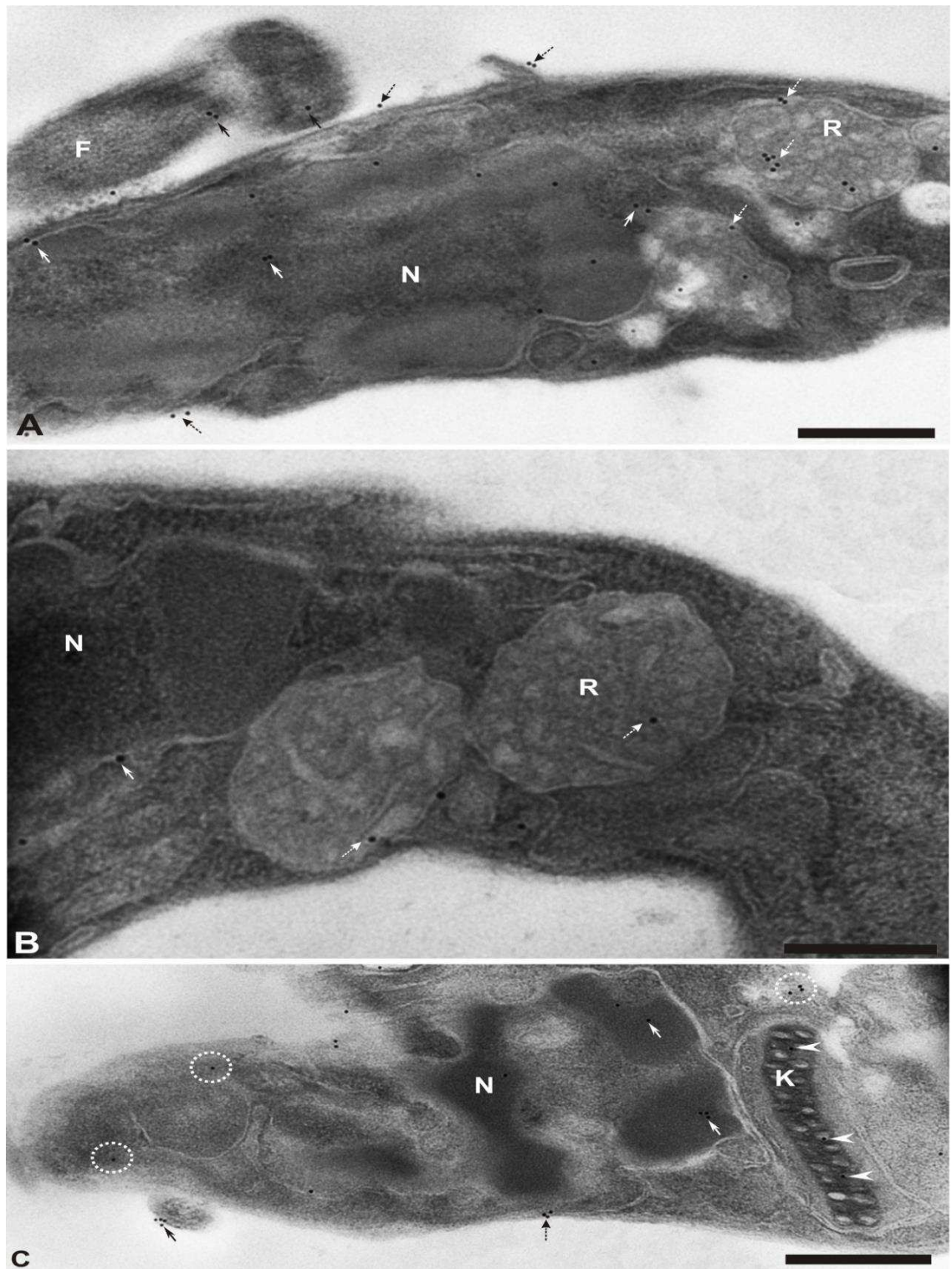


Figura 9: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão mostrando localização celular da E-NTPDase-1 em epimastigotas de fase estacionária de *T. cruzi* (clone CL- Brener). Foi usado anticorpo policlonal anti-NTPDase-1 e anticorpo secundário conjugado a ouro coloidal de 10 nm. (A,B,C) Parasitos mostrando imunolocalização no núcleo (N) (seta branca), cinetoplasto (K) (cabeça de seta branca), flagelo (F) (seta preta), reservossomo (R) (seta pontilhada branca), superfície celular (seta pontilhada preta), citoplasma (circulo). Barras: A = 0,3 μ m, B = 0,2 μ m, C = 0,4 μ m.

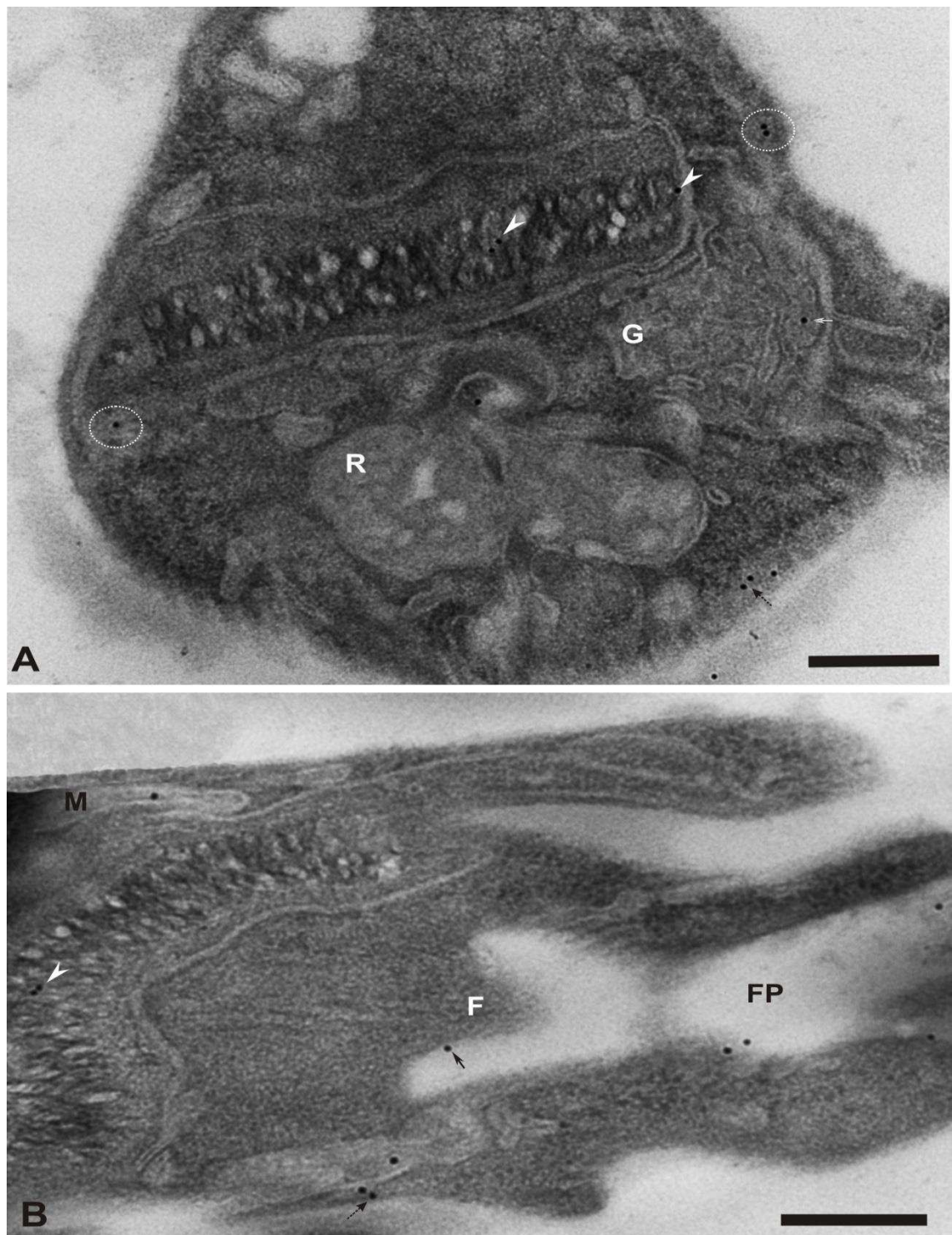


Figura 10: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão mostrando localização celular da E-NTPDase-1 em epimastigotas de fase estacionária de *T. cruzi* (clone CL- Brener). Foi usado anticorpo policlonal anti-NTPDase-1 e anticorpo secundário conjugado a ouro coloidal de 10 nm. (A e B). Parasitos mostrando imunolocalização no cinetoplasto (K) (cabeça de seta branca), citoplasma (circulo pontilhado branco), reservossomo (R) (seta pontilhada branca), superfície celular (seta pontilhada preta), Complexo de Golgi (G) seta branca, mitocôndria (M) (circulo pontilhado preto), flagelo (F) (seta preta), bolsa flagelar (PF). Barras: A-C = 0,2 μ m.

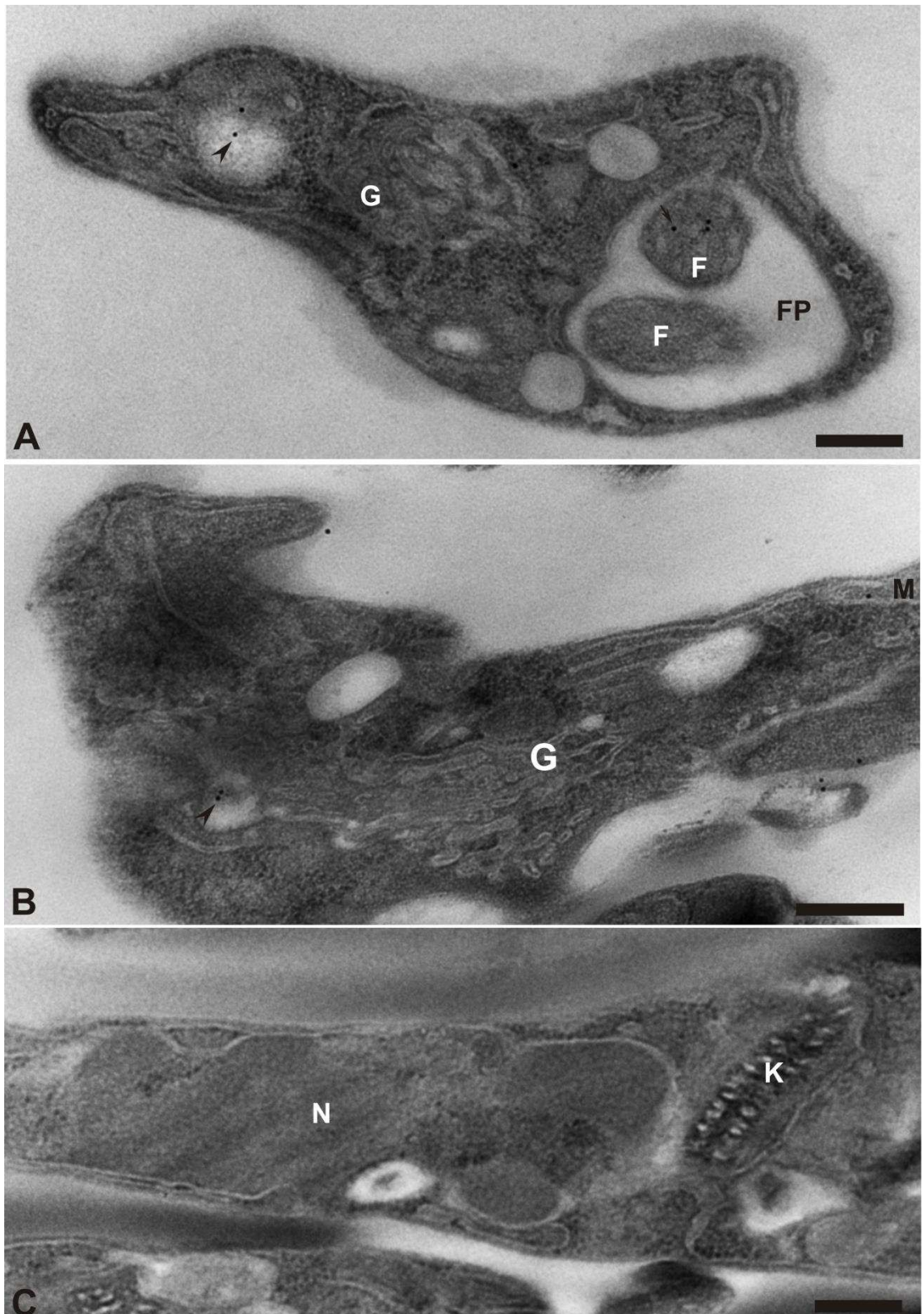


Figura 11: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão mostrando localização celular da E-NTPDase-1 em epimastigotas de fase estacionária e *T. cruzi* (clone CL-Brener). Foi usado anticorpo policlonal anti-NTPDase-1 e anticorpo secundário conjugado a ouro coloidal de 10 nm. (A,B) Parasitos mostrando imunolocalização em vesículas internas (cabeça de seta preta) mitocôndria (M), flagelo (F) (seta preta). (C) Imunopartículas de ouro não foram observadas em parasitos usados como controle. Barras: A-C = 0,2 μ m.

A Figura 12 mostra as imunolocalizações da NTPDase-1 na cepa Berenice-62 no cinetoplasto (K), Citoplasma, Núcleo (N), superfície celular, reservossomo (R) e bolsa flagelar (PF). Não foi observado marcações no controle (Figura 13).

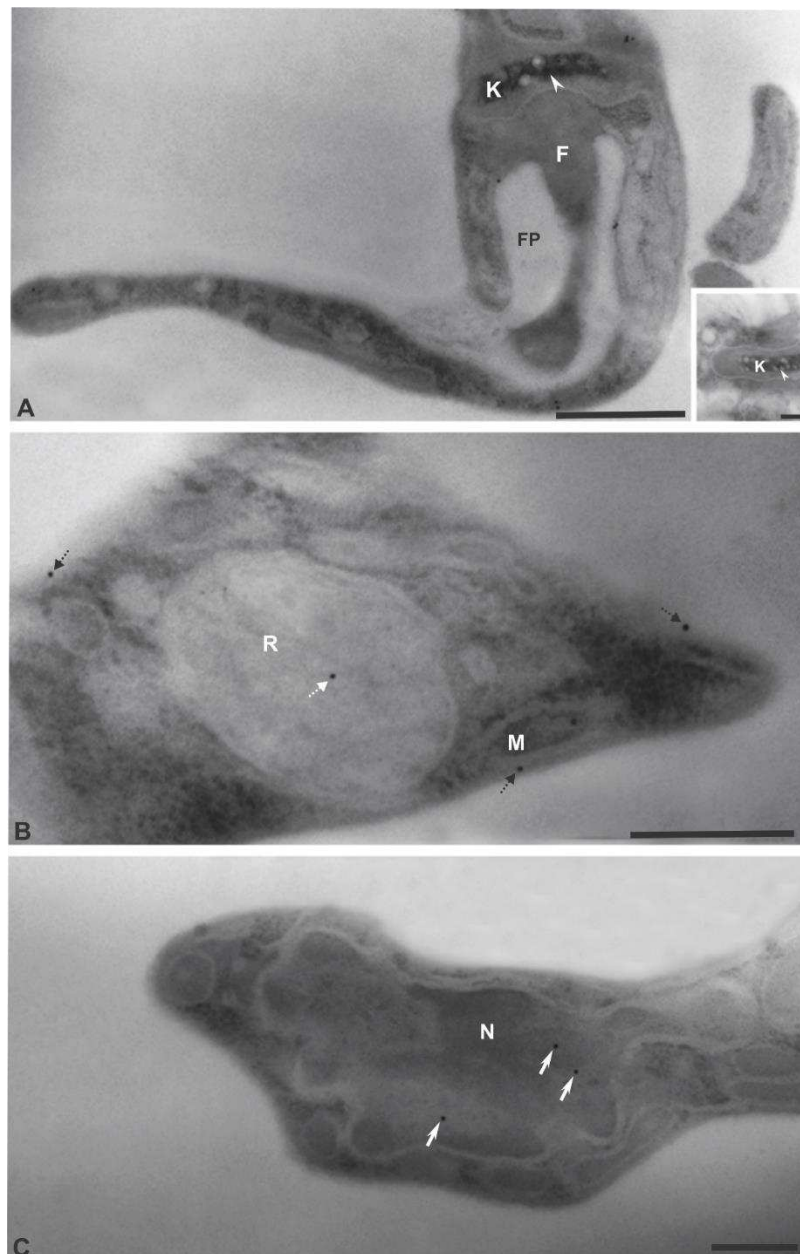


Figura 12: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão mostrando localização celular da E-NTPDase-1 em epimastigotas fase estacionária de *T. cruzi* (cepa Berenice-62). Foi usado anticorpo policlonal anti-NTPDase-1 e anticorpo secundário conjugado a ouro coloidal de 10 nm. (A,B e C) Parasitos mostrando imunolocalização cinetoplasto (cabeça de seta branca), Flagelo (F), mitocôndria (M), flagelo (F), bolsa flagelar, reservossomo (seta pontilhada branca), superfície celular (seta pontilhada preta), Núcleo (seta branca). Barras: A e B = 0,5 µm, inserte e C = 0,2 µm.

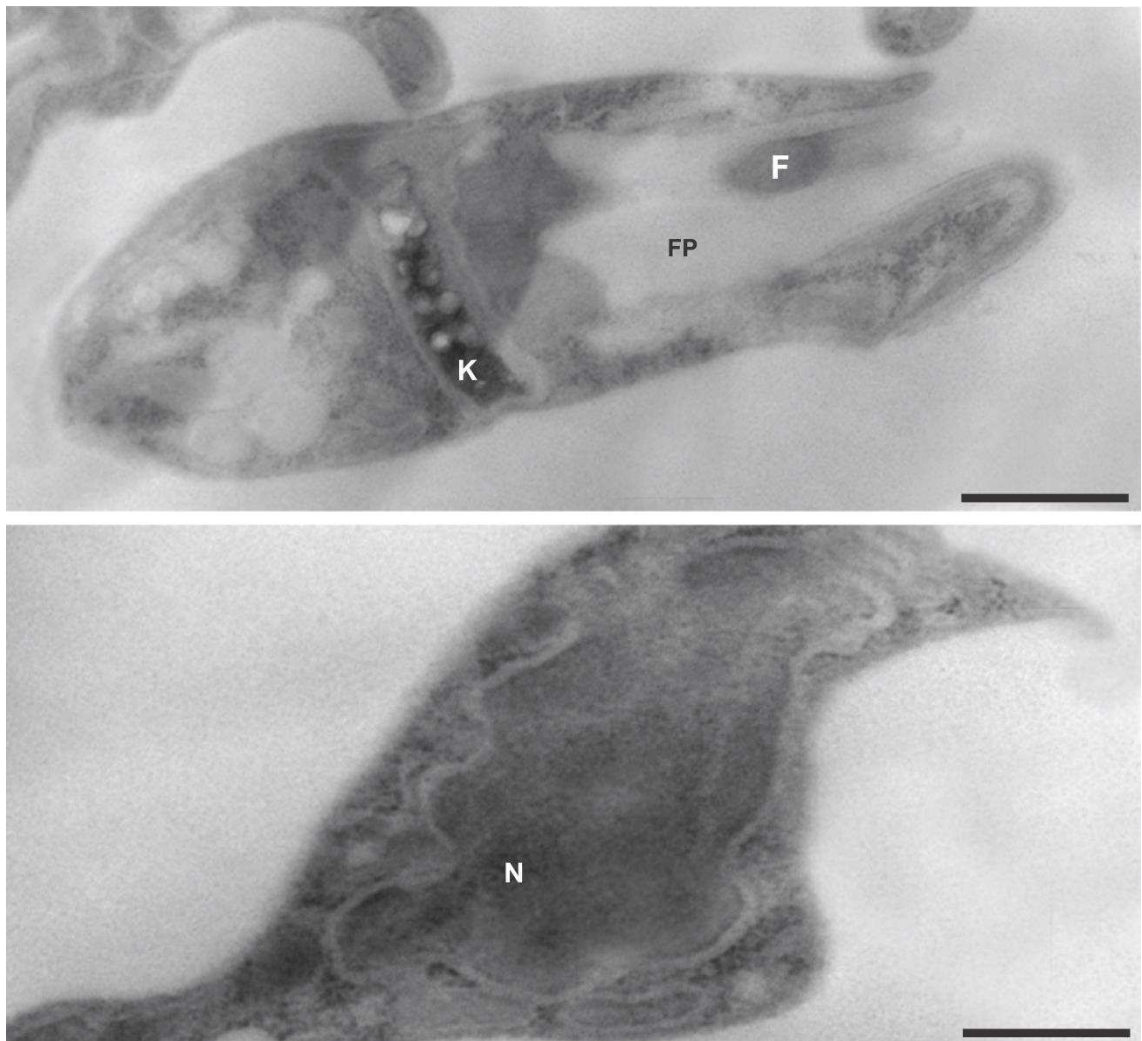


Figura 13: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão de epimastigotas de fase estacionária de *T. cruzi* (cepa Berenice-62). Controle. Foi usado apenas anticorpo secundário conjugado a ouro coloidal de 10 nm. Marcações não foram observadas nos parasitos (controle). (Núcleo (N), Cinetoplasto (K), Flagelo (F), Bolsa Flagelar, Mitocôndrias, Vesículas e Superfície celular. Barras: A e B = 0,5 μ m.

Já a Figura 14, que representa o clone CL-14 não apresentou marcações em nenhuma estrutura celular, estes dados estão de acordo com o fato do clone CL-14 não ser um clone infectivo e não apresentou atividade ectonucleotidásica na fase estacionária. A Figura 15 representa o clone CI-14 controle, onde também não foi observado marcações.

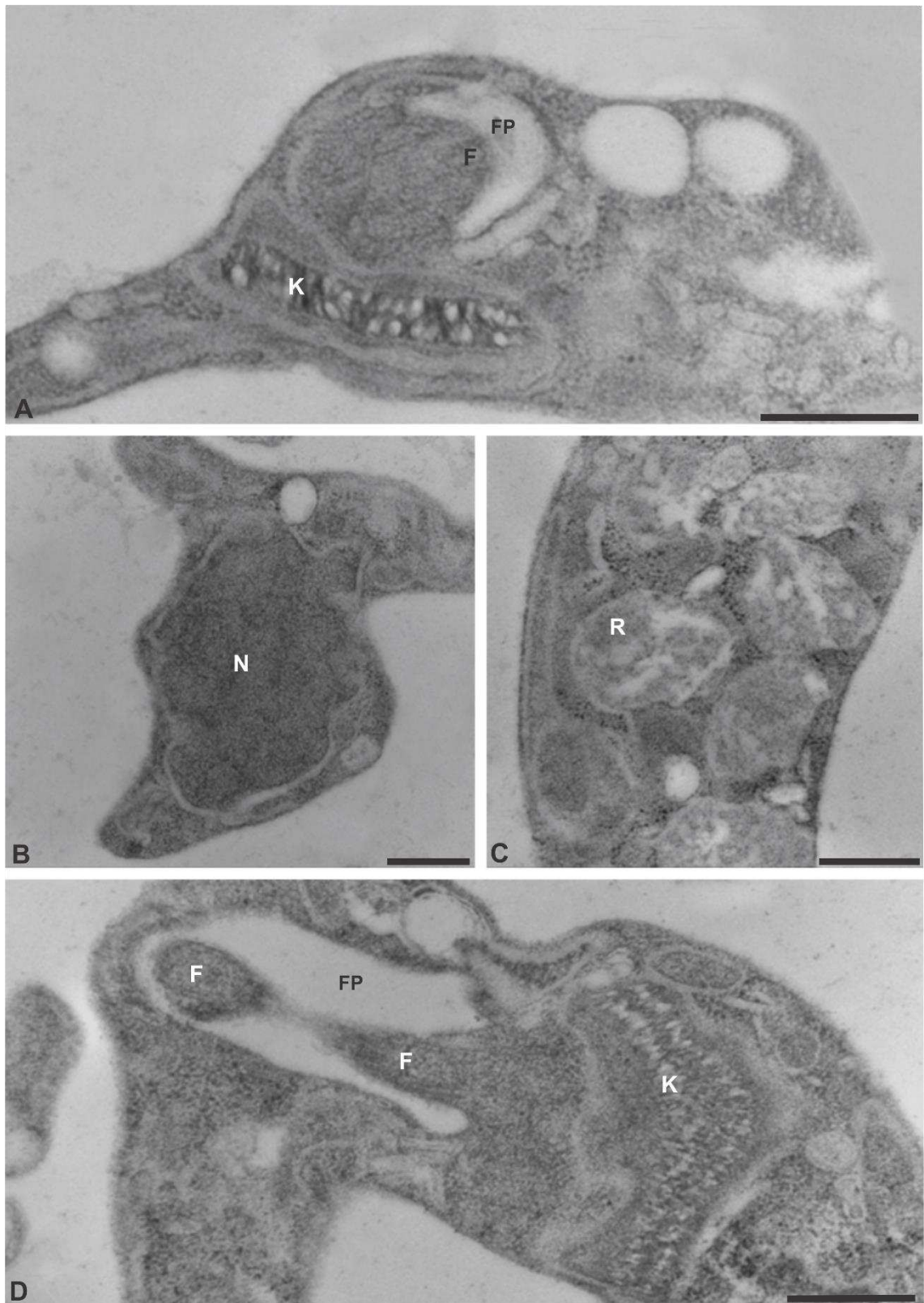


Figura 14: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão de epimastigotas de fase estacionária de *T. cruzi* (clone CL-14). Foi usado anticorpo policlonal anti-NTPDase-1 e anticorpo secundário conjugado a ouro coloidal de 10 nm. Marcações não foram observadas nos parasitos. (Núcleo (N), Cinetoplasto (K), Flagelo (F), Bolsa Flagelar, Mitocôndrias, Vesículas e Superfície celular. Barras: A-B = 0,5 μ m).

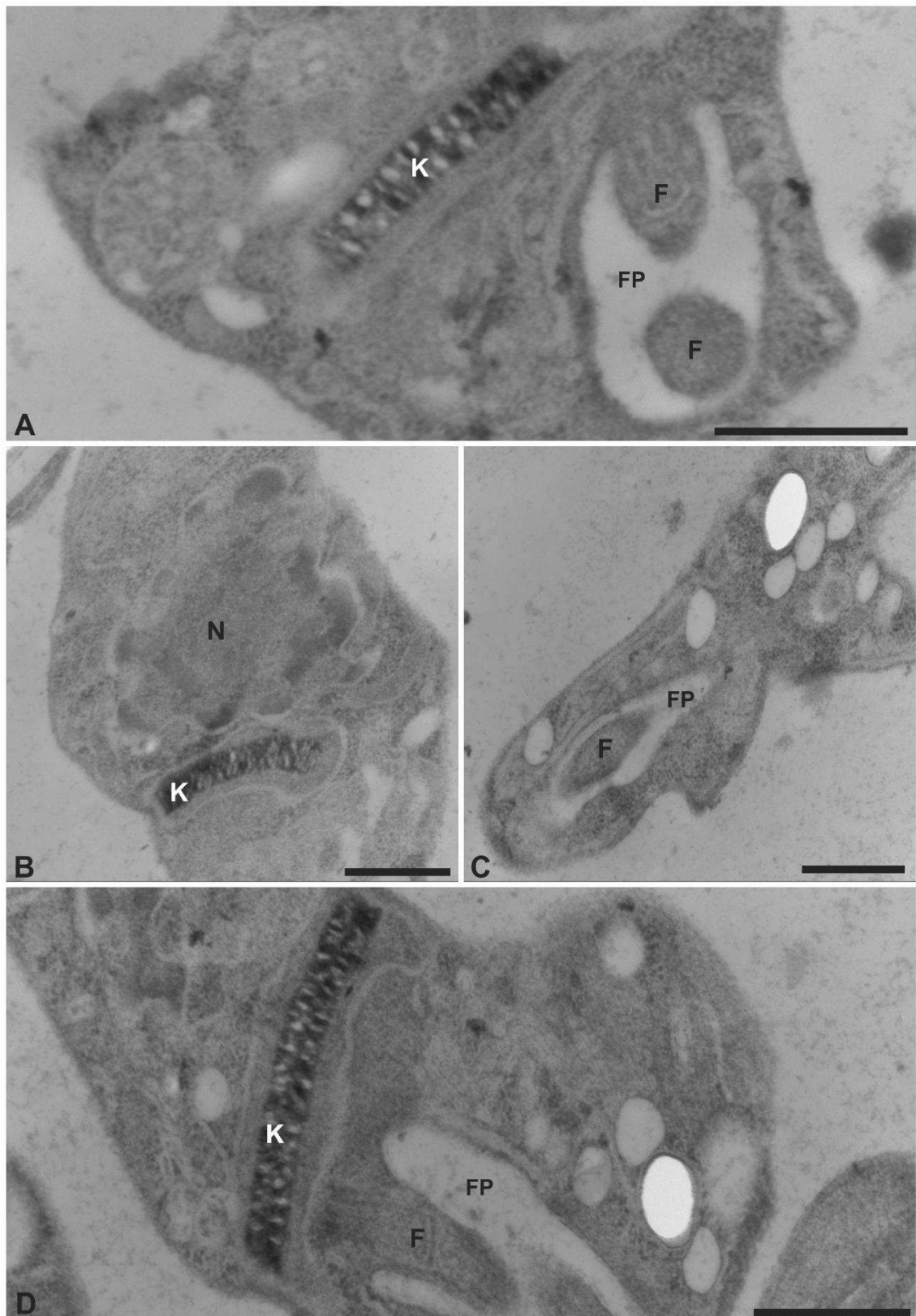


Figura 14: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão epimastigotas de fase estacionária de *T. cruzi* (clone CL-14). Controle. Foi usado anticorpo secundário conjugado a ouro coloidal de 10 nm. Marcações não foram observadas nos parasitos (Controle). (Núcleo (N), Cinetoplasto (K), Flagelo (F), Bolsa Flagelar (FP), Mitocôndrias, Vesículas, Reservosomos e Superfície celular. Barras: A-B = 0,5 μ m).

Comparando as fotomicroscopias das cepas e clones notou-se que as cepas e clones que apresentaram maiores quantidades de marcações foram CL-Brene>Colombiana>Berenice-62>CL-14.

Os presentes resultados reforçam que a NTPDase-1 pode estar envolvida na aquisição de nutrientes por epimastigotas, e sua 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.

Além disto, a localização ubíqua em diferentes compartimentos celulares indica sua possível participação em vários processos biológicos nos parasitos como sugerido em estudos com *Leishmania braziliensis* e promastigotas de *Leishmania amazonensis* realizados por Detoni *et al.* (2013), Porcino *et al.* (2012) e em *T. Cruzi* por Mariotini-Moura *et al.* (2014).

3.2.4 Papel da E-NTPDásica *in vivo* em relação à adesão e infecção em células VERO

3.2.4.1 Avaliação do papel da NTPDase-1 na adesão celular

Os ensaios de adesão foram realizados usando epimastigotas da cepa Y na fase logarítmica de crescimento cultivados em meio LIT, 8º dia (Tabela 2) e ressuspensos em meio RPMI 5%. Células VERO foram usadas como modelo de célula de mamífero. Os ensaios foram conduzidos a 4°C durante 30 minutos, como anteriormente descrito (BISSAGIO *et al.*, 2003).

As células foram previamente incubadas na presença de proteína recombinante purificada, em quantidades crescentes (Figura 16). Observou-se uma inibição da adesão, dose dependente.

Diante desses resultados, pode-se observar a influência da proteína na 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. Assim, quanto maior a concentração de proteína recombinante, maior a possibilidade desta interagir com o receptor presente na células hospedeira e portanto, menor a capacidade de adesão dos parasitos as células VERO. Indicando assim, a presença de sítios ligantes na célula hospedeira que estariam sendo

parcialmente bloqueados pelas proteínas recombinantes. A especificidade desta ligação foi demonstrada pela ausência de efeito inibidor quando o ensaio foi realizado na presença de uma proteína não relacionada (albumina) ou da NTPDase-1 desnaturada por calor.

Estes dados foram recentemente publicados por nosso grupo que investigou se a NTPDase-1 na cepa Y, teria papel na adesão dos parasitos a célula hospedeira e verificou tanto por ação de anticorpos policlonais quanto por competição com a proteína recombinante NTPDase-1 que a mesma participa sim da adesão celular (MARIOTINI-MOURA et al., 2014).

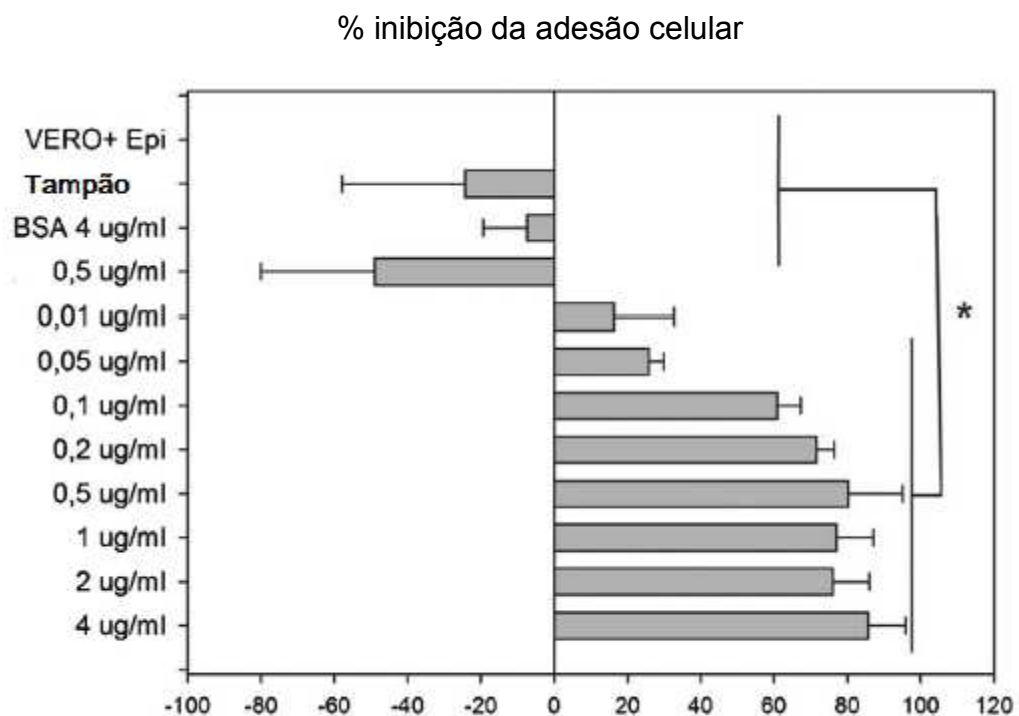


Figura 16: Avaliação do papel da NTPDase-1 de *T. cruzi* na adesão celular à célula hospedeira. Células VERO foram colocadas na presença, em diferentes concentrações da NTPDase-1 recombinante de *T. cruzi*, por 5 minutos (0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 µg/mL). Epimastigotas (cepa Y) foram então adicionados (20 parasitos/ célula) Após a incubação, as lamínulas foram lavadas, fixadas, coradas por Giemsa e analisadas por microscopia de luz. Albumina (4 µg/mL), Tampão de eluição da proteína recombinante, proteína desnaturada (0,5 µg/ml) e epimastigotas (VERO + epimastigotas) foram utilizados como controle. Os dados são relativos a média de três experimentos independentes. Fonte: (Mariotini-Moura et al., 2014)

3.2.5 Efeito do meio de cultura na atividade ectonucleotidásica e localização subcelular da NTPDase-1

Para estudarmos a NTPDase-1 da cepa Colombiana de *T. cruzi*, inicialmente investigamos o efeito dos meios de cultura LIT e Grace's nos parasitos. O meio LIT é um meio de cultura muito utilizado para identificação, isolamento e manutenção de formas epimastigotas de *T. cruzi*, sendo um meio complexo composto por sais, triptose, extrato de fígado, hemina ou hemoglobina. O meio Grace's 20% SFB é meio considerado "pobre" em nucleotídeos. Os parasitos foram crescidos nos dois meios de cultura.

A figura 16, apresenta as curvas de crescimento de epimastigotas da cepa Colombiana em meio LIT e Grace's pH 7, suplementado com 10% e 20% SFB, no decorrer de 10 dias. As curvas de crescimento foram iniciadas com 10 mL de meio, onde foi adicionado 1×10^5 parasitos/mL.

O crescimento dos parasitos em meio LIT e Grace's 10% e Grace's 20% se diferenciaram. Em meio Grace's 20% SFB, os parasitos iniciaram a fase estacionária por volta do 5º dia e se manteve constante até o 10º dia. Os experimentos foram realizados no 3º dia, início da fase exponencial, e 5º dia, fim da fase exponencial e início fase estacionária. Em Grace's 10% os parasitos tiveram um pico de crescimento no 8º dia e logo após começaram a morrer sem ter uma fase estacionária bem estabelecida. Os experimentos em meio LIT foram realizados no 6º dia, fase exponencial e 8º dia no fim da fase exponencial e início da fase estacionária.

O meio Grace's 10% SFB não foi utilizado para crescimento de parasitos para realização dos experimentos.

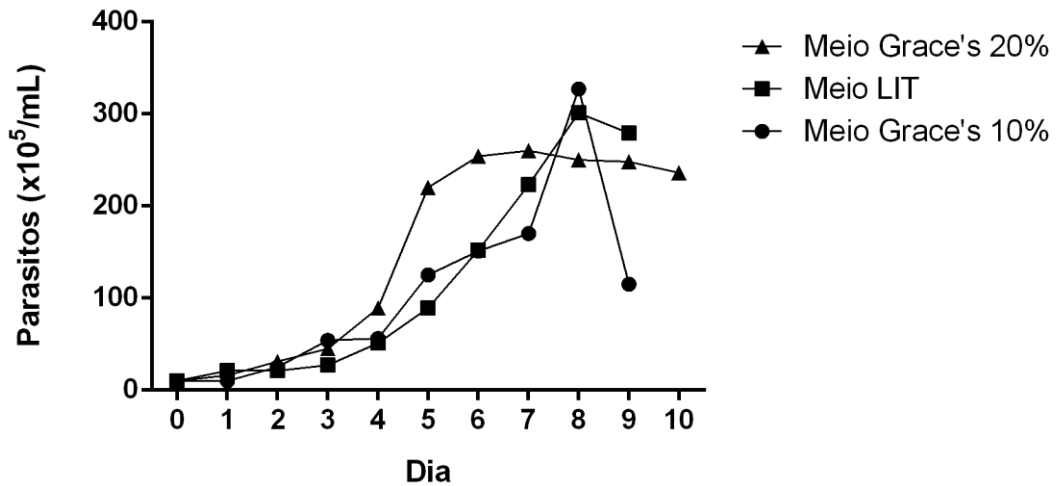


Figura 17: Curva de crescimento de epimastigotas da cepa Colombiana em três meios diferentes. Os meios utilizados foram Grace's 20% SFB, Grace's 10% SFB e Meio LIT. As curvas iniciaram com 1×10^5 parasitos/mL e a contagem de parasitos foi realizada em câmara de Neubauer em triplicata diariamente.

3.2.6 Comparação da atividade ectonucleotidásica de *T. cruzi* entre os meios LIT e Grace's à 28 e 37°C

Como descrito por SILVA-GOMES *et al.* (2014), o parasito *T. cruzi* é exposto a diferentes ambientes e temperaturas durante seu ciclo de vida. Parasitos expostos a uma temperatura de 37°C tem sua maquinaria de expressão de proteínas super- expressas, como as proteínas de choque térmico, que são importantes para invasão e proliferação dos parasitos (RODRIGUES *et al.*, 2010). Assim, como a NTPDase-1 tem mostrado ser importante para infecção deste parasito, avaliou-se o efeito da temperatura e do meio de cultura sobre a atividade NTPDase-1 de *T. cruzi*, em epimastigotas da cepa colombiana. Assim, os parasitos foram crescidos à 28°C nos meios LIT e Grace's 20% SFB e então submetidos ou não ao choque térmico à 37°C por duas horas. Em seguida foram feitas as medidas de atividade ectonucleotidásica que foi realizada a 37°C como descrito anteriormente (SANTOS *et al.*, 2009; MARIOTINI-MOURA *et al.*, 2014).

As figuras 18 e 19 apresentam a comparação da atividade enzimática da NTPDase-1 de *T. cruzi* da cepa colombiana, entre os meios LIT e Grace's, nas fases exponencial e estacionária e nas diferentes temperaturas, 28°C e 37°C respectivamente.

28°C

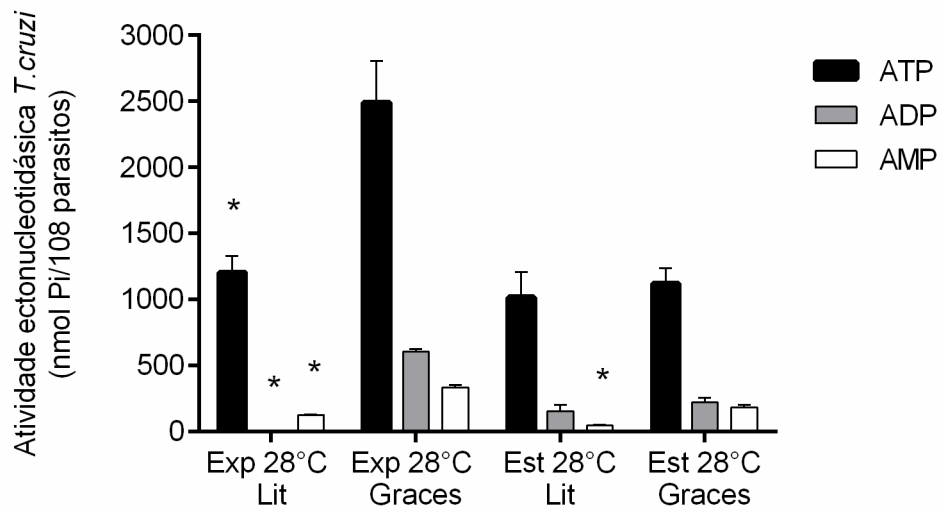


Figura 18: Comparação da atividade ectonucleotídica de *T. cruzi* entre o meio LIT e o meio Grace' a 28° nas fases exponencial e estacionária.

* Diferença estatística significativa entre os meios. $p \leq 0.05$.
Utilizou-se teste T.

37°C

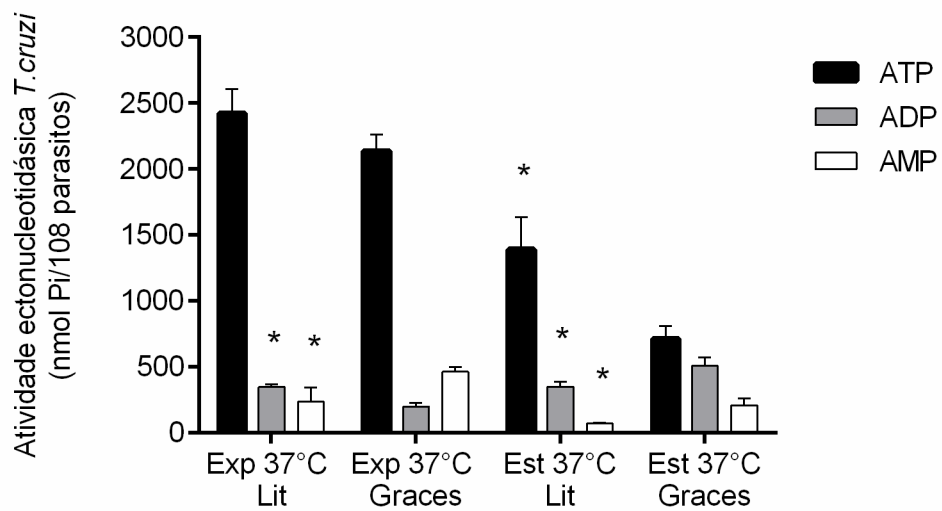


Figura 19: Comparação da atividade ectonucleotídica de *T. cruzi* entre o meio LIT e o meio Grace' a 37° nas fases exponencial e estacionária.

* Diferença estatística significativa entre os meios. $p \leq 0.05$.
Utilizou-se teste T.

Na figura 18, observou-se diferença estatística significativa entre os meios LIT e Grace's na fase exponencial a 28°C, sendo que a hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP foram maiores para o meio Grace's. Já na fase estacionária a 28°C observou-se diferença estatística significativa somente para hidrólise de AMP, que foi maior em meio Grace's. Na figura 18, existiu diferença estatística significativa, na fase exponencial, para hidrólise de ADP, que foi maior em meio LIT e AMP que foi maior em meio Grace's. Também houve diferença estatística significativa, na fase estacionária, sendo a hidrólise de ATP maior em meio LIT e as hidrólises de ADP e AMP maior em meio Grace's.

Ao se analisar a influência do meio de cultivo na atividade ectonucleotidásica de *T. cruzi* nas diferentes temperaturas, a 28°C (Figura 18) e 37°C (Figura 19), observou-se maior hidrólise dos nucleotídeos em meio Grace's 20% sem choque térmico, na fase exponencial. Este resultado pode ser explicado pelo fato do meio Grace's ser um meio com composição definida, deficiente em nucleotídeos quando comparado ao meio LIT. Isso por sua vez, aumentaria o estresse e a necessidade de aumento de atividade de enzimas facilitadoras da captação de nutrientes como as ectonucleotidases em geral e NTPDase-1 (ATPase e ADPase) e 5-nucleotidase (AMPase). Na fase estacionária à 28°C (Figura 18) não houve diferença significativa entre os meios, com exceção da hidrólise de AMP que foi significativamente maior no meio Grace's à 28°C. Quando os parasitos foram cultivados em meio LIT, na fase exponencial e foram submetidos a choque térmico, a atividade ATPásica se tornou maior e similar a hidrólise de ATP em meio Grace's tanto a 28°C, quanto com choque térmico. Isso pode explicar também a maior hidrólise de ADP em LIT/37°C devido a quebra de ATP gerando mais ADP no sistema reacional. Na fase estacionária ocorreu aumento da atividade ATPásica em relação à 28° somente em meio LIT. Sugerindo que o choque térmico parece induzir realmente a um estresse celular comparável ao causado por um meio nutricionalmente mais pobre em nucleotídeos como o meio Grace's.

3.2.7 Efeito do choque térmico na atividade ectonucleotidásica dos parasitos cultivados em meio LIT e Grace's 20% SFB

Neste tópicó será apresentado os dados de atividade ectonucleotidásica enfocando o efeito do choque térmico de 28°C para 37°C, considerando separadamente os meios de cultura (LIT e Grace's) e comparando as fases de crescimento.

A figura 20 apresenta a atividade ectonucleotidásica de *T. cruzi* em meio LIT, em parasitos mantidos a 28°C e submetidos a choque térmico de 37°C por 2 horas, as medidas foram realizadas nas fases exponencial e estacionária.

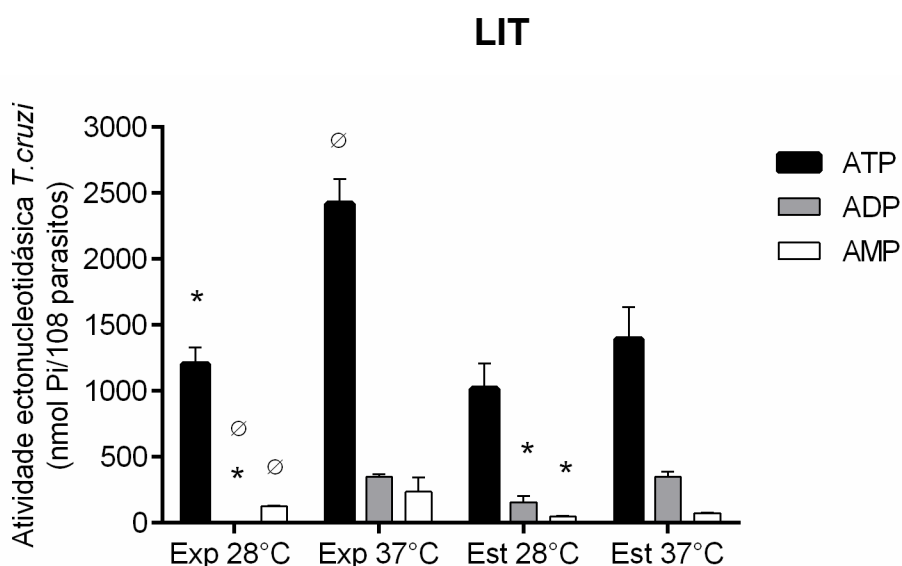


Figura 20: Atividade ectonucleotidásica de *T. cruzi* em meio LIT sem e com choque térmico e nas fases exponencial e estacionária.

* Diferença estatística significativa entre as temperaturas nas mesmas fases $p \leq 0.01$.

⊘ Diferença estatística significativa entre as fases para mesma temperatura $p \leq 0.01$.

Utilizou-se teste T.

Na figura 20, observa-se diferença estatística significativa entre as temperaturas 28° e 37° na fase exponencial, onde a hidrólise de ATP e ADP foi maior a 37°C. Na fase estacionária, não existiu diferença estatística significativa entre as temperaturas 28° e 37°C, para a hidrólise de ATP, embora tenha ocorrido aumento da atividade ADPásica e AMPásica à 37°C. Estes dados evidenciam que o estresse de aumento da temperatura é capaz de induzir ao aumento da atividade ectonucleotidásica. Ainda, considerando que a NTPDase-

1 de *T. cruzi* hidrolisa ATP e ADP a ausência de atividade ADPásica em fase EXP 28°C e a presença desta em EXP 37°C pode sugerir um aumento desta enzima. Comparando agora as fases exponencial (EXP) e estacionária (EST) observa-se também diferença estatística significativa entre a mesma temperatura. Assim, a 28°C, na fase exponencial a hidrólise de ADP e AMP foi menor que na fase estacionária, não se observou diferença estatística significativa para hidrólise de ATP, considerando novamente o aparecimento de atividade ADPásica na fase EST 28°C que era ausente na fase EXP 28°C, podemos também sugerir a hipótese de aumento da atividade NTPDase-1 como discutido no dado anterior. A 37°C, na fase exponencial, observou-se diferença estatística significativa para hidrólise de ATP, sendo esta maior do que na fase EST. Não existiu diferença estatística significativa para ADP e AMP nas fases exponencial e estacionária. Neste caso, pode ser que o próprio estresse de temperatura seja indutor de um aumento do estresse, levando ao aumento da atividade ectonucleotidásica que somado ao efeito acumulativo do estresse nutricional na fase estacionária limitaria o aumento destas enzimas, ou seja seriam dois estresses cumulativos: temperatura e nutricional, sendo este último presente somente no fim da fase exponencial e na fase estacionária. Outra forma de discutir este dado é em relação à disponibilidade de substrato para estas enzimas que pode ser escasso na fase estacionária induzindo ou não aumento ou diminuição das atividades das enzimas relacionadas.

A figura 21 apresenta a atividade ectonucleotidásica de *T. cruzi* em meio Grace's 20% SFB, em parasitos mantidos a 28°C e submetidos a choque térmico a 37°C por 2 horas, as medidas foram realizadas nas fases exponencial e estacionária.

GRACE'S 20%

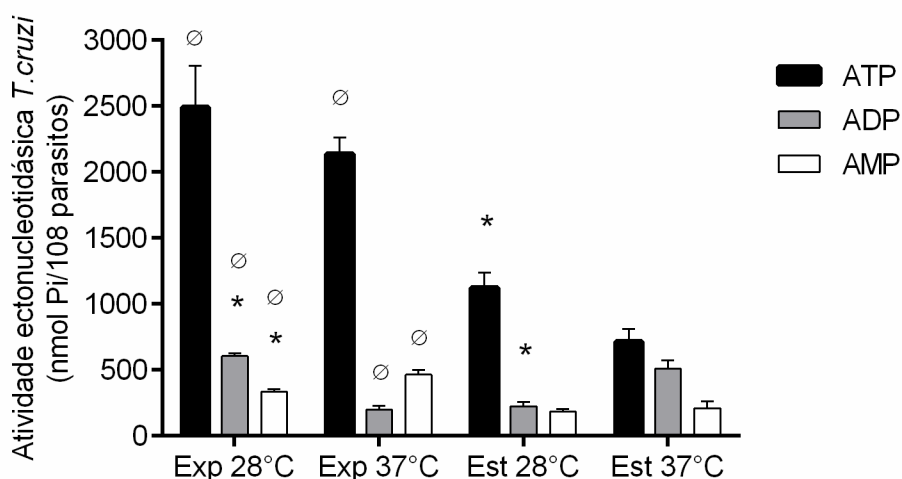


Figura 21: Atividade ectonucleotidásica de *T. cruzi* em meio Grace's 20% (SFB) sem e com choque térmico e nas fases exponencial e estacionária.

* Diferença estatística significativa entre as temperaturas nas mesmas fases $p \leq 0.01$.

⊗ Diferença estatística significativa entre as fases para mesma temperatura $p \leq 0.01$.

Utilizou-se teste T.

Observa-se na figura 21, diferença estatística significativa entre as temperaturas de 28°C e 37°C, na fase exponencial, para ADP e AMP, sendo a hidrólise maior para o ADP a 28°C e para AMP a 37°C. Na fase estacionária houve diferença estatística significativa para hidrólise de ATP e ADP, sendo a hidrólise de ATP maior a 28°C e a hidrólise de ADP maior a 37°C. Também vê-se diferença estatística significativa, para ATP, ADP e AMP, a 28°C quando comparou-se as fases exponencial e estacionária, onde observa-se maior hidrólise na fase exponencial. Além disto houve diferença estatística significativa a 37°C, para as fases exponencial e estacionária. A hidrólise de ATP e AMP foi maior na fase exponencial e ADP na fase estacionária. Novamente, parece que o meio mais pobre em nucleotídeos é um estresse suficiente para induzir o aumento da atividade ectonucleotidásica e que o acúmulo dos estresses com o aumento da temperatura tem efeito menos significativo do que o observado para um meio rico como o LIT. Já o acúmulo dos estresses de meio pobre (Grace's) e maior carência de nutrientes na fase estacionária induz a diminuição especialmente significativa da hidrólise de ATP.

No geral, de acordo com os resultados apresentados a atividade ectonucleotidásica de *T. cruzi*, em meio LIT, quando submetido à choque térmico, mostrou diferença estatística significativa na fase exponencial. Desta forma,

o choque térmico em meio LIT mostrou-se mais eficaz para aumentar a atividade ectonucleotidásica quando comparado a temperatura de 28°C. Ao utilizar meio LIT para crescimento de parasitos é interessante submeter os parasitos da forma epimastigotas ao choque térmico. Resultados semelhantes foram observados por Giarola et al. (2013), onde a atividade ecto-ATPase foi aumentada após choque térmico de 37°C por duas horas e permanecendo estável por 3 horas.

Quando se analisou o efeito do choque térmico em meio Grace's 20% foi observado que o stress térmico não aumentou atividade ATPase quando comparada atividade a 28°C independente da fase estudada, sugerindo que o estresse nutricional do próprio meio atua de forma direta suficiente para aumentar a atividade ectonucleotidásica. Quando se comparou as fases exponencial e estacionária tanto a 28°C quanto a 37°, a atividade ATPase foi maior na fase exponencial. Estes resultados em meio Grace's podem ser devido a adaptação do parasito as condições de stress do meio, estes necessitam da captação de purinas do meio, o que gera o aumento da atividade, pois como dito este é um meio mais pobre nutricionalmente.

3.2.8 Participação da NTPDase-1 na atividade ectonucleotidásica em diferentes meios de cultura e sob choque térmico

Em seguida, para avaliar a contribuição da NTPDase-1 de *T. cruzi* na atividade ectonucleotidásica estudada aqui, realizamos os mesmos ensaios, agora na presença de um inibidor suramina, uma naftiluréia polissulfonada, que inibe em cerca de 70% a atividade ecto-ATPDásica da cepa Y e a NTPDase-1 recombinante da cepa Y (BISSAGIO *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2009).

Assim nas figuras 22 e 23 apresentam a porcentagem de inibição da atividade ATPDásica da cepa Colombiana, nos meios LIT e Grace's, fases exponencial e estacionária, com e sem choque térmico, em presença do inibidor suramina,

Em meio LIT (Figura 22) observa-se, na fase exponencial, a porcentagem de inibição ATPásica de 40% e ADPásica de 64%. Sugerindo que pelo menos estes percentuais devem ser relativos a contribuição da NTPDase-1 na atividade total, já que não podemos afirmar com segurança que este inibidor seja específico. Além disto, pode ser que a NTPDase-1 não seja inibida completamente, como mostrado por Santos *et al.* (2009). Do mesmo modo, após

o choque térmico a inibição ATPásica aumentou para 92% e a ADPásica foi de 60% apresentando pouca diferença. Já na fase estacionária a hidrólise de ATP foi inibida em 44% e ADP em 84%. Após o choque térmico a inibição ATPásica foi de 30% e 44% para a ADPásica. De modo geral observou-se que em meio LIT cerca de 50% da atividade ectonucleotidásica deve ser referente a NTPDase-1.

Em meio Grace's 20% SFB (Figura 23), observa-se que na fase exponencial a atividade ATPásica foi inibida 54% e ADPásica não foi inibido. Quando os parasitos foram submetidos ao choque térmico a inibição ATPásica diminuiu para 46% e a ADPásica foi de 100%. Na fase estacionária a porcentagem de inibição foi de 66% para ATPase e após o choque térmico ocorreu a inibição da atividade ATPase para 8%, entretanto a ADPase não foi inibida. Assim para o parasito crescido em meio Grace's pelo menos 50% da atividade ATPDásica (EXP 28°C; EXP 37°C; EST 28°C) e toda atividade ADPásica (EXP 37°C) deve ser devida a atividade NTPDase-1.

Todos estes dados conjuntamente estão apresentados na tabela 4 e mostram que a contribuição da NTPDase-1 na atividade ectonucleotidásica da cepa colombiana de *T. cruzi* é bastante significativa.

Estas variações observadas no perfil de inibição da hidrólise dos nucleotídeos extracelulares ATP e ADP, pela suramina, podem ser devido a vários fatores como, modificações na expressão gênica, modificações diretas no estado de ativação destas proteínas ou mesmo alterações de localização subcelular ou alteração da atividade ecto-nucleotidásica de outras enzimas (MEYER-FERNANDES *et al.*, 2004).

LIT

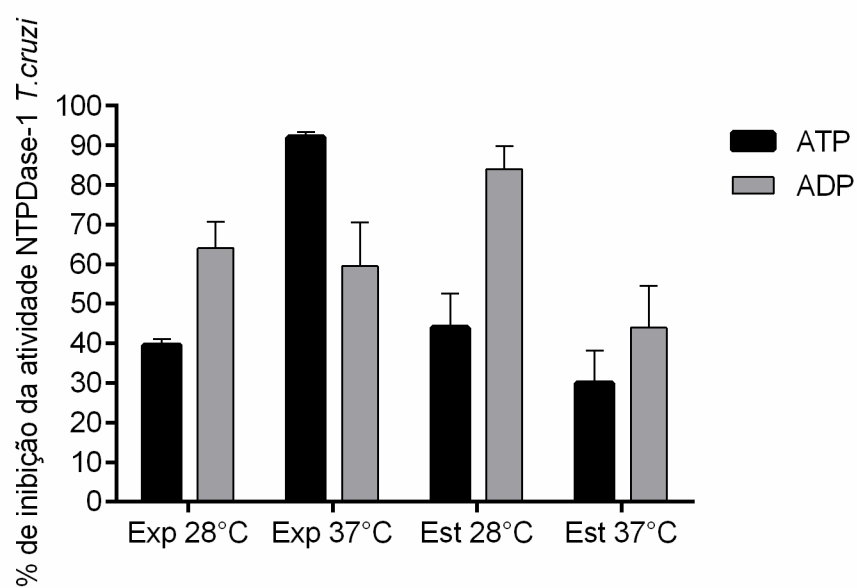


Figura 22: Porcentagem de inibição da atividade NTPDase-1 de *T. cruzi* em meio LIT. Atividade foi medida com os parasitos mantidos a 28°C e parasitos submetidos ao choque térmico, 37°C por duas horas, nas fases exponencial e estacionária, na presença de 1 mM de suramina.

GRACE'S 20%

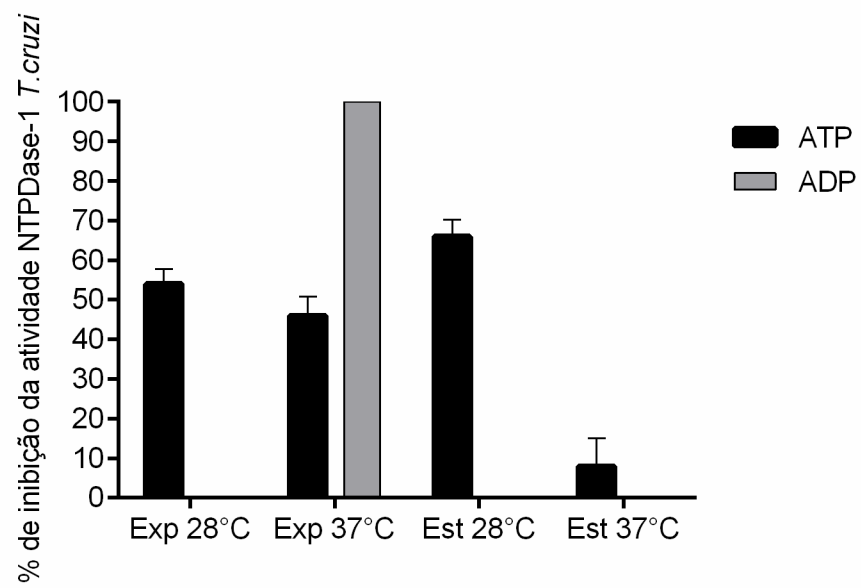


Figura 23: Porcentagem de inibição da atividade NTPDase-1 de *T. cruzi* em meio Grace's 20% SFB. Atividade foi medida com os parasitos mantidos a 28°C e parasitos submetidos ao choque térmico, 37°C por duas horas, e nas fases exponencial e estacionária, na presença de 1 mM de suramina.

Tabela 4. Atividade relativa NTPDase-1 (% nmol Pi/10⁸ parasitos/1h) da cepa Colombiana de *T. cruzi* em presença de 1mM de suramina

Relativa atividade Ecto-NTPDase da cepa Colombiana de <i>T. cruzi</i> (% nmol Pi/10 ⁸ parasitos/1h)								
	Substrato							
Epimastigostas	% relativa de ATP	% inibição de ATP	Controle ATP nmol Pi/10 ⁸ parasitos/1h	ATP (suramina) nmol Pi/10 ⁸ parasitos/1h	% relativa de ADP	% Inibição de ADP	Controle ADP nmol Pi/10 ⁸ parasitos/1h	ADP (suramina) nmol Pi/10 ⁸ parasitos/1h
Fase exponencial meio Grace's 20%	45,85 ± 3,82	54 ± 3,82	1543,05 ± 118,55 (n=3)	696,854 ± 11,978(n=3)	169,95 ± 23,58	0	239,86 ± 49,83 (n=3)	401,584 ± 52,391(n=3)
Fase exponencial meio Grace's 20% 37°C	54,09 ± 4,768	46 ± 4,768	1387,06 ± 101,48 (n=3)	747,679 ± 39,517(n=3)	0	100	404,88 ± 37,48(n=3)	0 (n=3)
Fase estacionária meio Grace's 20%	43,60 ± 4,225	66,4 ± 4,225	1493,333 ± 12,164 (n=3)	648,009 ± 18,544 (n=3)	137,854 ± 27,889	0	266,271 ± 40,014 (n=3)	361,980 ± 49,504 (n=3)
Fase estacionária meio Grace's 20% 37°C	91,815 ± 7,026	8 ± 7,026	1007,745 ± 93,194(n=3)	922,156 ± 62,373(n=3)	500,776 ± 30,829	0	78,152 ± 15,12 (n=3)	378,482± 30,248(n=3)
Fase exponencial meio LIT	60,58 ± 1,63	39,5 ± 1,63	1.062,5 ± 40,48 (n=3)	644,048 ± 39,72(n=3)	36,4 ± 6,7	64 ± 6,7	728,31 ± 52,39 (n=3)	262,970 ±35,698(n=3)
Fase exponencial meio LIT 37°C	7,9 ± 1,29	92 ± 1,29	1.121,72 ± 56,16 (n=3)	88,053 ± 10,985 (n=3)	40,5 ±11	59,5 ±11	319,17 ± 58,01 (n=3)	121,056 ±7,5620 (n=3)
Fase estacionária meio LIT	55,83 ± 8,6	44 ± 8,6	1.258 ± 53,46 (n=3)	699,494 ± 78,348(n=3)	16,16 ± 5,84	84 ± 5,84	296 ± 75,62 (n=3)	45,149 ±9,900(n=3)
Fase estacionária meio LIT 37°C	70,37 ± 8,26	30 ± 8,26	838,10 ± 53,61 (n=3)	588,383 ± 62,706(n=3)	55,29 ± 10,47	44 ± 10,47	348,78 ± 49,83 (n=3)	190,363 ±22,865(n=3)

3.2.9 Imunolocalização da NTPDase-1 da cepa Colombiana de *T. cruzi*

Microscopia eletrônica de transmissão foi realizada para se verificar a presença da NTPDase-1 em parasitos da cepa Colombiana, fase exponencial, cultivada em meio Grace's 20% SFB, sem e com choque térmico, a fim de se comparar diferenças nos parasitos em temperaturas diferentes. Foi usado anticorpo policlonal anti-NTPDase-1 da cepa Y e anticorpo secundário conjugado a ouro coloidal de 10 nm.

As figuras 24, 25, 26 e 27 apresentam fotomicrografias eletrônicas de transmissão de epimastigotas da cepa Colombiana.

A Figura 24 mostra a localização celular da E-NTPDase-1 em epimastigotas de *T. cruzi* cepa Colombiana, cultivados em meio Grace's, em fase exponencial, sem choque térmico, observa-se marcação no Núcleo (N) (seta branca), superfície (seta preta pontilhada), flagelo (F) (seta preta), bolsa flagelar (cabeça de seta preta), cinetoplasto (k) (cabeça de seta branca) e citoplasma (seta pontilhada branca). Não foram observadas marcações no controle (Figura 25). Na Figura 24,

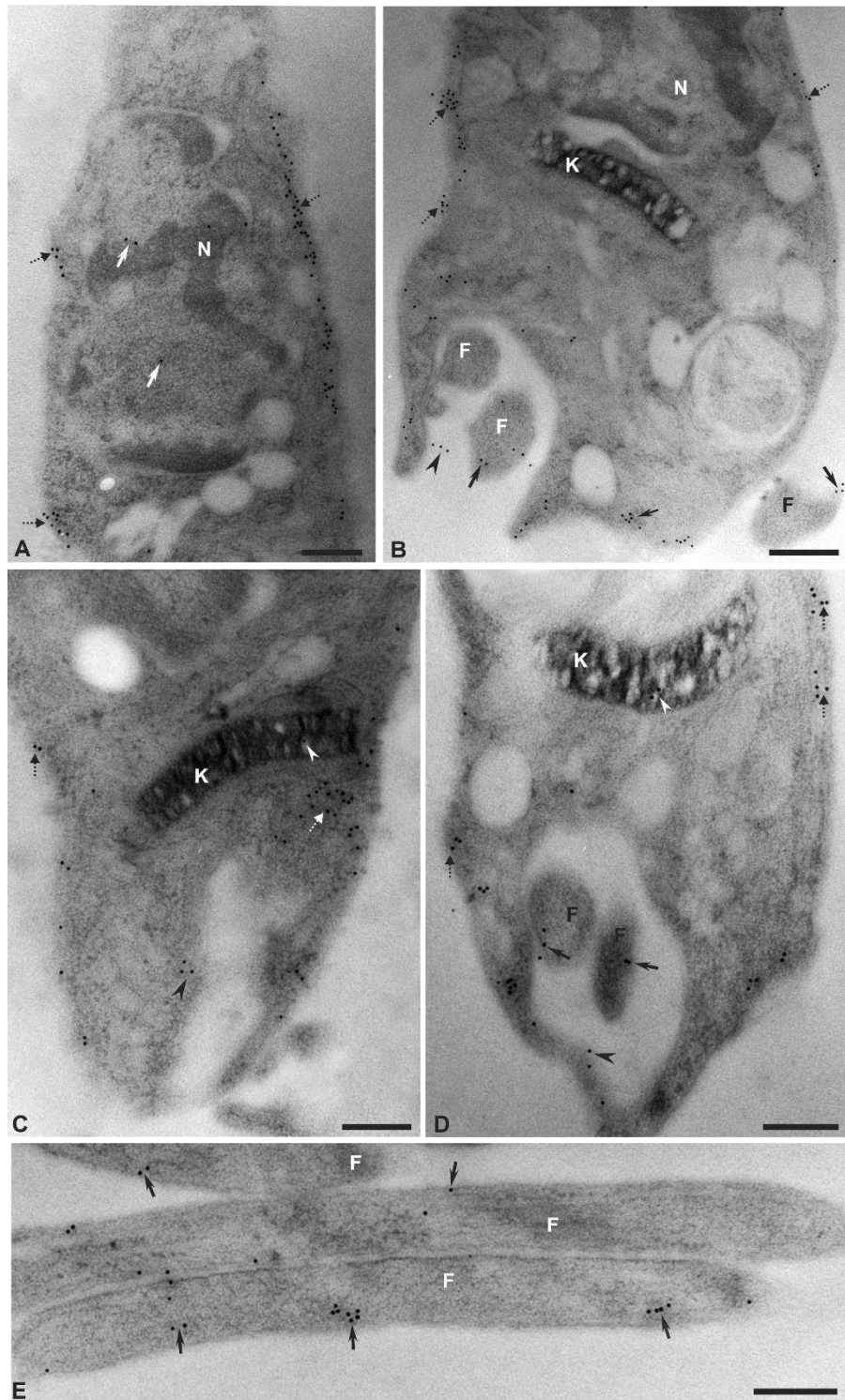


Figura 24: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão mostrando localização celular da E-NTPDase-1 em epimastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi*, cultivados em meio Grace's 20% SFB, fase exponencial, sem choque térmico. Foi usado anticorpo policlonal anti-NTPDase-1 da cepa Y e anticorpo secundário conjugado a ouro coloidal de 10 nm. (A-E). Parasitos mostrando imunolocalização no Núcleo (N) (seta branca), superfície (seta preta pontilhada), flagelo (F) (seta preta), bolsa flagelar (cabeça de seta preta), cinetoplasto (k) (cabeça de seta branca), citoplasma (seta pontilhada branca). Marcações não foram observadas nos parasitos controle, dados não mostrados. Barras: A, C, D e E = 0,2 μ m, B = 0,3 μ m.

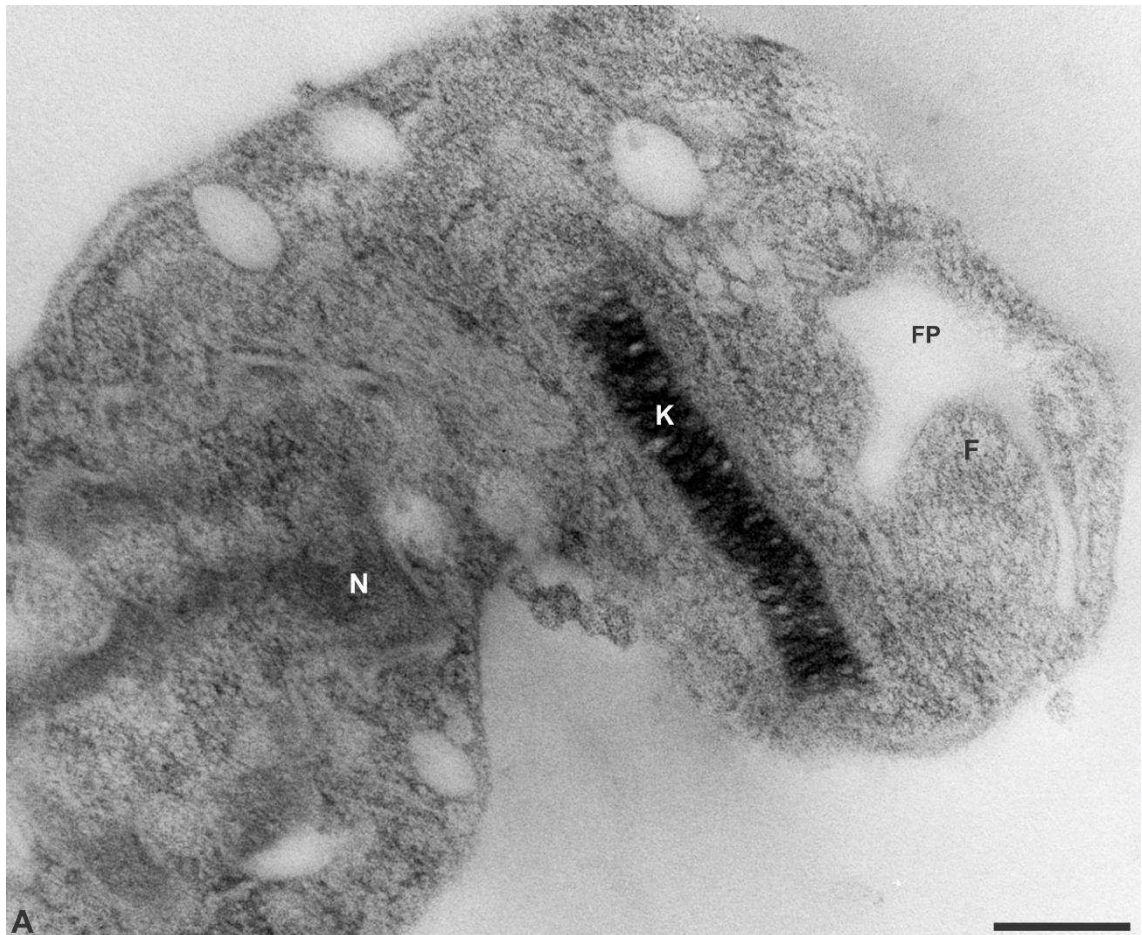


Figura 25: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão em epimastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi*, cultivados em meio Grace's 20% SFB, fase exponencial, sem choque térmico. Controle. Foi usado anticorpo secundário conjugado a ouro coloidal de 10 nm. Marcações não foram observadas nos parasitos controle, Núcleo (N), Superfície celular, Flagelo (F), Bolsa flagelar, Cinetoplasto (k), Citoplasma Barras: A = 0,2 μ m.

A Figura 26, mostra epimastigotas de *T. cruzi* cepa Colombiana, cultivados em meio Grace's, em fase exponencial, submetidos a choque térmico de 2 horas a 37°C, observa-se marcação no Núcleo (N) (seta branca), superfície (seta preta pontilhada), flagelo (F) (seta preta), bolsa flagelar (cabeça de seta preta), cinetoplasto (k) (cabeça de seta branca), citoplasma (seta pontilhada branca). Não foram observadas marcações no controle (Figura 27).

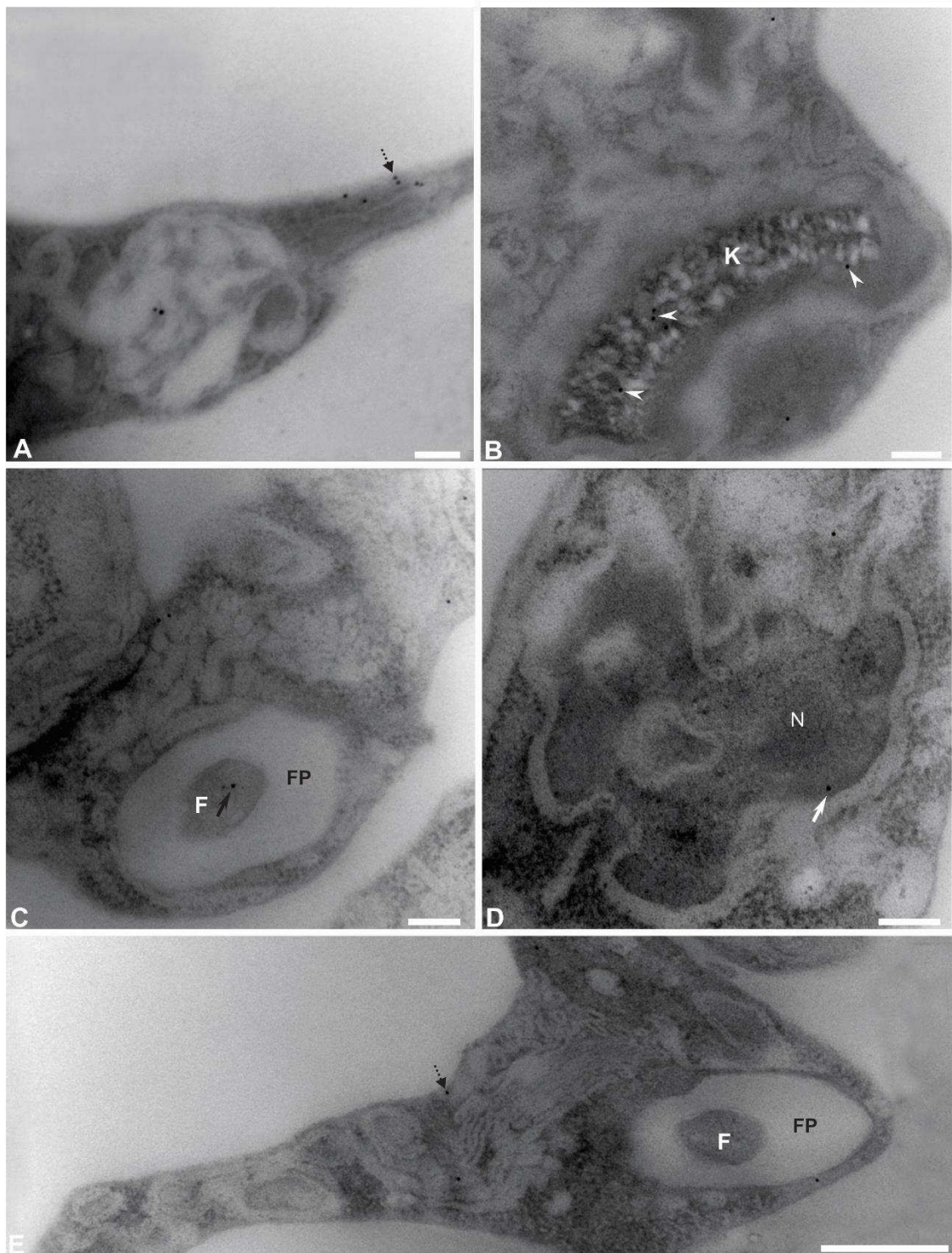


Figura 26: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão mostrando localização celular da E-NTPDase-1 em epimastigotas de *T. cruzi* cepa Colombiana, cultivados em meio Grace's 20% SFB, fase exponencial, submetidos a choque térmico de 2 horas a 37°C. Foi usado anticorpo policlonal anti-NTPDase-1 e anticorpo secundário conjugado a ouro coloidal de 10 nm. (A-E). Parasitos mostrando imunolocalização no reservossomo (R) (seta pontilhada branca), Cinetoplasto (k) (cabeça de seta branca), citoplasma (círculo pontilhado), superfície (seta pontilhada preta), flagelo (F) (seta preta), núcleo (N) (seta pontilhada branca). Barras: A-D = 0,2 μ m, E = 0,5 μ m.

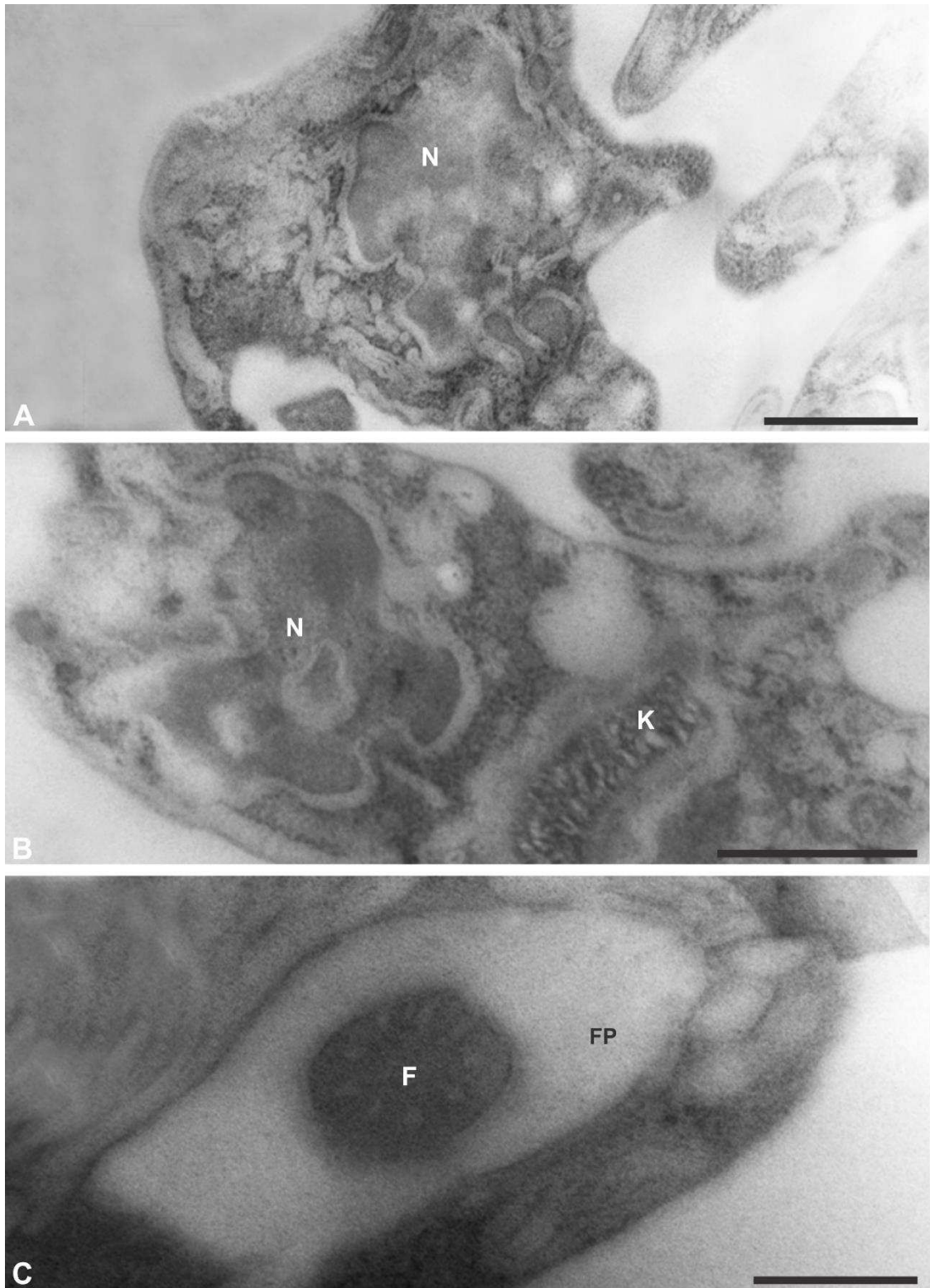


Figura 27: Fotomicrografias Eletrônicas de Transmissão de epimastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi*, cultivados em meio Grace's 20% SFB, fase exponencial, submetidos a choque térmico de 2 horas a 37°C. Controle. Foi usado anticorpo secundário conjugado a ouro coloidal de 10 nm. (A-C). Parasitos sem imunomarcção no Cinetoplasto (K), Citoplasma, Superfície celular, Flagelo (F), Bolsa flagelar (PF), Núcleo (N). Barras: A-B = 0,5 μ m, C = 0,2 μ m.

Nos parasitos sem choque as marcações foram mais intensas, dados que corroboram com a maior atividade ectonucleotidásica nos parasitos crescidos em meio Grace's 20%, fase exponencial, sem choque, dados presentes na Tabela 4.

As localizações em várias organelas sugerem a participação da NTPDase-1 em diversos processos celulares, sendo que sua localização no flagelo e próximo a bolsa flagelar reforça sua participação na aquisição de nutrientes.

3.2.10 Participação da NTPDase-1 da cepa Colombiana de *T. cruzi* na adesão a célula hospedeira

O próximo passo nesta pesquisa foi então avaliar se a NTPDase-1 da cepa Colombiana influenciaria a adesão à célula hospedeira como mostrado para cepa Y (MARIOTINI-MOURA *et al.*, 2014). O Ensaio de adesão foi realizado na ausência ou presença de anticorpos policlonais anti-TcNTPDase-1, como forma de analisar esta proteína especificamente. Os parasitos utilizados para este ensaio foram os epimastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi*, cultivados em meio Grace's 20%, fase exponencial, sem choque térmico, e com choque, pois sem choque apresentaram uma diferença significativa e maior atividade ectonucleotidásica do que os parasitos que foram submetidos ao choque térmico.

A Figura 28, mostra a participação da NTPDase-1 de *T. cruzi* da cepa Colombiana na adesão celular na presença ou ausência de anticorpos anti-TcNTPDase-1, observa-se redução na porcentagem de parasitos aderidos quando na presença de anti-TcNTPDase-1, na Figura 28 A houve redução de 44,11% e em B redução de 40% na adesão. Estes resultados mostram que a atividade ectonucleotidásica aumentada e maior expressão geral da NTPDase-1 observada por microscopia eletrônica em epimastigotas da cepa Colombiana, cultivados em meio Grace's 20% SFB, fase exponencial e sem choque (Figura 24) não resultou em uma maior inibição da adesão em presença de anticorpos anti-TcNTPDase-1. Esperava-se que a maior atividade enzimática, provavelmente resultante de maior expressão na superfície dos parasitos sem choque térmico resultasse em maior participação desta proteína na adesão dos

parasitos à célula hospedeira, porém isto não foi observado. Pode-se levantar pelo menos duas hipóteses para explicar esta divergência de resultados: 1) a localização na superfície pode ser condizente com a realidade da expressão da NTPDase-1 observada por microscopia eletrônica pois na técnica usada com incubação do anticorpo pós-processamento das células, sabe-se que há prejuízos significativos de marcação de proteínas de superfície; 2) ou ainda pode haver uma maior secreção da NTPDase-1 pelas células submetidas à choque térmico e estas proteínas secretadas. Não observadas por microscopia eletrônica poderiam bloquear também a adesão dos parasitos. O fato é que mais experimentos são necessários para avaliar melhor estas possibilidades. Apesar disto, de qualquer modo o uso dos anticorpos policlonais anti-NTPDase-1 mostram que em ambas as condições houve diminuição significativa da adesão dos parasitos à célula hospedeira, mostrando que esta proteína participa deste processo celular também na cepa colombiana e não somente na cepa Y.

GRACE'S 20% SFB

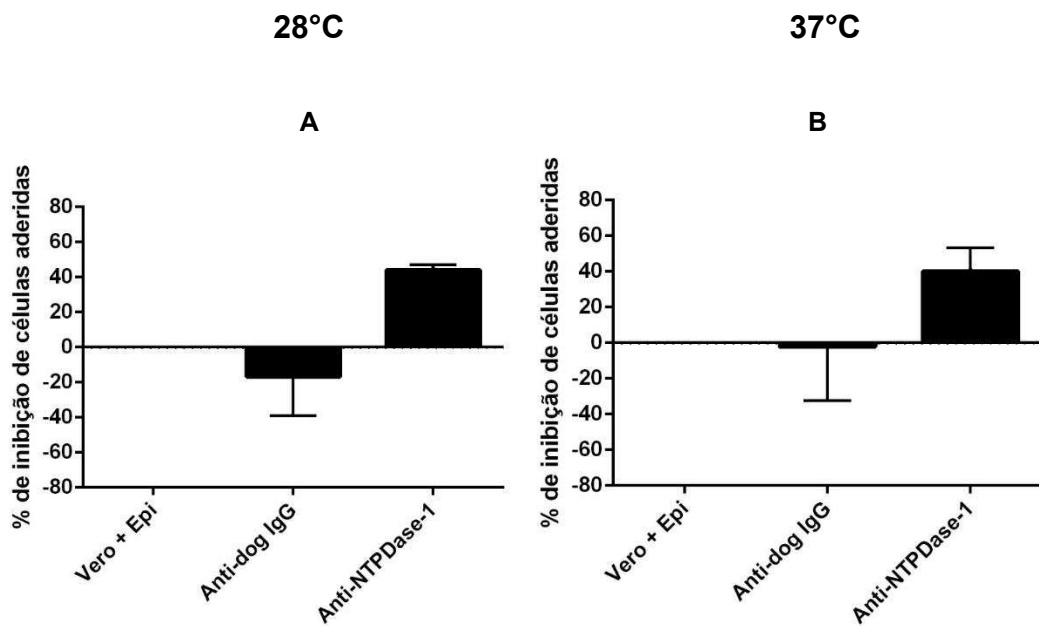


Figura 28: Participação da TcNTPDase-1 na adesão celular. Ensaio de adesão na presença ou ausência de anticorpos policlonais anti-TcNTPDase-1. (A) Epimastigotas cultivados em meio Grace's 20%, fase exponencial foram previamente incubados com anticorpos durante 10 minutos e, em seguida, colocados em contacto com células VERO (20:1). (B) Epimastigotas cultivados em meio Grace's 20%, fase exponencial e submetidos a choque térmico por 2 horas a 37°C foram previamente incubados com anticorpos durante 10 minutos e, em seguida, colocados em contacto com células VERO (20:1). Após a incubação, lamínulas foram lavadas, fixadas, coradas e analisadas por microscopia de luz. Anti-dog IgG (Santa Cruz Biotechnology®) e VERO com epimastigotas (VERO + Epi) foram utilizados como controles. Porcentagem de parasitos aderidos foi determinada pela contagem de 300 células em triplicata em cada lamínula teste. Os resultados são a média \pm DP a partir de pelo menos três experimentos independentes.

4. Capítulo 2:

Avaliação da atividade ectonucleotídica e localização celular de e-NTPDases em *Leishmania tarentolae*

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Cultivo de macrófagos

Os macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram cultivadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. O meio usado foi o RPMI-1640 (Sigma), pH 7,2, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (LGC Biotecnologia), 2mM de L-glutamina (Serva), 2 g/L de bicarbonato de sódio, 100 µg/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina (USB Corporation).

4.2.2 Cultivo de *Leishmania tarentolae*

Os parasitos foram obtidos comercialmente (LEXSinduce 2 expression kit).

Os parasitos foram cultivados a 25°C em meio BHI completo, [Hemina (concentração final 5µg/mL), PenStrep (penicilina 10,000 u/mL, estreptomicina 10,000 µg/mL), suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB).

Após o descongelamento e recuperação das células, os repiques foram feitos duas vezes por semana, a cada 3 dias. Na diluição de 1:10. Para realizar os experimentos formas promastigotas procíclicas foram utilizados no 2º dia de cultivo e as formas promastigotas metacíclicas foram recolhidas no 5º dia de cultivo.

4.2.3 Imunolocalização da E-NTPDase de *L. tarentolae* por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Análise por microscopia eletrônica foi realizada para imunolocalizar as NTPDases em nível ultraestrutural, as culturas de parasitos foram centrifugadas a 2000 g, por 10 minutos a 4°C, o pellet de parasitos foi lavado, duas vezes com PBS pH 7,2.

Os parasitos foram fixados em glutaraldeído 1%; formol 4%; CaCl₂ 5mM; 3,7% de sacarose e tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2, por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, os parasitos foram centrifugados nas mesmas condições e lavados, duas vezes, com tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 e centrifugados. A desidratação foi realizada inicialmente com etanol 50%, seguida de etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% duas vezes, por 10 minutos a

temperatura ambiente. Logo após, os parasitos foram infiltrados em solução de resina LR White e etanol 100% na proporção de 1:1 por 24 horas a 4°C, seguida de infiltração em solução 2:1 resina/etanol por 24 horas a 4°C, em resina pura por 24 horas a 4°C. Posteriormente, os parasitos foram incluídos em resina pura por 24 horas a 60°C. Seções ultrafinas, foram então cortadas em ultramicrotomo (Power Tome X – RMC products) com navalha de diamante (DIATOME), foram colocadas em grades de níquel 300 mesh. A imunomarcção foi realizada em câmara úmida, os cortes foram incubados com solução de cloreto de amônio 50mM em PBS, por 20 minutos a temperatura ambiente e passados para solução de bloqueio (albumina 1,5% em PBS pH 8, Tween 20 0,01%) por 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou o anticorpo primário anti-NTPDase-1 (SANTOS *et al.*, 2009), diluído 1:100 em PBS com albumina 1,5% pH 8,0 aos cortes que foram incubados overnight a 4°C. Após, os cortes foram lavados 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 (Sigma), diluído 1:30 em PBS com albumina 1,5% pH 8,0 e incubado-se por 2 horas. Lavou-se os cortes com água destilada, secou-se em papel de filtro. O contraste foi realizado no dia seguinte com acetato de uranila 3% por 20 minutos, lavou-se bem os cortes, secou-se em papel toalha e em seguida incubou-se com citrato de chumbo 0,2% por 5 minutos e secou em papel de filtro.

As amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 no núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (NMM).

4.2.4 Imunolocalização da E-NTPDase de *L. tarentolae* por microscopia confocal

A localização das NTPDases em promastigotas de *L. tarentolae* foi realizada por microscopia confocal.

Os experimentos foram em triplicatas biológica de teste e controle.

Os parasitos crescidos em meio BHI suplementados com 10% de SFB foram lavados com PBS, por duas vezes, e cerca 1×10^5 parasitos foram aderidos a lamínulas, previamente tratadas, com poli-lisina 0,1%, por 30 minutos a temperatura ambiente.

Logo após, as lamínulas foram lavadas, duas vezes, com PBS pH 7.2 e os parasitos fixados com paraformaldeído 4%, por 30 minutos e lavadas com PBS por 5 minutos, duas vezes.

Acetona 100% foi adicionada por 4 minutos para precipitar proteína e assim, fortalecer a marcação. Em seguida, lavou-se as lamínulas, três vezes, com PBS por 5 minutos, posteriormente, adicionou-se a solução de bloqueio (albumina 2% em PBS), por 30 minutos.

As lamínulas foram lavadas novamente com PBS e incubadas por 30 minutos com anticorpo primário, anti-LicNTPDase-2 (Vasconcellos *et al.*, 2014), diluído (1:50) na solução de bloqueio. As lamínulas controle não foram incubadas com anticorpo primário

Após serem lavadas, por 3 vezes com PBS, adicionou-se o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a Alexa GAR 488 (Invitrogen®), diluído (1:400), por 1 hora. Lavou-se, 3 vezes com PBS, por 5 minutos.

Em seguida, as lamínulas foram lavadas, três vezes com PBS 1X por 5 minutos e montadas com Prolong Gold com DAPI, seladas com esmalte.

As imagens foram obtidas em microscopio confocal LeicaR modelo TCS-SP5AOBS.

4.2.5 Caracterização Bioquímica da NTPDase de *Leishmania tarentolae*

4.2.5.1 Medidas de atividade E-NTPDásica *in vivo*

As atividades enzimáticas foram realizadas “*in vivo*” com o parasito *Leishmania tarentolae* pelo método colorimétrico de determinação de fosfato livre gerado pela hidrólise de nucleotídeos, método verde de malaquita (EK MAN e JAGER, 1993).

As reações foram realizadas, em triplicata de cultura e triplicata de testes para ATP, ADP e branco.

Os parasitos foram lavados por 3 vezes em salina 0,9% e ressuspensos em tampão de atividade 50mM de Tris pH=7,2; 50 mM de HEPES pH=7,2; 2,5mM de MgCl₂; 116mM de NaCl; 5,4mM de KCl e 5mM de glicose. Usou-se 1x10⁶ parasitos por reação.

Um mix contendo tampão de atividade e nucleotídeo a 5mM foi feito para cada nucleotídeo, separadamente, em tubo de 1,5 mL foi adicionado 100µL do

mix, incubado a 37°C e a reação disparada com 25µL da suspensão de parasitos. Após 1 hora minutos a reação foi parada com 125 µL de HCl 0,2M inclusive os brancos. Os brancos das reações continham o mix tampão e nucleotídeo, exceto os parasitos que foram adicionados após parada da reação. Centrifugou-se a microplaca a 2000 xg por 5 minutos a 4°C.

Para determinação do fosfato livre transferiu-se 80µL de sobrenadante para outra placa, adicionou-se 80µL de tampão de atividade, em seguida 40µL de reagente colorimétrico (75% do volume total do reagente verde malaquita 0,2% e 25% do volume total de molibdato de amônio 10%, ambos ressuspendidos em HCl 4M), incubou-se por 10 minutos e a leitura foi realizada a 650nm em leitora de microplaca *Thermo Plate* (TP-Reader).

4.2.6 Expressão e purificação da LicNTPDase-2 de *Leishmania infantum chagasi* para ensaios de competição

A LicNTPDase-2 foi expressa em sistema heterólogo bacteriano (pET21b/*E.coli*) purificação foi realizada por cromatografia de afinidade usando resina de níquel-agarose Ni-NTA Sigma® (VASCONCELLOS,2010; BASTOS, 2011). As amostras de proteína foram quantificadas pelo método de Bradford (Bio Rad®) e analisadas por SDS-PAGE 10% corado com coomassie blue (SAMBROOK E RUSSEL, 2001).

4.2.7 Papel da LicNTPDase-2 recombinante na adesão in vitro de *Leishmania tarentolae* em macrófagos RAW 264.7

Os ensaios de adesão por competição com a proteína recombinante LicNTPDase-2 de *Leishmania infantum chagasi* foram realizados, em triplicata, na presença de diferentes concentrações da proteína (1,0 e 3,0 µg/mL) diluídas em meio RPMI 5%. Os grupos controles foram albumina 3 µg/mL no lugar da proteína LicNTPDase-2, proteína desnaturada por fervura 3 µg/mL, tampão de eluição, no qual estava a proteína recombinante, sem proteína, e um controle contendo apenas macrófagos, parasito e meio de cultura.

Em uma placa de 24 poços foram colocadas lamínulas de 13mm estéreis e adicionou-se, macrófagos na concentração inicial de 1×10^6 células/lamínula em meio RPMI 5%SFB por 120 minutos.

Após este tempo, as células foram colocadas em contato por 5 minutos com as diferentes concentrações da proteína NTPDase-1.

Passado o tempo de 5 minutos os parasitos, na forma promastigotas fase procíclica e fase metacíclica de *Leishmania tarentolae*, crescidos em meio BHI foram centrifugados, contados e ressuspensos na concentração desejada, 3×10^6 parasitos/mL, em meio RPMI 5% SFB, foram adicionados macrófagos (3 parasitos: 1 célula) e incubados por 30 minutos a 4°C.

Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS a 4°C, fixadas com solução paraformaldeído por 5 minutos, coradas pelo método do panótico rápido, e analisadas no microscópio óptico em objetiva de 100X.

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

4.3 Resultados e discussão

Diversos parasitos, incluindo *Leishmania*, não são capazes de sintetizar anéis de purina e são dependentes das vias de salvação de purina que usam Ecto-Nucleoside trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases) para degradação de nucleótidos extracelulares (ABBRACCHIO e CERUTI, 2007). Além disso, as E-NTPDases foram apontadas como importantes para a adesão e infecção de *Leishmania* patogênica para mamífero e evolução da doença Leishmaniose (VASCONCELLOS *et al.*, 2014).

Neste trabalho, estudamos as NTPDases da *L. tarentolae*, uma espécie de *Leishmania* não patogênica para mamíferos, mas patogênica para largato, a fim de se verificar se as NTPDases são importantes para esta espécie no processo de infecção. Foram utilizados anticorpos policlonais específicos contra a E-NTPDase-2 recombinante de *Leishmania infantum chagasi* (rLicNTPDase-2) para confirmar a presença de E-NTPDases em *Leishmania tarentolae*. A figura 29 apresenta promastigotas de *L. tarentolae* em fase exponencial de crescimento, visualizados por microscopia confocal. Utilizou-se parasitas não permeabilizados, as proteínas estão localizadas na superfície do parasito, sendo que a marcação também foi observada no flagelo.

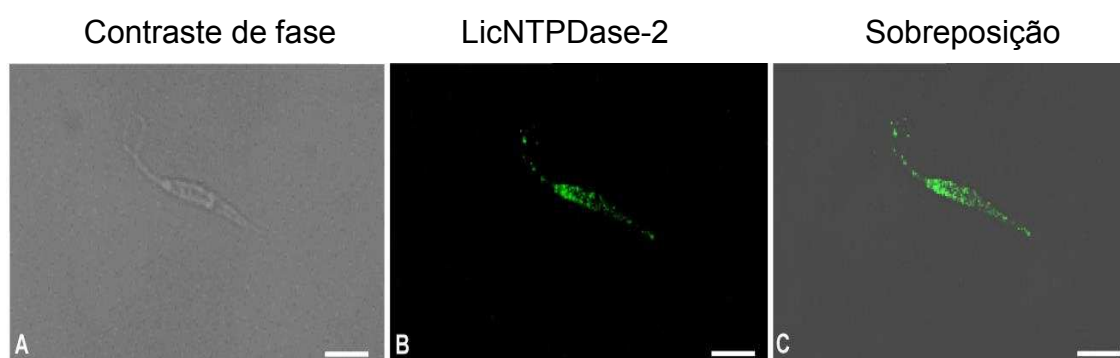


Figura 29: Imunolocalização de NTPDases em promastigotas por microscopia confocal. Parasitos não-permeabilizados foram fixadas, anticorpo primário anti-NTPDase-2 (1:50) foi adicionado e secundário anti-IgG de Coelho conjugado Alexa 488. (A) contraste de fase (B) NTPDase e (C) sobreposição. Bar = 5 μ m.

Em seguida analisou-se a localização subcelular das NTPDases por microscopia eletrônica (Figura 30) apresenta uma investigação detalhada da localização das NTPDases por microscopia eletrônica de transmissão. Partículas de ouro foram visualizadas predominantemente na região da superfície celular,

núcleo, citoplasma, flagelo e bolsa flagelar. Além disso, a microscopia eletrônica revelou a presença das NTPDases também no cinetoplasto, mitocôndrias e vesículas internas. O perfil de localização intracelular é semelhante a estudos recentes de promastigotas *L. chagasi*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* e epimastigotas de *T. cruzi* (VASCONCELLOS *et al.*, 2014; MARIOTINI-MOURA *et al.*, 2014)

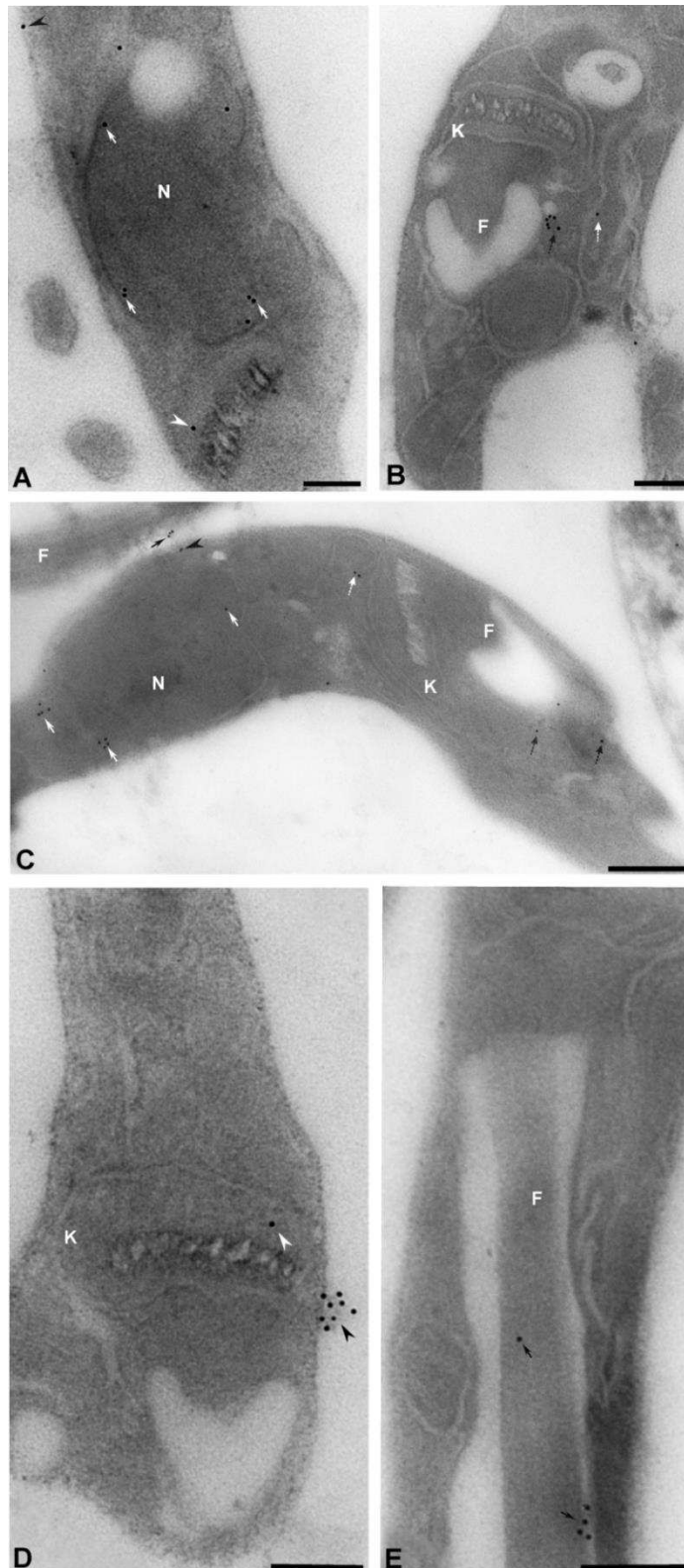


Figura 30: Análise ultra-estrutural da localização subcelular das NTPDases em promastigotas de *L. tarentolae*. (A-E) eletromicrografias utilizando anti-soro policlonal anti - LicNTPDase-2 e anti-IgG conjugado com ouro coloidal de 10 nM. NTPDase é mostrada no núcleo (N) (setas brancas), cinetoplasto (K) (cabeça de seta branca), flagelo (F) e a região de inserção flagelo (seta preta), superfície celular externa e interna (pontas de seta pretas). Não se observou marcações no controle (dados não apresentados). Barras: A, B, D, E = 0,2 μ m; B = 0,3 μ m.

Após confirmar por microscopia eletrônica e confocal a presença das NTPDases em diversas organelas e na superfície celular de *L. tarentolae*, também foi confirmada a participação das NTPDases na adesão celular em macrófagos através do ensaio de competição para verificar o efeito da LicNTPDase-2 recombinante (Figura 31).

Em *L. tarentolae* fase procíclica (Figura 31 A) quando foi adicionado 1 µg/mL de LicNTPDase-2, foi observado redução na adesão de em média 19,11% e quando se adicionou 3 µg/mL de LicNTPDase-2 redução de em média 38,31%. Já em *L. tarentolae* fase metacíclica (Figura 30 B) a redução de células aderidas quando se adicionou 1 µg/mL de em média 24,11% e 3 µg/mL redução de em média 31,88%. Estes resultados mostraram a importância das NTPDases no processo de adesão de *L. tarentolae*.

A participação das E-NTPDases nos processos de adesão e infecção por tripanossomatídeos mostrados por Santos *et al.* (2009), Mariotini-Moura *et al.* (2014) e Vasconcellos *et al.* (2014) estão em conformidade com o presente trabalho. Nossos dados mostram ainda que as E-NTPDases também são importantes para a infecção de uma espécie de *Leishmania* não patogênica para mamífero.

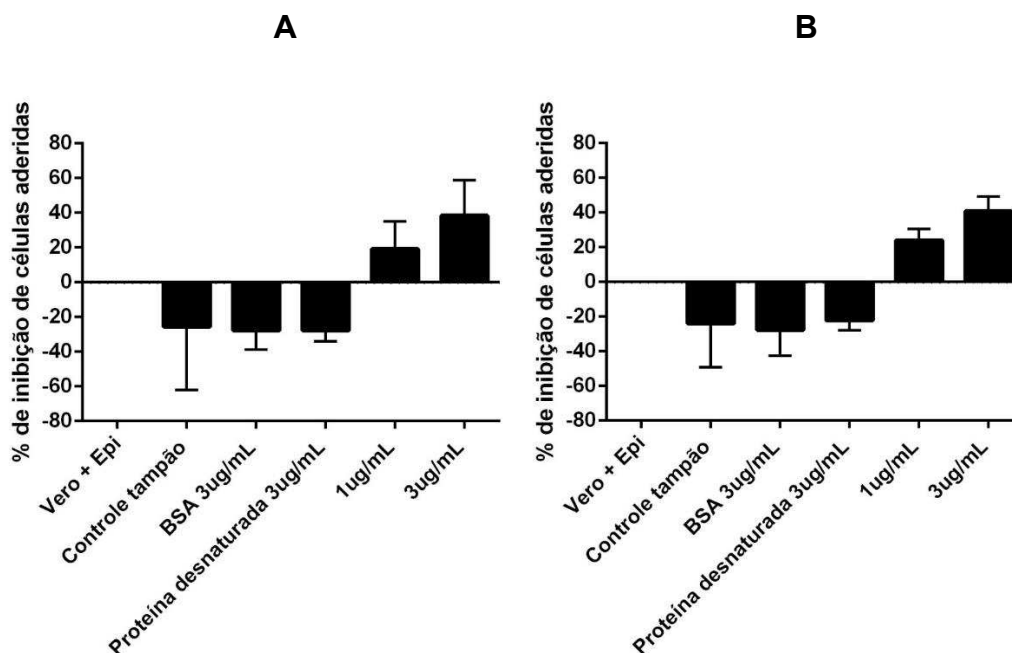


Figura 31: Avaliação do papel das E-NTPDases de *Leishmania infantum chagasi* (LicNTPDase-2) na adesão celular a célula hospedeira. Macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram colocados em duas diferentes concentrações de proteína recombinante por 5 minutos (1,0 e 3,0 µg/mL). (A) Promastigotas de *L. tarentolae* fase procíclica foram então adicionados (3 parasitos/ célula). (B) Promastigotas de *L. tarentolae* fase metacíclica foram então adicionados (3 parasitos/ célula). Após a incubação, lamínulas foram lavadas, fixadas, coradas com kit panótico rápido e analisadas por microscopia de luz. BSA (43µg/mL), Tampão de eluição da proteína recombinante, proteína desnaturada (3 µg/ml) e epimastigotas (VERO + epimastigotas) foram utilizados como controle. Porcentagem de parasitos aderidos foi determinada pela contagem de 300 células em triplicata de lamínula. Os resultados são a média ± DP a partir de pelo menos três experimentos independentes.

Em seguida, analisou-se as medidas de hidrólise de ATP e ADP pelas ectonucleotidases da *L. tarentolae* em fase procíclica e metacíclica para verificar a capacidade das ectonucleotidases. A figura 32 apresenta os dados das medidas de hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP pelas enzimas E-NTPDases de promastigotas metacíclicos e procíclicos de *L. tarentolae*. Parasitos foram incubados com tampão de atividade contendo 50 mM HEPES-TRIS, 116 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 5,5 mM D-glucose, 5,0 mM MgCl₂ e 5 mM de nucleotídeo, por 1 hora a 37°C. A reação foi parada com 0,2 M de HCl gelado. A suspensão foi centrifugada a 200 xg e o sobrenadante foi utilizado para medir o fosfato inorgânico (Pi) pelo Método de Verde Malaquita. O valor da hidrólise de ATP foi de 186,642 ± 26,88 nmol Pi/10⁸ parasitos/h em promastigotas metacíclicos e em promastigotas procíclicos valores bem maiores 737,409 ± 242,11 nmol Pi/10⁸ parasitos/h. Os valores de hidrólise de ADP foram de 93,70 ± 6,15 nmol Pi/10⁸ parasitos/h em promastigotas metacíclicos e 66,81 ± 17,87. A hidrólise de ATP

foi maior que a hidrólise de ADP nas duas formas dos parasitos. Estes resultados evidenciam a preferência pela hidrólise de nucleotídeos de ATP.

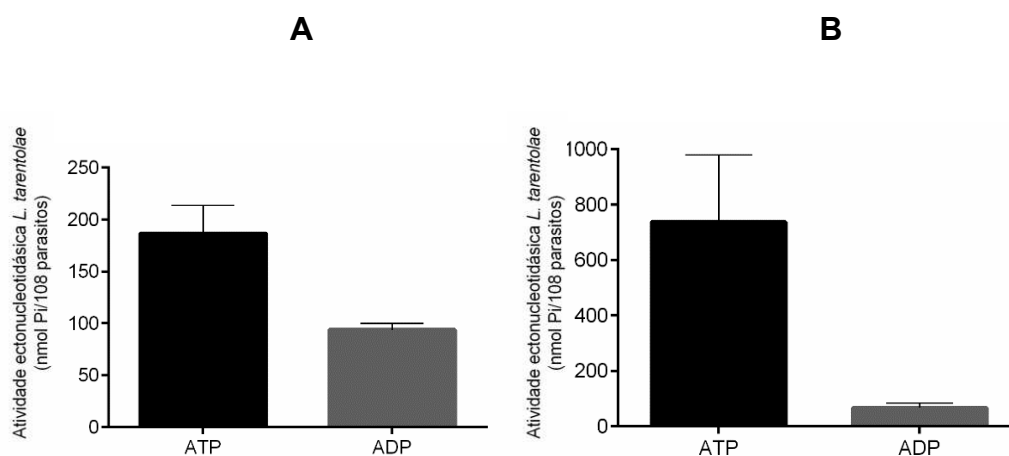


Figura 32: Atividade ectonucleotidásica de *Leishmania tarentolae*. (A) Formas promastigotas metacíclicas. (B) Formas promastigotas procíclicas. A hidrólise de ATP e ADP foram mensuradas. Parasitos vivos foram incubados por 1 hora a 37°C em tampão de reação (50 mM HEPES-Tris, 116 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 5,5 mM D-glucose, 5,0 mM MgCl₂) na presença de 5 mM de nucleotídeo. A reação foi parada com 0,2 M de HCl, a suspensão foi centrifugada e fosfato inorgânico (Pi) foi medido pelo método de Verde malaquita.

A figura 32 mostra a inibição parcial das E-NTPDases em presença do inibidor suramina, uma naftiluréia polissulfonada, que mostrou-se ser um inibidor parcial de E-NTPDases de *T. cruzi* como mostrado por Bissagio et al. (2003) e Santos et al. (2009). Foi utilizada na concentração de 100µM. A hidrólise de ATP teve uma redução de 55,68% na fase procíclica e de 22,23% na fase metacíclica. Não se observou inibição na hidrólise de ADP em nenhuma das duas fases.

Este dado sugere que as E-NTPDases de *L. tarentolae* parecem ser inibidas parcialmente por Suramina na concentração usada e que é possível que a sensibilidade a este inibidor seja variável no gênero *Leishmania*.

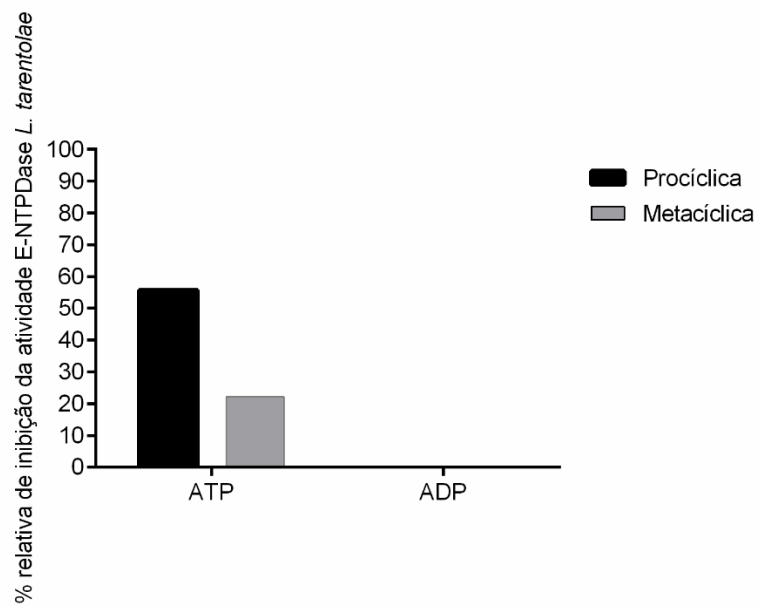


Figura 33: Porcentagem relativa de inibição da atividade das E-NTPDases de *Leishmania tarentolae*. Suramina um inibidor parcial das E-NTPDase, foi utilizada na concentração de 100 μ M. Fosfato inorgânico (Pi) foi mensurado pelo Método de Verde Malaquita. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

5 Conclusões Gerais

- Existe uma variação na taxa de crescimento entre as cepas Colombiana (DTU I), Berenice-62 e Y (DTU II), clones CL-Brener e CL-14 (DTU VI).
- O perfil de atividade ectonucleotidásica das fases exponencial e estacionária diferiram significativamente entre cepas/clones, sendo de forma geral as atividades na fase exponencial maiores que na fase estacionária.
- As cepas Colombiana (DTU I), Berenice-62 (DTU II) e clone CL-Brener (DTU VI) apresentaram imuno marcações em diversas organelas celulares, apenas no clone CL-14 (DTU VI) as marcações estavam ausentes.
- Comparando as fotomicroscopias notou-se que as cepas/clones que apresentaram maior quantidade de marcações foram CL-Brener>Colombiana>Berenice-62>CL-14.
- A presença de marcações no flagelo e bolsa flagelar sugerem que a NTPDase-1 tem participação na aquisição de nutrientes.
- A NTPDase-1 recombinante de *T. cruzi* da cepa Y influencia na adesão celular de outras cepas/clones do parasito.
- A NTPDase-1 recombinante interage com receptores na célula hospedeira.
- A utilização de meio LIT para cultivo dos parasitos seguido de choque térmico aumenta a atividade ectonucleotidásica.
- O choque térmico não aumentou a atividade de parasitos cultivados em meio Grace's 20% SFB, independente da fase estudada.

- A 28°C o meio Grace's 20% SFB é o meio em que os parasitos em fase exponencial apresentaram maior hidrólise de ATP, ADP e AMP.
- Suramina inibiu 50% da atividade ectonucleotidásica provavelmente referente NTPDase-1 em parasitos cultivados em meio LIT.
- Parasitos cultivados em meio Grace's 20% SFB, pelo menos 50% da atividade ATPDásica (EXP 28°C; EXP 37°C; EST 28°C) e toda atividade ADPásica (EXP 37°C) deve ser devida a atividade da NTPDase-1.
- A NTPDase-1 da cepa Colombiana de *T. cruzi* participa do processo de adesão a célula hospedeira.
- A adesão celular da cepa Colombiana de *T. cruzi* cultivada em meio Grace's 20% SFB e em fase exponencial não sofreu influência do choque térmico.
- Foi possível comprovar a presença de E-NTPDases na superfície do parasito e também na superfície do flagelo.
- Também foi confirmada por análise ultra-estrutural a presença de marcação no núcleo, flagelo, bolsa flagelar, citoplasma, vesículas, mitocôndria e superfície externa e interna;
- Foi possível confirmar a participações das E-NTPDases na adesão celular de *L. tarentolae* em macrófago.
- Observou-se redução no percentual de adesão em presença da NTPDase-2 de *L. infantum chagasi* (LicNTPDase-2) e esta redução foi dose dependente.
- *L. tarentolae* foi capaz de hidrolisar ATP e ADP, sendo que a preferência pela hidrólise de ATP foi evidenciada.

- A atividade ecto ATPásica foi inibida parcialmente em presença do inibidor Suramina e não se observou inibição da atividade ADPásica nestas condições, sugerindo que a sensibilidade a este inibidor seja variável no gênero Leishmania.

Referências

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

ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano (Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). **Revista de Patologia Tropical**, p. 65-121, 1974.

ARAÚJO, S. M. D.; CHIARI, E. Caracterização biológica de clones das cepas Y, CL e MR de *Trypanosoma cruzi* em camundongos C3H isogênicos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 175-181, 1988.

ASAI, T.; O'SULLIVAN, W. J.; TATIBANA, M. A potent nucleoside triphosphate hydrolase from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. Purification, some properties, and activation by thiol compounds. **J Biol Chem**, v. 258, n. 11, p. 6816-22, Jun 10 1983.

AUFDERHEIDE, A. C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS, L. E., JR.; FORNACIARI, G.; ALLISON, M. A 9,000-year record of Chagas' disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 7, p. 2034-9, Feb 17 2004.

BASTOS, M. S. **Expressão heteróloga e caracterização bioquímica e biológica da NTPDase-1 DE *Leishmania infantum chagasi***. 2011. Mestrado (Dissertação de mestrado). Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa

BERREDO-PINHO, M.; PERES-SAMPAIO, C. E.; CHRISPIM, P. P.; BELMONT-FIRPO, R.; LEMOS, A. P.; MARTINY, A.; VANNIER-SANTOS, M. A.; MEYER-FERNANDES, J. R. A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis*

and its possible role in adenosine acquisition and virulence. **Arch Biochem Biophys**, v. 391, n. 1, p. 16-24, Jul 1 2001.

BIGONNESSE, F.; LEVESQUE, S. A.; KUKULSKI, F.; LECKA, J.; ROBSON, S. C.; FERNANDES, M. J.; SEVIGNY, J. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. **Biochemistry**, v. 43, n. 18, p. 5511-9, May 11 2004.

BISAGGIO, D. F.; PERES-SAMPAIO, C. E.; MEYER-FERNANDES, J. R.; SOUTO-PADRON, T. Ecto-ATPase activity on the surface of *Trypanosoma cruzi* and its possible role in the parasite-host cell interaction. **Parasitol Res**, v. 91, n. 4, p. 273-82, Oct 2003.

BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Autoimmune Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **The American Journal of Pathology**, v. 185, n. 6, p. 1537-1547, 2015.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 4, p. 389-96, Nov-Dec 1962.

_____. Laboratory-acquired Chagas disease: comment. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 81, n. 3, p. 527, 1987.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Revista Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v. 5, n. 5, p. 220-224, 1963.

BRYCESON, A. Tropical medicine for the 21st century. Tropical medicine should be concerned with medical problems endemic to the tropics. **BMJ**, v.312, n.7025, Jan 27, p.247. 1996.

BURLEIGH, B. A.; WOOLSEY, A. M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cellular Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 701-711, 2002.

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

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

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p. 286-296, 2012.

COURA, J. R.; VINAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S6-7, Jun 24 2010.

DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA, E.; DE OLIVEIRA, J. C.; FIGUEIREDO, A. B.; DE SOUZA LIMA JUNIOR, D.; CARNEIRO, C. M.; RANGEL FIETTO, J. L.; CROCCO AFONSO, L. C. Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. **Microbes Infect**, v. 10, n. 8, p. 850-7, Jul 2008.

DE CARVALHO, T. U.; DE SOUZA, W. Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 28, n. 4, p. 205-12, Jul-Aug 1986.

DE SOUZA, R. F.; DOS SANTOS, Y. L.; DE SOUZA VASCONCELLOS, R.; BORGES-PEREIRA, L.; CALDAS, I. S.; DE ALMEIDA, M. R.; BAHIA, M. T.; FIETTO, J. L. Recombinant *Leishmania (Leishmania) infantum* Ecto-Nucleoside

Triphosphate Diphosphohydrolase NTPDase-2 as a new antigen in canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Acta Trop**, v. 125, n. 1, p. 60-6, Jan 2013.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr Pharm Des**, v. 8, n. 4, p. 269-85, 2002.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **Int J Cell Biol**, v. 2010, 2010.

DETONI, M. L.; FESSEL, M. R.; MAIA, A. C.; PORCINO, G. N.; QUELLIS, L. R.; FARIA-PINTO, P.; MARQUES, M. J.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; DINIZ, V. A.; CORTE-REAL, S.; GONCALVES-DA-COSTA, S. C.; SOUZA, C. S.; VASCONCELOS, E. G. An antigenic domain of the *Leishmania amazonensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is associated with disease progression in susceptible infected mice. **Parasitol Res**, v. 112, n. 8, p. 2773-82, Aug 2013.

EKMAN, P.; JAGER, O. Quantification of subnanomolar amounts of phosphate bound to seryl and threonyl residues in phosphoproteins using alkaline hydrolysis and malachite green. **Anal Biochem**, v. 214, n. 1, p. 138-41, Oct 1993.

EL KOUNI, M. H. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. **Pharmacol Ther**, v. 99, n. 3, p. 283-309, Sep 2003.

FEDERICI, E. E.; ABELMANN, W. H.; NEVA, F. A. Chronic and Progressive Myocarditis and Myositis in C3h Mice Infected with *Trypanosoma Cruzi*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 13, p. 272-80, Mar 1964.

FERREIRA, I. D. L. M.; SILVA, T. P. T. E. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 507-509, 2006.

FIETTO, J. L.; DEMARCO, R.; NASCIMENTO, I. P.; CASTRO, I. M.; CARVALHO, T. M.; DE SOUZA, W.; BAHIA, M. T.; ALVES, M. J.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 316, n. 2, p. 454-60, Apr 2 2004.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 81, n. 5, p. 755-9, 1987.

GIAROLA, N. L.; DE ALMEIDA-AMARAL, E. E.; COLLOPY-JUNIOR, I.; FONSECA-DE-SOUZA, A. L.; MAJEROWICZ, D.; PAES, L. S.; GONDIM, K. C.; MEYER-FERNANDES, J. R. *Trypanosoma cruzi*: effects of heat shock on ecto-ATPase activity. **Exp Parasitol**, v. 133, n. 4, p. 434-41, Apr 2013.

GIORDANO, R.; CHAMMAS, R.; VEIGA, S. S.; COLLI, W.; ALVES, M. J. An acidic component of the heterogeneous Tc-85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. **Mol Biochem Parasitol**, v. 65, n. 1, p. 85-94, May 1994.

GUEDES, P. M. M.; FIETTO, J. L. R.; LANA, M.; BAHIA, M. T. Advances in Chagas Disease Chemotherapy. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 175-186, 2006.

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

HUEB, M. F. D. **Doença de Chagas: indicadores cognitivos de transtornos orgânico cerebral, de uso de álcool e qualidade de vida**. 2006. (Tese de doutorado). Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto

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, n. 2, p. 284-94, Oct 1973.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v. 96, n. 1, p. 23-8, Nov 30 1990.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W. K.-K., R. (Ed.). **The leishmaniases in biology and medicine. Volume I. Biology and epidemiology**. Academic Press: London, v.1 ,p.1-120, 1987. .

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, n. 1, p. 9-15, Jan 12 1983.

LAVOIE, E. G.; KUKULSKI, F.; LEVESQUE, S. A.; LECKA, J.; SEVIGNY, J. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3. **Biochem Pharmacol**, v. 67, n. 10, p. 1917-26, May 15 2004.

LEITE, P. M.; GOMES, R. S.; FIGUEIREDO, A. B.; SERAFIM, T. D.; TAFURI, W. L.; DE SOUZA, C. C.; MOURA, S. A.; FIETTO, J. L.; MELO, M. N.; RIBEIRO-DIAS, F.; OLIVEIRA, M. A.; RABELLO, A.; AFONSO, L. C. Ecto-nucleotidase activities of promastigotes from *Leishmania (Viannia) braziliensis* relates to parasite infectivity and disease clinical outcome. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 10, p. e1850, 2012.

LESLIE, M. Drug Developers Finally Take Aim at a Neglected Disease. **Science**, v. 333, n. 6045, p. 933-935, August 19, 2011 2011.

LEY, V.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V.; ANDREWS, N. W. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 171, n. 2, p. 401-413, February 1, 1990 1990.

MANQUE, P. A.; TENJO, F.; WOHLBIER, U.; LARA, A. M.; SERRANO, M. G.; XU, P.; ALVES, J. M.; SMELTZ, R. B.; CONRAD, D. H.; BUCK, G. A. Identification and immunological characterization of three potential vaccinogens against *Cryptosporidium* species. **Clin Vaccine Immunol**, v. 18, n. 11, p. 1796-802, Nov 2011.

MARIOTINI-MOURA, C.; BASTOS, M. S.; DE CASTRO, F. F.; TRINDADE, M. L.; DE SOUZA VASCONCELLOS, R.; NEVES-DO-VALLE, M. A.; MOREIRA, B. P.; DE FREITAS SANTOS, R.; DE OLIVEIRA, C. M.; CUNHA, L. C.; SOUTO, X. M.; BRESSAN, G. C.; SILVA-JUNIOR, A.; BAQUI, M. M.; BAHIA, M. T.; DE ALMEIDA, M. R.; MEYER-FERNANDES, J. R.; FIETTO, J. L. *Trypanosoma cruzi* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion. **Acta Trop**, v. 130C, p. 140-147, Nov 19 2013.

MATEO, J.; HARDEN, T. K.; BOYER, J. L. Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase. **Br J Pharmacol**, v. 128, n. 2, p. 396-402, Sep 1999.

MEYER-FERNANDES, J.; SAAD-NEHME, J.; PERES-SAMPAIO, C.; BELMONT-FIRPO, R.; BISAGGIO, D. R.; DO COUTO, L.; FONSECA DE SOUZA, A.; LOPES, A. S. C.; SOUTO-PADRÓN, T. A Mg-dependent ecto-ATPase is increased in the infective stages of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 93, n. 1, p. 41-50, 2004/05/01 2004.

MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 577-91, Jul 2003.

MORENO, M.; D'ÁVILA, D. A.; SILVA, M. N.; GALVÃO, L. M.; MACEDO, A. M.; CHIARI, E.; GONTIJO, E. D.; ZINGALES, B. Trypanosoma cruzi benznidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 918-924, 2010.

NEIRA, I.; SILVA, F. A.; CORTEZ, M.; YOSHIDA, N. Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. **Infect Immun**, v. 71, n. 1, p. 557-61, Jan 2003.

ORGANIZATION., W. H. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2015. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index> >. Acesso em: 21 de julho.

ORGANIZATION., W. H. Leishmaniasis. 2015. Disponível em: < <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> >. Acesso em: 31 de julho.

PORCINO, G. N.; CARVALHO-CAMPOS, C.; MAIA, A. C.; DETONI, M. L.; FARIA-PINTO, P.; COIMBRA, E. S.; MARQUES, M. J.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; DINIZ, V. A.; CORTE-REAL, S.; VASCONCELOS, E. G. *Leishmania (Viannia) braziliensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1): localization and in vitro inhibition of promastigotes growth by polyclonal antibodies. **Exp Parasitol**, v. 132, n. 2, p. 293-9, Oct 2012.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 92-100, 2001.

RODRIGUES, D. C.; SILVA, R.; RONDINELLI, E.; URMENYI, T. P. *Trypanosoma cruzi*: modulation of HSP70 mRNA stability by untranslated regions during heat shock. **Exp Parasitol**, v. 126, n. 2, p. 245-53, Oct 2010.

ROSESTOLATO, C. T.; DUTRA JDA, M.; DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. Participation of host cell actin filaments during interaction of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with host cells. **Cell Struct Funct**, v. 27, n. 2, p. 91-8, Apr 2002.

SALGADO, J. A.; GARCEZ, P. N.; OLIVEIRA, C. A.; GALIZZI, J. Revisão clínica atual do primeiro caso humano descrito da Doença de Chagas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 330-337, 1962.

SAMBROOK, J. **Molecular cloning : a laboratory manual**. RUSSELL, D. W. Cold Spring Harbor, N.Y. :: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001.

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

SACKS, D.; N. NOBEN-TRAUTH. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat Rev Immunol**, v.2, n.11, Nov, p.845-58. 2002.

SANTOS, R. F.; POSSA, M. A.; BASTOS, M. S.; GUEDES, P. M.; ALMEIDA, M. R.; DEMARCO, R.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; BAHIA, M. T.; FIETTO, J. L. Influence of Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 3, p. e387, 2009.

SCHULTE AM ESCH, J., 2ND; SEVIGNY, J.; KACZMAREK, E.; SIEGEL, J. B.; IMAI, M.; KOZIAK, K.; BEAUDOIN, A. R.; ROBSON, S. C. Structural elements

and limited proteolysis of CD39 influence ATP diphosphohydrolase activity. **Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 2248-58, Feb 23 1999.

SILVA-GOMES, N.; ENNES-VIDAL, V.; CAROLO, J.; BATISTA, M.; SOEIRO, M.; MENNA-BARRETO, R.; MOREIRA, O. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase1 (TcNTPDase-1) gene expression is increased due to heat shock and in infective forms of *Trypanosoma cruzi*. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 463, 2014.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; TOLEDO-MONTEVERDE, D.; MORAESMARTINS, G.; MAJESKI-COLOMBO, M.; MESSEDER, J. C.; ESPERIDIÃO-ANTONIO, V. Neuroinfecção humana por *Trypanosoma cruzi*. **Revista Neurociências**, v. 16, n. 4, p. 310-315, 2008.

SMITH, T. M.; KIRLEY, T. L. Site-Directed Mutagenesis of a Human Brain Ecto-Apyrase: Evidence That the E-Type ATPases Are Related to the Actin/Heat Shock 70/Sugar Kinase Superfamily. **Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 321-328, 1999/01/01 1999.

SOARES, M. J. The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 139-41, 1999.

SOARES, M. J.; DE SOUZA, W. Cytoplasmic organelles of trypanosomatids: a cytochemical and stereological study. **J Submicrosc Cytol Pathol**, v. 20, n. 2, p. 349-61, Apr 1988.

SOEIRO MDE, N.; DE SOUZA, E. M.; DA SILVA, C. F.; BATISTA DDA, G.; BATISTA, M. M.; PAVAO, B. P.; ARAUJO, J. S.; AIUB, C. A.; DA SILVA, P. B.; LIONEL, J.; BRITTO, C.; KIM, K.; SULIKOWSKI, G.; HARGROVE, T. Y.; WATERMAN, M. R.; LEPESHEVA, G. I. In vitro and in vivo studies of the antiparasitic activity of sterol 14alpha-demethylase (CYP51) inhibitor VNI against

drug-resistant strains of *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 9, p. 4151-63, Sep 2013.

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, n. 1, p. 121-30, Jan 1994.

SOUTO-PADRON, T. Imunocitoquímica: Técnicas Pré e Pós-Inclusão. In: SOUZA, W. D. (Ed.). **Microscopia Óptica: fundamentos e Aplicações às Ciências Biomédicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, v.2, 2007.

TAN, F.; HU, X.; LUO, F. J.; PAN, C. W.; CHEN, X. G. Induction of protective Th1 immune responses in mice by vaccination with recombinant *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase-II. **Vaccine**, v. 29, n. 15, p. 2742-8, Mar 24 2011.

TAUSSKY, H. H.; SHORR, E.; KURZMANN, W. T. T. A. O. G. A MICROCOLORIMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF INORGANIC PHOSPHORUS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 202, n. 2, p. 675-685, June 1, 1953 1953.

TAYLOR, V. M.; MUÑOZ, D. L.; CEDEÑO, D. L.; VÉLEZ, I. D.; JONES, M. A.; ROBLEDO, S. M. *Leishmania tarentolae*: Utility as an in vitro model for screening of antileishmanial agents. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 4, p. 471-475, 12// 2010.

VASCONCELLOS, R. S. **Expressão Heteróloga e Caracterização bioquímica da Nucleosídeo Trifosfohidrolase - 2 (NTPDase-2) de Leishmania infantum chagas**. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Viçosa. 2010.

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

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

ZINGALES, B. Trypanosoma cruzi: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? . **Revista da Biologia**, p. 44-48, 2011.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; MILES, M. A.; ROMANHA, A. J.; STURM, N. R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A. G.; SECOND SATELLITE, M. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-4, Nov 2009.

Anexo I

ARTIGO: TRYPANOSOMA CRUZI NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE DIPHOSPHOHYDROLASE 1 (TCNTPDASE-1) BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION, IMMUNOLocalIZATION AND POSSIBLE ROLE IN HOST CELL ADHESION

Acta Tropica 130 (2014) 140–147



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica



Trypanosoma cruzi nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion



Christiane Mariotini-Moura^{a,b}, Matheus Silva e Bastos^{a,h}, Felipe Freitas de Castro^{a,i}, Mellina Lanna Trindade^a, Raphael de Souza Vasconcellos^{a,b}, Myrian Augusta Araújo Neves-do-Valle^{a,b}, Bernardo Pereira Moreira^{a,j}, Ramon de Freitas Santos^{a,h,j}, Claudia Miranda de Oliveira^{a,b}, Luana Celina Seraphim Cunha^{a,k}, Xênia Macedo Souto^{a,l}, Gustavo Costa Bressan^a, Abelardo Silva-Júnior^b, Munira Muhammad Abdel Baqui^c, Maria Terezinha Bahia^d, Márcia Rogéria de Almeida^a, José Roberto Meyer-Fernandes^{a,i}, Juliana Lopes Rangel Fietto^{a,h,*}

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, CEP 35570-000 MG, Brazil

^b Instituto Nacional de Biociências e Saúde em Computação e Informática (INBC/INSA) em Computação e Informática – (INBC/INSA), Brazil

^c Departamento de Biologia Celular e Molecular e Biogerontologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, CEP 14060-000 SP, Brazil

^d Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas – NUPCB, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, CEP 35400-000 MG, Brazil

^e Instituto de Biociências Médicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, CEP 21045-500 RJ, Brazil

^f Instituto Nacional de Biologia Celular e Biogerontologia (INBC/INSA), Brazil

^g Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, CEP 35570-000 MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 January 2013

Received in revised form 5 November 2013

Accepted 11 November 2013

Available online 10 November 2013

Keywords:

Recombinant protein

Trypanosoma cruzi

Nucleoside triphosphate

diphosphohydrolase

Immunolocalization

Adhesion

ABSTRACT

Previous work has suggested that *Trypanosoma cruzi* diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) may be involved in the infection of mammalian cells and serve as a potential target for rational drug design. In this work, we produced recombinant TcNTPDase-1 and evaluated its nucleotidase activity, cellular localization and role in parasite adhesion to mammalian host cells. TcNTPDase-1 was able to utilize a broad range of triphosphate and diphosphate nucleosides. The enzyme's K_m for ATP (0.036 mM) suggested a capability to influence the host's ATP-dependent paracrine signaling. The use of specific polyclonal antibodies allowed us to confirm the presence of TcNTPDase-1 at the surface of parasites by confocal and electron microscopy. In addition, electron microscopy revealed that TcNTPDase-1 was also found in the flagellum, flagellum insertion region, kinetoplast, nucleus and intracellular vesicles. The presence of this enzyme in the flagellum insertion region and vesicles suggests that it may have a role in nutrient acquisition, and the widespread distribution of TcNTPDase-1 within the parasite suggests that it may be involved in other biological process. Adhesion assays using anti-TcNTPDase-1 polyclonal antibodies as a blocker or purified recombinant TcNTPDase-1 as a competitor revealed that the enzyme has a role in parasite–host cell adhesion. These data open new frontiers in future studies on this specific parasite–host interaction and other unknown functions of TcNTPDase-1 related to its ubiquitous localization.

© 2013 The Authors. Published by Elsevier B.V. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.008>

Abbreviations: NTPDase, nucleoside triphosphate diphosphohydrolase; TcNTPDase-1, *T. cruzi* NTPDase-1; NDP, nucleoside diphosphate; NTP, nucleoside triphosphate.

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs, s/n, Viçosa, CEP-35570-000 MG, Brazil. Tel.: +55 031 31 38043042; fax: +55 031 31 3862274.

E-mail addresses: cufietto@ufv.br, jrfietto@gmail.com (J.L.R. Fietto).

[†] Present address: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, CEP 14060-000 SP, Brazil.

[‡] Present address: Instituto Oswaldo Cruz–IOC/PQCB2, Rio de Janeiro, CEP 21045-500 RJ, Brazil.

[§] Present address: Faculdade de Seropé, FASE – Faculdade de Seropé, Aracaju, CEP 48020-400 SE, Brazil.

0001-706X © 2013 The Authors. Published by Elsevier B.V. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.008>

<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.008>