

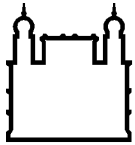
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE TCNTPDASE-1 EM DIFERENTES  
SUBPOPULAÇÕES E FORMAS EVOLUTIVAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI***

**NATÁLIA LINS DA SILVA GOMES**

Rio de Janeiro  
Setembro de 2014



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***NATÁLIA LINS DA SILVA GOMES***

Análise da expressão do gene TcNTPDase-1 em diferentes subpopulações e formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

**Orientador:** Prof. Dr. Otacilio da Cruz Moreira

**RIO DE JANEIRO**  
Setembro de 2014

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

G633 Gomes, Natália Lins da Silva

Análise da expressão do gene TcNTPDase-1 em diferentes subpopulações e formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi* / Natália Lins da Silva Gomes. – Rio de Janeiro, 2014.

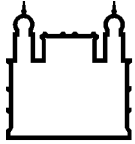
xvi, 95 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2014.

Bibliografia: f. 86-95

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. TcNTPDase-1. 3. Expressão Gênica. 4. Infectividade. 5. Virulência. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***AUTOR: NATÁLIA LINS DA SILVA GOMES***

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE TCNTPDASE-1 EM DIFERENTES  
SUBPOPULAÇÕES E FORMAS EVOLUTIVAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI***

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Otacilio da Cruz Moreira**

**Aprovada em: 08/09/2014**

### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Luciana L. A. R. Garzoni (IOC/FIOCRUZ/RJ) – Presidente**

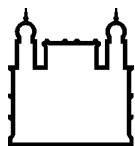
**Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello (Universidade do Estado do Rio de Janeiro -UERJ)**

**Prof. Dr. Marcelo Alves Ferreira (CDTS/FIOCRUZ/RJ)**

**Prof. Dra. Juliana de Meis (IOC/FIOCRUZ/RJ)**

**Prof. Dra. Patrícia Cuervo Escobar (IOC/FIOCRUZ/RJ)**

Rio de Janeiro, 8 de Setembro de 2014



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.**

**Dedico este trabalho a Deus,  
meus pais e minhas irmãs.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me capacitado e me proporcionado a imensa felicidade de ingressar neste programa de pós-graduação; por ter me dado forças durante essa jornada intensa de trabalho e por me fazer ver a cada dia a recompensa do esforço empenhado para realização deste projeto. Muito Obrigada Senhor!!

Agradeço aos meus pais, Arlene e Antonio Carlos, e minhas irmãs, Aline, Juliana e Sara pelo amor e carinho, pelas palavras de apoio e força dadas cada dia.

Agradeço ao meu Orientador, professor Dr. Otacilio da Cruz Moreira, pela oportunidade oferecida e pela confiança em mim e no meu trabalho, pelos ensinamentos diários, pela paciência e atenção.

Agradeço aos Pesquisadores, Pós-Docs., Doutores, Mestres e ICs do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas (LABIMDOE). Em especial meus amigos Bernardo e Franklin, as “Curis” Mariana e Raquel e, principalmente a Myllena Melo (My!!), pelo companheirismo, pelas ajudas oferecidas e pelas risadas, fazendo os dias, em que o trabalho era mais pesado, agradáveis. Amo vocês!!

Agradeço aos colaboradores deste projeto, Dr. Rubem Menna-Barreto, Vítor Ennes-Vidal, Dr. Nazaré Soeiro e Marcos Meuser, que foram bastante atenciosos e prestativos.

A todos os docentes do programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, que também contribuíram para o crescimento do meu conhecimento científico.

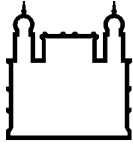
A CAPES pelo auxílio financeiro.

Obrigada!!

**“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.**

**(Arthur Schopenhauer)**





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

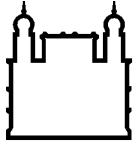
### ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE TCNTPDASE-1 EM DIFERENTES SUBPOPULAÇÕES E FORMAS EVOLUTIVAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Natália Lins da Silva Gomes

A doença de Chagas é uma doença negligenciada causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi*, o qual afeta cerca de 6-8 milhões de pessoas em áreas endêmicas da América Latina. As diferentes cepas envolvidas na infecção, e sua distribuição regional, tem sido sugeridas como causa das diferentes manifestações clínicas, resposta ao diagnóstico e eficácia terapêutica. A ecto-NTPDase é uma enzima localizada na superfície externa da membrana plasmática do *T. cruzi*, que hidrolisa nucleotídeos tri e difosfatados. Estudos anteriores têm relacionado esta enzima à infectividade e virulência de tripanosomatídeos, além de sugerir um papel importante na captação de purinas pelos parasitos. Neste trabalho avaliamos os níveis de mRNA para a TcNTPDase-1 por RT-PCR, em diferentes isolados do parasito (Dm28c- *T. cruzi* I; Y- *T. cruzi* II; 3663- *T. cruzi* III; 4167- *T. cruzi* IV; LL014- *T. cruzi* V; CL-14- *T. cruzi* VI- avirulenta), em formas não-infectantes (epimastigotas) e infectantes (tripomastigotas e amastigotas). Os ensaios de PCR em Tempo Real foram realizados com oligonucleotídeos desenhados para amplificar uma sequência de 111pb do gene TcNTPDase-1 e, como controles endógenos, uma sequência de 268pb do gene da TcCalmodulina e uma sequência de 100pb do gene TcGAPDH foram utilizados. Nós observamos que epimastigotas das cepas Y, 3663, 4167 e LL014 apresentaram os mesmos níveis de expressão do gene TcNTPDase-1 que o clone CL-14, avirulento. Por outro lado, o clone Dm28c expressou  $7,2 \pm 1,5$  vezes mais o gene desta enzima que o clone CL-14. Além disso, observamos que as formas infectantes tripomastigota e amastigota apresentaram, respectivamente, uma expressão  $22,5 \pm 5,6$  e  $16,3 \pm 3,8$  vezes maior que a forma epimastigota. Observamos também que durante a curva de crescimento de formas epimastigotas a  $28^{\circ}\text{C}$  e  $37^{\circ}\text{C}$  a expressão deste gene aumenta gradativamente com o tempo de cultivo, sendo mais pronunciado a  $37^{\circ}\text{C}$ , sugerindo que o choque-térmico e o longo período de cultivo pode aumentar a expressão do gene da TcNTPDase-1. Em conjunto, nossos dados sugerem que a TcNTPDase-1 estaria envolvida nos processos de infectividade do *T. cruzi*, bem como adaptação do parasita a temperatura do hospedeiro vertebrado. Devido sua importância para o *T. cruzi*, a TcNTPDase-1 apresenta potencial para ser avaliada como possível alvo para quimioterapia da Doença de Chagas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### GENE EXPRESSION ANALYSIS OF TCNTPDASE-1 IN THE DISTINCT SUBPOPULATION AND EVOLUTIVE FORMS OF *TRYPANOSOMA CRUZI*

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Natália Lins da Silva Gomes

Chagas disease is a neglected illness caused by the parasite protozoan *Trypanosoma cruzi*, which affects 6-8 million people in endemic areas of Latin America. The distinct strains involved in infection, in conjunction with the regional distribution, have been suggested to cause different clinical manifestations and therapeutic efficiency in Chagas Disease. The ecto-NTPDase is an apyrase located on the outer surface of *T.cruzi* plasma membrane- that hydrolyzes tri- and/or di-phosphate nucleotides. Previous studies related this enzyme to the infectivity and virulence of the parasite, and suggest an important role in the uptake of purines. In this study, we evaluate the mRNA levels for the ecto-NTPDase I by RT-PCR in distinct isolated parasites (Dm28c- *T.cruzi* I; Y- *T.cruzi* II; 3663- *T.cruzi* III; 4167- *T.cruzi* IV; LL014- *T.cruzi* V; CL-14- *T.cruzi* VI- avirulent), in non-infective forms (epimastigotes) and infective forms (amastigotes and trypomastigotes). The Real Time PCR assays were performed with primers designed to amplify a 111bp sequence in the TcNTPDase-1 gene and, as endogenous controls, a 268bp sequence in the TcCalmoduline gene and a 100bp sequence in the TcGAPDH gene were used. We observed that the epimastigotes of strains Y, 3663, 4167 e LL014 expressed the same levels of the gene of TcNTPDase-1 that the CL-14 clone, avirulent. On the other hand, the Dm28c clone expressed  $7.2 \pm 1.5$  times higher the gene of this enzyme that the CL-14 clone. Surprisingly, we observed that the trypomastigote and amastigote presented expression levels, respectively,  $22.5 \pm 5.6$  and  $16.3 \pm 3.8$  times higher than the epimastigote form. Moreover, following the epimastigotes growth curve at 28°C e 37°C, we also observed that the expression of TcNTPDase-1 increases with the days of growth, and this increase is more pronounced at 37°C, suggesting that heat shock and long-term cultivation could increase TcNTPDase-1 gene expression. In conjunction, our results suggest the role of TcNTPDase-1 on *T.cruzi* infectivity and adjustment to stress conditions such as nutrients starvation and heat shock. Due to its importance for *T.cruzi*, TcNTPDase-1 has the potential to be evaluated as a possible target for chemotherapy of Chagas Disease.

# ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	
<b>1.1 A doença de Chagas</b> .....Erro! Indicador não definido.6	
1.1.1	
Epidemiologia.....Erro! Indicador não definido.9	
1.1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> e sua Heterogeneidade.....20	
1.1.3 Ciclo Evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....24	
1.1.4 Tratamento.....27	
1.1.5 Ecto-Nucleotidasas em Tripanosomatídeos.....28	
<b>1.2 Sinalização Purinérgica</b> .....30	
1.2.1 Purinas e Tripanosomatídeos.....33	
1.2.2 Expressão Gênica em Tripanosomatídeos.....35	
<b>2 OBJETIVOS</b>	
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....388	
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....388	
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
<b>3.1 Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i></b> .....39	
<b>3.2 Cultivo de Células VERO</b> .....39	
<b>3.3 Medida da atividade ecto-ATPásica e ecto-ADPásica</b> .....39	
<b>3.4 Extração de RNA</b> .....40	
<b>3.5 Síntese do cDNA</b> .....40	
<b>3.6 PCR com gradiente de temperatura</b> .....41	
<b>3.7 Quantificação da expressão do gene da TcNTPDase-1 por RT-PCR em Tempo Real</b> .....41	
<b>3.8 Sequenciamento de DNA</b> .....42	

3.9	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	
4.1	<b>Desenho dos Iniciadores.....</b>	<b>43</b>
4.2	<b>Padronização dos ensaios de RT-PCR em Tempo Real.....</b>	<b>45</b>
4.3	<b>Avaliação dos Genes de Expressão Constitutiva.....</b>	<b>50</b>
4.3.1	Expressão dos genes Calmodulina e GAPDH para as diferentes Cepas/Clones e formas evolutivas do <i>T.cruzi</i> .....	50
4.4	<b>Análise da Expressão do Gene TcNTPDase-1 por RT-PCR em Tempo Real.....</b>	<b>52</b>
4.4.1	Expressão da TcNTPDase-1 nas diferentes cepas/clones de <i>T.cruzi</i> .....	52
4.4.2	Sequenciamento dos produtos de PCR da TcNTPDase-1 obtido a partir das diferentes subpopulações do <i>T.cruzi</i> .....	55
4.4.3	Expressão da TcNTPDase-1 nas diferentes formas evolutivas do <i>T.cruzi</i> .....	57
4.4.4	Expressão da TcNTPDase-1 durante a Curva de Crescimento de epimastigotas de <i>T.cruzi</i> em diferentes temperaturas.....	59
4.5	<b>Avaliação das atividades ecto-ATPásica e ecto-ADPásica em <i>T.cruzi</i>.....</b>	<b>61</b>
4.5.1	Atividade ecto-ATPásica e ecto-ADPásica nas cepas/clones de <i>T.cruzi</i> .....	61
4.5.2	Atividade ecto-ATPásica e ecto-ADPásica nas diferentes formas evolutivas de <i>T.cruzi</i> .....	63
4.6	<b>Artigo submetido à publicação.....</b>	<b>65</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>86</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Distribuição da Doença de Chagas e número estimado de imigrantes infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	18
<b>Figura 2</b> – Distribuição Geográfica aproximada das DTUs de <i>T.cruzi</i> em ciclos de transmissão silvestre e doméstico.....	23
<b>Figura 3</b> – Ciclo de transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i> (simplificado).....	26
<b>Figura 4</b> – Representação esquemática, localização e propriedades catalíticas das diferentes famílias das ecto-Nucleotidases.....	29
<b>Figura 5</b> – Diagrama topológico de Purinoreceptores.....	32
<b>Figura 6</b> – Teste dos Primers para TcNTPDase-1 com cepa CL. Brener ( <i>T.cruzi</i> VI) por PCR Convencional.....	47
<b>Figura 7</b> – Padronização da RT-PCR em Tempo Real para análise da expressão da NTPDase-1 de <i>T.cruzi</i> .....	48
<b>Figura 8</b> – Alinhamento das sequências de DNA proveniente dos produtos da PCR para TcNTPDase-1.....	56
<b>Figura 9</b> – Alinhamento das sequências de aminoácidos da CD39 humana com a TcNTPDase-1.....	83

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Cepas Representativas e suas correspondentes Unidades Discretas de Tipagem (DTUs).....	22
<b>Tabela 2</b> – Sequência dos iniciadores para os alvos TcNTPDase-1, Calmodulina, GAPDH e <i>T.cruzi</i> .....	44
<b>Tabela 3</b> – Diferentes cepas/clones do <i>T.cruzi</i> e suas respectivas DTUs (Unidades Discretas de Tipagem).....	53

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> – Avaliação dos genes normalizadores para os ensaios de RT-PCR.....	51
<b>Gráfico 2</b> – Análise da Expressão da TcNTPDase-1 nas formas epimastigotas dos diferentes isolados de <i>T.cruzi</i> .....	54
<b>Gráfico 3</b> – Análise da Expressão da TcNTPDase-1 nas formas infectantes e não-infectantes de <i>T.cruzi</i> .....	58
<b>Gráfico 4</b> – Expressão do gene TcNTPDase-1 durante o cultivo <i>in vitro</i> de epimastigotas e indução de choque-térmico.....	60
<b>Gráfico 5</b> – Atividades ecto-ATPase e ecto-ADPase entre as diferentes cepas/clones do <i>T.cruzi</i> .....	62
<b>Gráfico 6</b> – Atividades ecto-ATPase e ecto-ADPase entre as diferentes formas evolutivas de <i>T.cruzi</i> .....	64

## Lista de Siglas e Abreviaturas

ACRs - Regiões Conservadas de Apirase

Ado- Adenosina

ADP - Difosfato de Adenosina

AMP - Monofosfato de Adenosina

ATP - Trifosfato de Adenosina

BHI - Brain Heart Infusion

Ca<sup>2+</sup> - Cálcio divalente

cDNA - DNA complementar

CT - Threshold cycle (Ciclo correspondente ao limiar de fluorescência)

DEPC - Dimetil pirocarbonato (Inibidor de RNase)

DNA - Ácido Desoxiribonucleico

DTUs - Unidades Discretas de Tipagem

E-NTPDase - ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

Fw - Forward (senso)

GAPDH - Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

gRNA - RNA guia

kDNA - DNA do cinetoplasto

M - Molaridade

μL - Microlitro

mg – Miligrama

Mg<sup>2+</sup> - Magnésio divalente

MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de Magnésio

min - Minutos

MnCl<sub>2</sub> - Cloreto de Manganês

mM - Milimolar

mRNA - RNA mensageiro

NDP- Nucleosídeo Difosfato

nm - Nanomolar

NMP - Nucleosídeo Monofosfato

OMS - Organização Mundial de Saúde

pb - Pares de Base

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

PCR TR - Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase) em Tempo Real

pH - Potencial Hidrogeniônico

Pi- Fosfato Inorgânico

qsp - Quantidade suficiente para

RNA - Ácido Ribonucleico

Rv – Reverse (anti-senso)

s - Segundos

SFB - Soro Fetal Bovino (FBS)

SL- Splice Leader

SMF - Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM)

snRNA - Small nuclear ribonucleic acid (RNA nuclear pequeno)

TcNTPDase-1 - Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase 1 de *T.cruzi*

TcI - *T.cruzi* I

TcII - *T.cruzi* II

TcIII - *T.cruzi* III

TcIV - *T.cruzi* IV

TcV - *T.cruzi* V

TcVI - *T.cruzi* VI

UTR - Unstranlated Region (Região não Traduzida)

VERO - Célula epitelial de Rim de Macaco Verde

## **SÍMBOLOS**

Δ - Delta

α - Alfa

β - Beta

°C - graus Celsius

® - Marca Registrada

%-Porcentagem



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A doença de Chagas

A doença de Chagas é uma zoonose endêmica, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, que acomete cerca de 6 a 8 milhões de pessoas de diversos países da América Latina (OPAS/WHO, 2013). Porém, este mal ainda representa um grande desafio para a saúde pública, pois devido ao crescente movimento migratório das populações, a doença vem se espalhando para outros continentes (RASSI JR *et al.*, 2012) (Figura 1).

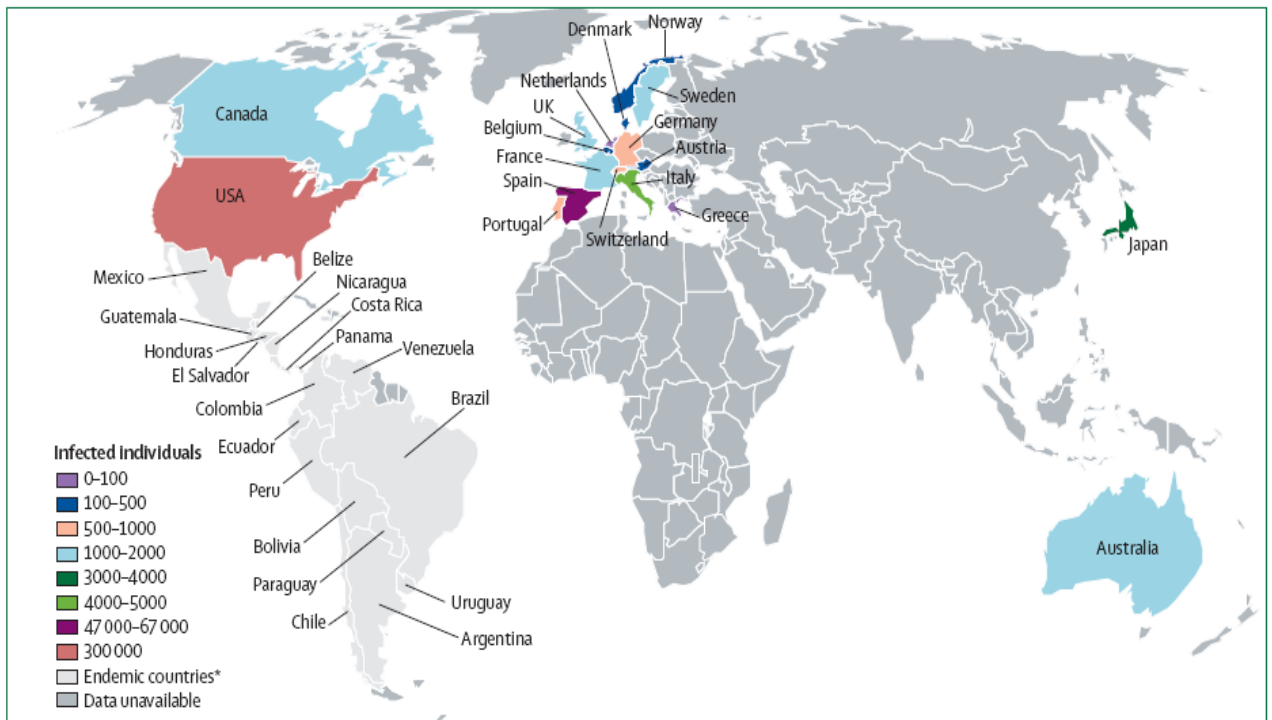
A doença de Chagas foi primeiramente descrita em 1909, pelo médico Brasileiro Carlos Chagas, na cidade de Lassance - MG (CHAGAS, 1909). Apesar de bem jovem, este pesquisador descreveu, de maneira notável, o agente etiológico da doença, os vetores, principais reservatórios, mecanismos de infecção, bem como as manifestações clínicas agudas do primeiro caso humano. Porém, evidências indicam que a doença de Chagas é possivelmente uma moléstia antiga pois, através de análise molecular, foi encontrado DNA de *T. cruzi* em tecidos de corpos mumificados em países andinos pré-colombianos a partir de 9.000 anos atrás (FERREIRA *et al.*, 2000; AUFDERHEIDE *et al.*, 2004).

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário pertencente ao filo *Sarcomastigophora*, subfilo *Mastigophora*, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, este possui um flagelo e uma única mitocôndria, contendo o cinetoplasto, o qual é formado por uma rede de DNA extranuclear (DNA mitocondrial- kDNA), correspondente ao genoma mitocondrial do parasita, que está localizado próximo ao corpo basal do flagelo (MASLOV & SIMPSON, 1995). Este parasito apresenta um ciclo biológico complexo (do tipo heteroxênico), envolve estágios morfológica e funcionalmente diferentes, que permitem que estes parasitas se adaptem a uma variedade de condições impostas por seus hospedeiros - invertebrado e vertebrado- (TANOWITZ *et al.*, 1992).

A transmissão desta doença pode ocorrer de diferentes formas: 1) Vetorial: através das fezes do triatomíneo, contendo as formas infectantes do parasita, que são deixadas próximo ao local do repasto sanguíneo ou em mucosas. 2) Transfusão Sanguínea: sendo o risco mais elevado nas transfusões de plaquetas do que para os demais componentes do sangue, pois tripomastigotas são predominantemente

separadas na fração de plaquetas, durante a centrifugação. 3) Transplante de Órgãos e Medula Óssea: a partir de um doador com infecção crônica. 4) Congênita: quando ninhos de amastigotas existentes na placenta transformam-se em tripomastigotas e são liberados na circulação fetal. 5) Acidentes Laboratoriais: Através do contato do parasita com a pele lesada, mucosas ou auto inoculação. 6) Transmissão Oral: podendo ocorrer na amamentação, canibalismo entre diferentes espécies de animais, ingestão de alimentos contaminados por fezes e urina de triatomíneos contaminados, entre outros (RASSI JR *et al.*, 2010).

A doença de Chagas ocorre em duas fases: aguda e crônica. Na fase aguda da doença, o indivíduo apresenta sintomas inespecíficos associados a uma abundante parasitemia, tanto no sangue periférico, como nos tecidos, o que facilita o seu diagnóstico (FREITAS *et al.*, 2005); a sintomatologia nesta fase da doença se desenvolve em torno de 8-10 dias após a infecção, incluindo febre prolongada, mal-estar, aumento do fígado, baço, linfonodos, e no local da penetração das formas infectantes do *T.cruzi* na pele, produz-se um chagoma de inoculação, sendo este conhecido como sinal de Romaña, quando ocorre através da membrana ocular (clássico nesta fase da doença), que consiste em um edema indolor unilateral da pálpebra e tecidos perioculares; em alguns casos, o indivíduo pode apresentar também, miocardite e encefalite (KIRCHHOFF *et al.*, 2011). Após a fase aguda, as manifestações clínicas desaparecem, havendo um período de latência, chamado de fase crônica indeterminada, que tem início 2 a 3 meses depois da infecção inicial. Nesta fase, o parasitismo é escasso e o indivíduo pode apresentar-se na forma assintomática da doença, sem qualquer manifestação clínica e, após anos de infecção, pode evoluir para a fase crônica sintomática da doença, apresentando distúrbios no sistema digestivo, sistema nervoso e no coração, além de outras alterações como, megaesôfago e megacólon (GARCIA *et al.*, 2005).



**Figura 1 – Distribuição da Doença de Chagas e número estimado de imigrantes infectados com *Trypanosoma cruzi*. (LANCET *et al.*, 2010).**

### 1.1.1 Epidemiologia

A doença de Chagas é uma das treze principais doenças tropicais negligenciadas que ainda representa uma séria ameaça à saúde pública, e com enorme impacto social e econômico em muitos países da América Latina (RASSI JR *et al.*, 2010). De acordo com a Organização Pan-americana de Saúde/ Organização Mundial de Saúde (OPAS/WHO, 2013), cerca de 6 a 8 milhões de pessoas já estão infectadas com esta doença, que causa 12 mil mortes por ano, e 65 milhões estão em área de risco de infecção. No entanto, é de se notar que com os programas para controle de vetores, triagem dos bancos de sangue e a educação da população de áreas de risco, esses números estão muito mais baixos do que a algumas décadas atrás.

Uma maior porcentagem de número de casos desta doença vem sendo relatado em países como Bolívia (6,8%), Argentina (4,1%), El Salvador (3,4%), Honduras (3,1%) e Paraguai (2,5%). No entanto, em países como Brasil e México, os números de casos diagnosticados são relativamente menores (apenas 1%); porém são nestes dois países, juntamente com a Argentina, que são encontrados quase 60% das pessoas infectadas com o *T.cruzi* (RASSI JR *et al.*, 2010).

Muitas são as espécies vetoriais responsáveis pela transmissão natural desta moléstia, as quais podem intervir diretamente na sua veiculação no ambiente domiciliar ou participar na manutenção da enzootia chagásica (COURA & DIAS, 2009; COURA & ALBAJAR-VIÑAS, 2010).

A doença de Chagas é um exemplo típico das alterações produzidas no meio ambiente pelos seres humanos, pois este protozoário, *Trypanosoma cruzi*, vivia restrito ao meio silvestre, circulando entre mamíferos do ambiente natural, através do inseto vetor. Porém, o homem invadiu seu ecótopo e se fez incluir no ciclo epidemiológico da doença (DIAS & COURA, 1997). Assim, indivíduos que habitam em casas de baixa qualidade, construídas principalmente em meio rural, onde o vetor se aloja e coloniza facilmente e, devido à intensa migração desta população rural rumo aos grandes centros, este mal rapidamente se urbanizou e os indivíduos infectados se dispersaram para áreas não endêmicas na América do Norte e Europa, causando riscos de transmissão transfusional (DIAS, 2007).

A transmissão vetorial desta doença pode ser controlada através do combate químico dos insetos vetores, como também com o melhoramento das habitações dos indivíduos mais carentes das populações rurais. Alternativamente, para controlar

a disseminação desta infecção, um controle mais rígido nos bancos de coleta de sangue vem sendo realizados. (DIAS, 2007).

### **1.1.2 *Trypanosoma cruzi* e sua Heterogeneidade**

Apesar do *Trypanosoma cruzi*, agente causal da doença de Chagas, fazer parte de um grupo monofilético, este parasito apresenta uma ampla diversidade morfológica, fisiológica e ecológica, além das diversidades quanto a seu nível de infectividade e virulência, patogenicidade e resistência a drogas (REY, 2002); ao longo de muitos anos, várias abordagens têm sido utilizadas para caracterizar a estrutura populacional do *T.cruzi*, com o objetivo de definir o número de subgrupos relevantes. Estes subgrupos receberam diferentes designações ao longo dos anos, como zimodema, schizodemas, biodemas, clones, linhagens, clados e, mais recentemente, em DTUs (Unidades Discretas de Tipagem) (ZINGALES *et al.*, 2009).

Uma provável explicação para esta enorme variabilidade genética entre as cepas do *T.cruzi* pode residir no fato deste ser um organismo diploide, que se multiplica predominantemente por divisão binária. Sendo assim, devido a evolução clonal e os raros eventos de troca genética, a estrutura populacional do parasito tem sido definida, fazendo com que genoma de cada isolado evolua de maneira independente, levando a individualização de várias DTUs (TIBAYRENC *et al.*, 1986; TIBAYRENC & AYALA, 1988; ZINGALES *et al.*, 2012).

Já no contexto da vasta heterogeneidade do *T.cruzi*, também há uma grande variedade entre as cepas quanto a sua virulência, infectividade e patogenicidade, o que implica em diferentes apresentações clínicas da doença. Estudos realizados por ANDRADE e *cols.* em 1974 definiram três principais fenótipos de cepas: 1) Biodema tipo I: correspondendo a cepas do zimodema Z2b (variante do Z2), sendo as cepas com maior taxa de replicação, máxima parasitemia e mortalidade- 7-11 dias após a infecção-, as alterações neuronais são as mais frequentes e intensas neste tipo de infecção. 2) Biodema tipo II: corresponde as cepas do zimodema Z2 (*T.cruzi* II), são as cepas com taxa de multiplicação lenta e picos de parasitemia irregulares- 12-20 dias após infecção-, quando a taxa de mortalidade chega ao máximo, neste tipo de infecção as alterações miocárdicas são mais predominantes. 3) Biodemas tipo III: correspondendo as cepas do zimodema Z1 (*T.cruzi* I), apresentam multiplicação lenta, com picos de parasitemia tardios porém bastante altos- 20-30 dias após infecção- e mortalidade tardia, apresentando alterações miocárdicas crônicas e nos

músculos esqueléticos. (ZINGALES *et al.*, 2012). Todas estas diferenças podem ser explicadas pela seleção natural das subpopulações mais adaptadas ao crescimento *in vitro*, e pelo papel do sistema imune dos hospedeiros vertebrados (CHIARI *et al.*, 1973; ALVES *et al.*, 1993; DE LANA *et al.*, 1996). Além disso, a susceptibilidade das diferentes cepas do *T.cruzi* aos quimioterápicos antiparasitários nifurtimox e benznidazol também variam entres as diferentes DTUs.

Foi em 23 de agosto de 2009, em uma reunião (Satellite Meeting) feita no Brasil, que um sistema de unificação da nomenclatura do agente causador da doença de Chagas foi estabelecido. Neste consenso, as cepas do *T.cruzi* foram agrupadas em seis DTUs, denominadas de *T.cruzi* I a VI, que compreendiam isolados semelhantes geneticamente, que compartilhassem marcadores moleculares ou imunológicos (ZINGALES *et al.*, 2009; 2012). E, através das análises com os diferentes marcadores, foi realizada a caracterização de cepas e isolados deste parasita, tais como os genes que codificam para RNA ribossomal, genes de mini-éxon e regiões de mini-satélite (FERNANDES *et al.*, 1998; MACEDO *et al.*, 1992; SOUTO & ZINGALES, 1993). A Tabela 1 mostra os isolados representativos de *T.cruzi*, segundo o consenso internacional (ZINGALES *et al.*, 2009) e a Figura 2 ilustra a distribuição geográfica das diferentes DTUs (ZINGALES *et al.*, 2012) .

Strain <sup>a</sup>	DTUs	Country	Host/vector
12 SF	<i>T. cruzi</i> II	Bahia, Brazil	<i>Homo sapiens</i>
21 SF	<i>T. cruzi</i> II	Bahia, Brazil	<i>Homo sapiens</i>
3663	<i>T. cruzi</i> III	Amazonas, Brazil	<i>Panstrongylus geniculatus</i>
3869	<i>T. cruzi</i> III	Amazonas, Brazil	<i>Homo sapiens</i>
4167	<i>T. cruzi</i> IV	Amazonas, Brazil	<i>Rhodnius brethesi</i>
4182	<i>T. cruzi</i> III	Amazonas, Brazil	<i>Rhodnius brethesi</i>
92.80 cl2	<i>T. cruzi</i> V	Santa Cruz, Bolivia	<i>Homo sapiens</i>
92101601P cl1	<i>T. cruzi</i> I	Georgia, USA	<i>Didelphis marsupialis</i>
92122102R	<i>T. cruzi</i> IV	Georgia, USA	<i>Procyon lotor</i>
Bug2148 cl1	<i>T. cruzi</i> V	Rio Grande do Sul, Brazil	<i>Triatoma infestans</i>
Bug2149 cl10	<i>T. cruzi</i> V	Rio Grande do Sul, Brazil	<i>Triatoma infestans</i>
CA-1	<i>T. cruzi</i> I	Argentina	<i>Homo sapiens</i>
CanIII cl1	<i>T. cruzi</i> IV	Pará, Brazil	<i>Homo sapiens</i>
CL	<i>T. cruzi</i> VI	Rio Grande do Sul, Brazil	<i>Triatoma infestans</i>
CL Brener <sup>b</sup>	<i>T. cruzi</i> VI	Rio Grande do Sul, Brazil	<i>Triatoma infestans</i>
CM17	<i>T. cruzi</i> III	Meta, Colombia	<i>Dasypus sp.</i>
Colombiana	<i>T. cruzi</i> I	Colombia	<i>Homo sapiens</i>
Cuica cl1	<i>T. cruzi</i> I	São Paulo, Brazil	<i>Philander opossum</i>
Cutia cl1	<i>T. cruzi</i> I	Espírito Santo, Brazil	<i>Dasyprocta aguti</i>
Davis 9.90	<i>T. cruzi</i> I	Tegucigalpa, Honduras	<i>Triatoma dimidiata</i>
Dm28c <sup>c</sup>	<i>T. cruzi</i> I	Carabobo, Venezuela	<i>Didelphis marsupialis</i>
Dm7	<i>T. cruzi</i> I	Casanare, Colombia	<i>Didelphis marsupialis</i>
Dog Theis <sup>d</sup>	<i>T. cruzi</i> IV	Oklahoma, USA	<i>Canis familiaris</i>
Esmeraldo cl3	<i>T. cruzi</i> II	Bahia, Brazil	<i>Homo sapiens</i>
G	<i>T. cruzi</i> I	Amazonas, Brazil	Opossum
Gambá cl1	<i>T. cruzi</i> I	São Paulo, Brazil	<i>Didelphis azarae</i>
IVV cl4	<i>T. cruzi</i> II	Cuncumen, Chile	<i>Homo sapiens</i>
JEM C	<i>T. cruzi</i> I	Boyacá, Colombia	<i>Homo sapiens</i>
José	<i>T. cruzi</i> I	Paraíba, Brazil	<i>Homo sapiens</i>
K-98 <sup>e</sup>	<i>T. cruzi</i> I	Argentina	<i>Homo sapiens</i>
M5631 cl5	<i>T. cruzi</i> III	Pará, Brazil	<i>Dasypus novemcinctus</i>
M6241 cl6	<i>T. cruzi</i> III	Pará, Brazil	<i>Homo sapiens</i>
MAS cl1	<i>T. cruzi</i> II	Minas Gerais, Brazil	<i>Homo sapiens</i>
MN cl2	<i>T. cruzi</i> V	Region IV, Chile	<i>Homo sapiens</i>
NR cl3	<i>T. cruzi</i> V	Salvador, Chile	<i>Homo sapiens</i>
P63 cl1	<i>T. cruzi</i> VI	Makthlawaiya, Paraguay	<i>Triatoma infestans</i>
PALC	<i>T. cruzi</i> I	Casanare, Colombia	<i>Rhodnius prolixus</i>
Peruvian	<i>T. cruzi</i> II	Peru	<i>Homo sapiens</i>
RA	<i>T. cruzi</i> VI	Argentina	<i>Homo sapiens</i>
Sc43 cl1	<i>T. cruzi</i> V	Santa Cruz, Bolivia	<i>Triatoma infestans</i>
SO3 cl5	<i>T. cruzi</i> V	Potosi, Bolivia	<i>Triatoma infestans</i>
Sylvio <sup>f</sup> X10 cl1	<i>T. cruzi</i> I	Pará, Brazil	<i>Homo sapiens</i>
Td11C	<i>T. cruzi</i> I	Boyacá Colombia	<i>Triatoma dimidiata</i>
Tul8 cl1	<i>T. cruzi</i> II	Tupiza, Bolivia	<i>Triatoma infestans</i>
Tulahuen	<i>T. cruzi</i> VI	Tulahuen, Chile	<i>Homo sapiens</i>
Tulahuen cl2	<i>T. cruzi</i> VI	Tulahuen, Chile	<i>Homo sapiens</i>
X10/1 <sup>g</sup>	<i>T. cruzi</i> I	Pará, Brazil	<i>Homo sapiens</i>
X109/2	<i>T. cruzi</i> III	Makthlawaiya, Paraguay	<i>Canis familiaris</i>
Y	<i>T. cruzi</i> II	São Paulo, Brazil	<i>Homo sapiens</i>
YuYu	<i>T. cruzi</i> I	Minas Gerais, Brazil	<i>Triatoma infestans</i>

Tabela 1 – Cepas Representativas e suas correspondentes Unidades Discretas de Tipagem (DTUs). (ZINGALES *et al.*, 2009)

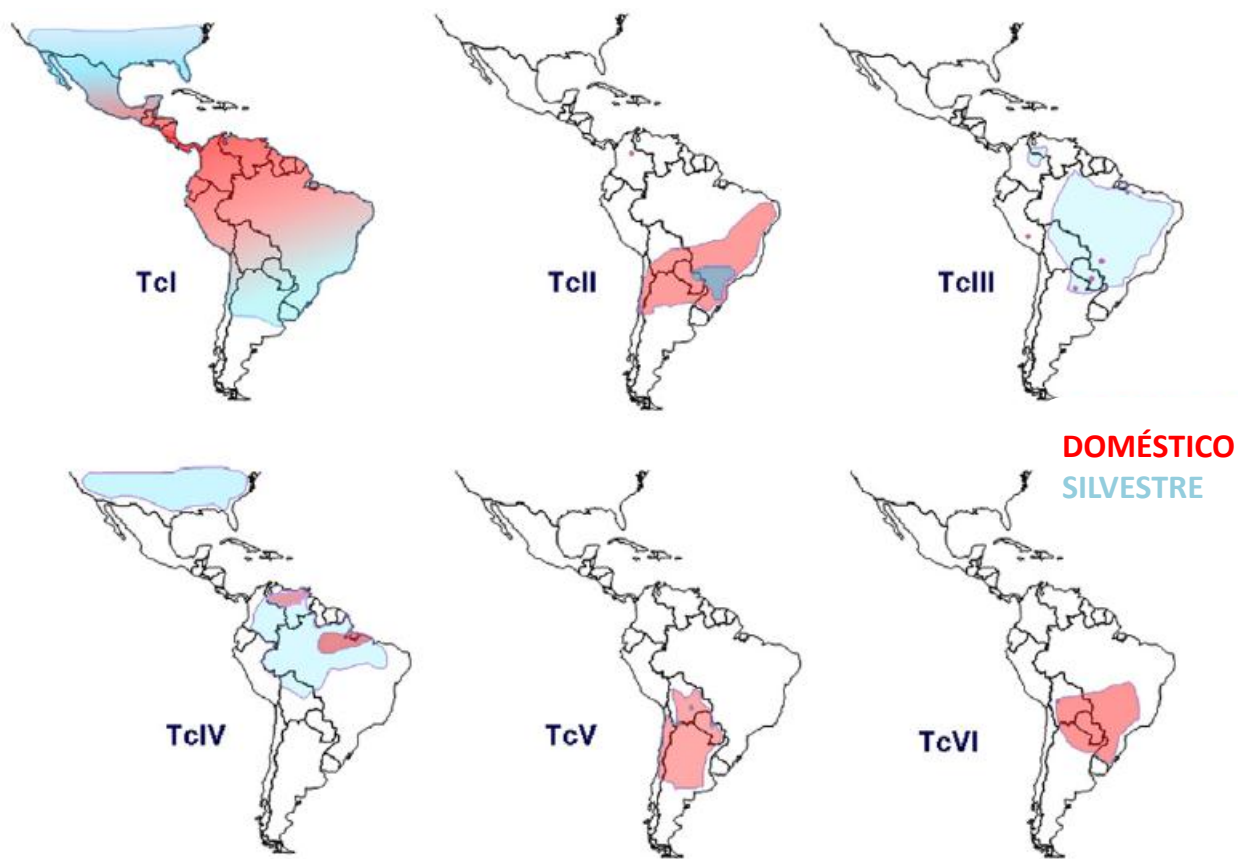


Figura 2 – Distribuição Geográfica aproximada das DTUs de *T. cruzi* em ciclos de transmissão silvestre e doméstico. (ZINGALES *et al.*, 2012).



### 1.1.3 Ciclo Evolutivo do *Trypanosoma cruzi*

Este protozoário apresenta ciclo evolutivo do tipo heteroxênico, ou seja, obrigatoriamente necessita passar por um hospedeiro invertebrado, o triatomíneo - inseto Hemíptero da família *Reduviidae* e um hospedeiro vertebrado, o homem ou outras espécies de mamíferos, como gambás, cães, tatus, ratos, entre outros, para completar o seu ciclo evolutivo e assim se tornar infectante.

Diante das grandes diferenças físico-químicas encontradas nos ambientes apresentados ao *T.cruzi*, este desenvolveu estratégias, como modificações morfogênicas, que decorreram de alterações fisiológicas (ciclo metabólicos, expressão diferenciada de moléculas internas e de superfície, capacidade de infecção e multiplicação, entre outras), para resistir a estas diferenças e se adequar a cada novo ambiente (PREVIATO *et al.*, 1995; DE SOUZA *et al.*, 2002). A estas alterações fisiológicas dá-se o nome de metaciclogênese, modificando formas epimastigotas em formas tripomastigotas metacíclicas.

O *T.cruzi* apresenta três diferentes estágios que se diferenciam morfoestruturalmente da seguinte maneira: Epimastigota, medindo entre 20 e 40µm, possui a maior parte do flagelo desprendida do corpo celular e o cinetoplasto é posicionado anteriormente em relação ao núcleo; Tripomastigota, medindo aproximadamente 25µm de comprimento, possui o cinetoplasto posterior ao núcleo e a maior parte do flagelo concorrendo ao corpo celular; Amastigota, possui forma arredondada, medindo entre 5 e 10µm de comprimento, com flagelo muito curto, quase imperceptível. (DE SOUZA *et al.*, 2002; TYLER & ENGMAN, 2001).

No hospedeiro invertebrado, o ciclo do *T.cruzi* é iniciado quando o inseto vetor (triatomíneo), ao fazer repasto sanguíneo, em animais ou seres humanos infectados, ingere as formas tripomastigotas sanguíneas (forma infectante não-replicativa). Na porção anterior do intestino do inseto, os tripomastigotas sanguíneos se diferenciam em formas proliferativas, epimastigotas. Quando chegam a porção posterior do intestino, estes epimastigotas começam a se multiplicar, através de divisão binária, mantendo a infecção no triatomíneo (DA ROCHA *et al.*, 2002). Na ampola retal, os epimastigotas aderem-se à cutícula cerosa que recobre a parede desta região e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (forma infectante ao hospedeiro vertebrado) (BONALDO *et al.*, 1988; KLEFFMANN *et al.*, 1998). Uma vez completa a diferenciação, estes tripomastigotas metacíclicos se soltam da cutícula, e são eliminados nas excretas (urina e fezes) do inseto em seu próximo repasto sanguíneo. Ao mesmo tempo em que o inseto se alimenta do sangue do hospedeiro

vertebrado, ele libera em sua saliva uma substância urticante que faz com que o local da picada coce, sendo assim, o parasito presente nas excretas entra em contato com a ferida e conseqüentemente com a corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado; os tripomastigotas metacíclicos interagem com as células do SFM (Sistema Fagocítico Mononuclear- geralmente com o macrófago) e, ao entrar no macrófago, os tripomastigotas metacíclicos perdem o flagelo e se diferenciam em amastigotas, e começam a se proliferar por divisão binária; estas amastigotas, dentro do macrófago, se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas e, devido ao batimento flagelar destes, o macrófago se rompe, liberando as mesmas na corrente sanguínea; estas tripomastigotas sanguíneas podem então interagir com novas células do SFM ou podem ser ingeridas por triatomíneos e assim reiniciar o ciclo (ANDRADE *et al.*, 2011; NEVES, 2007) (Figura 3).

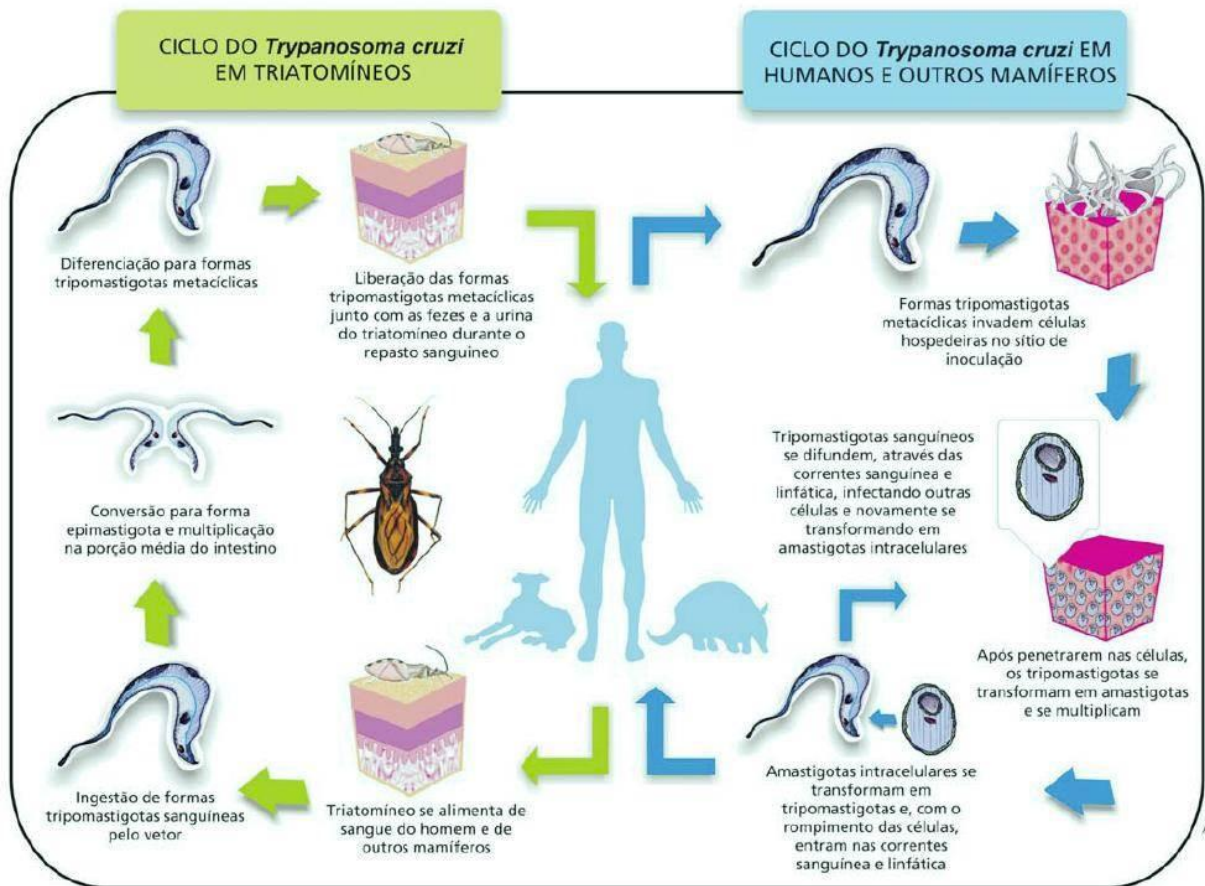


Figura 3 – Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* (simplificado). Infográfico: Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz (<http://www.icict.fiocruz.br/>).

#### 1.1.4 Tratamento

Um século após a descrição da doença de Chagas, diversos aspectos relacionados ao tratamento desta moléstia ainda são considerados complexos, devido à baixa eficácia e elevada toxicidade dos agentes quimioterápicos indicados ao tratamento da doença (RAETHER & HANEL, 2003).

Ainda não existe uma quimioterapia segura para o tratamento da doença de Chagas. Os tradicionais antiparasitários, nifurtimox e benznidazol, além de causarem muitos efeitos colaterais, possuem apenas sua eficácia comprovada na fase aguda da infecção (CANÇADO *et al.*, 1985) e o potencial de cura parasitológica depende do tipo de cepa albergada no hospedeiro (ANDRADE *et al.*, 1985).

O tratamento com benznidazol tem sido mais extensivamente investigado nos estudos clínicos e tem se demonstrado com um melhor perfil de segurança e eficácia. Portanto, é utilizado para o tratamento dos casos agudos desta doença, pois esta droga produz remissão rápida da febre (em 24 a 48 horas) e dos demais sintomas, ao mesmo tempo que diminui a parasitemia. (REY, 2002). A dose a ser usada em crianças deve ser de 5 a 10mg/kg, dividida de 2 a 3 vezes ao dia, durante 60 dias; para os adultos são recomendadas doses de 5mg/kg por dia, durante 60 dias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

O tratamento com tripanomicidas, durante a fase aguda da doença, diminui a parasitemia, podendo haver negatificação sorológica e parasitológica, em mais de 81% dos casos (RASSI *et al.*, 2000), reduzindo a duração e gravidade dos sintomas, e diminuindo a mortalidade. Porém, o tratamento da fase crônica da doença ainda é bastante limitado, principalmente com relação aos sintomas. Para os pacientes acometidos da forma cardíaca da doença, o transplante de coração não garante cura do indivíduo, pois os parasitas escondidos em outros órgãos eventualmente reinvasariam o novo órgão transplantado (LESLIE *et al.*, 2011).

Muitos esforços tem sido realizados para o desenvolvimento de novas drogas, mais específicas, para o tratamento da doença de Chagas, visto que as atualmente utilizadas apresentam baixos índices de cura na fase crônica, alta toxicidade e muitos efeitos colaterais; assim, estudos visando um maior conhecimento da biologia e bioquímica dos tripanossomatídeos nos permite a identificação de diferentes vias e alvos bioquímicos essenciais à sobrevivência destes parasitos, os quais podem ser considerados alvos promissores para o tratamento desta moléstia, como: metabolismo de ergosterol, as cisteíno-proteinases, as tripanotiona redutases, as pirofosfatases e a via de salvamento de purinas, onde se postula a participação das

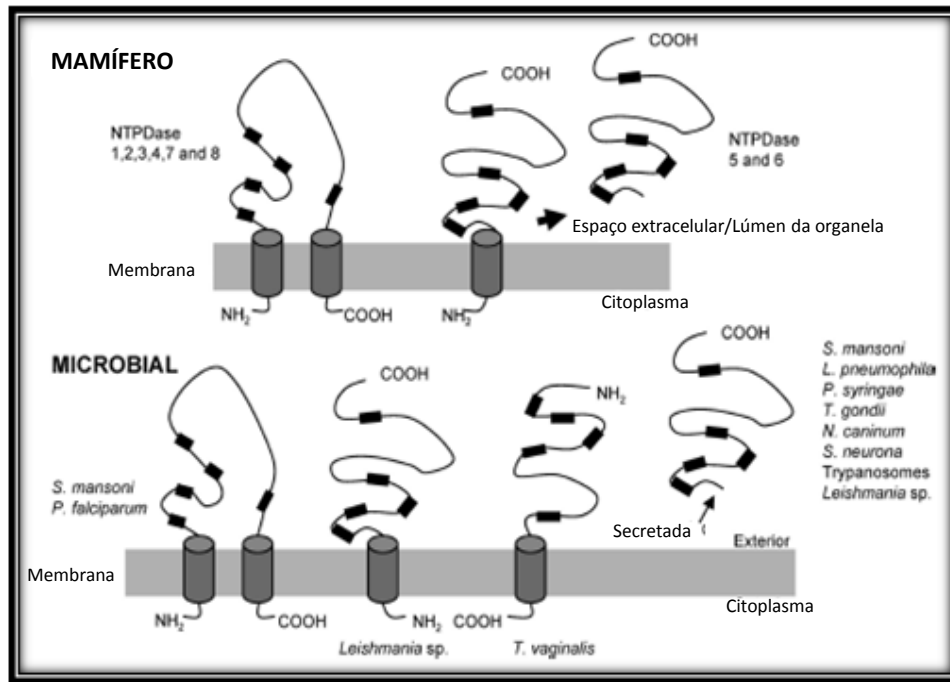
ecto-nucleotidases como fator de virulência, dentre outros (COURA & CASTRO, 2002; URBINA *et al.*, 2003; GUEDES *et al.*, 2006).

### 1.1.5 Ecto-Nucleotidases em Tripanosomatídeos

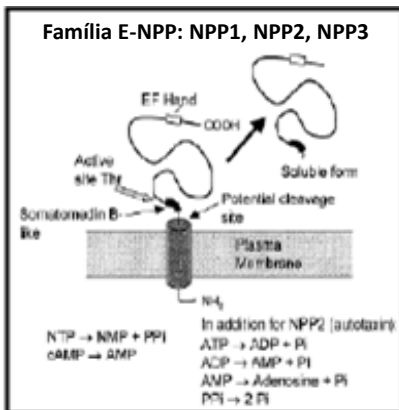
As ecto-nucleotidases são enzimas, que correspondem a uma ampla e diversa classe de proteínas catalíticas, podendo ser ligadas a membrana ou secretadas (proteína solúvel), apresentando o seu sítio ativo voltado para o meio extracelular. Estas podem incluir membros da família das Ecto-nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase (E-NTPDases), Ecto-nucleotídeo fosfatase/fosfodiesterase (E-NPPases), fosfatases alcalinas, 5'-nucleotidases, entre outras (ZIMMERMANN *et al.*, 1996; 1998; 2000) (Figura 4).

A classe das E-NTPDase também é conhecida como apirase ou família CD39, consistindo em dois tipos principais de enzimas: ATP difosfohidrolase (enzimas que hidrolisam nucleotídeos tri e difosfatados- ATP e ADP- em monofosfatados- AMP-, conhecidas como ATPDase ou apirases), e as ecto-ATPases (PLESNER *et al.*, 1995); as quais compartilham 5 domínios altamente conservados, denominados de ACRs (*Apyrase Conserved Regions*), que provavelmente estão relacionadas a suas propriedades catalíticas e, apresentam uma atividade dependente de cátions divalentes, como Magnésio e Cálcio ( $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ , respectivamente) (HANDA & GUIDOTTI, 1996; VASCONCELOS *et al.*, 1996).

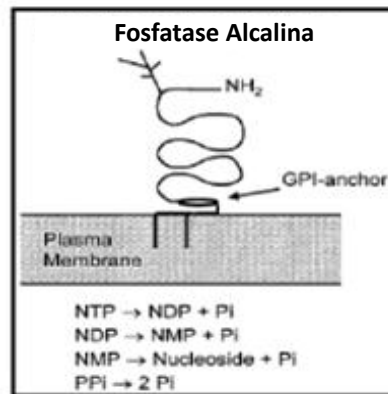
A.



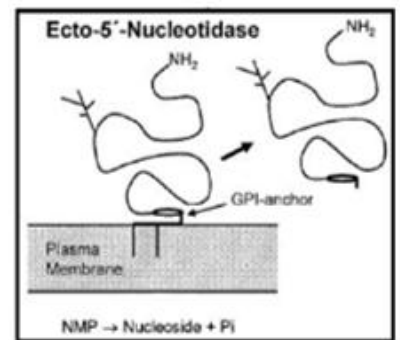
B.



C.



D.



**Figura 4 – Representação esquemática, localização e propriedades catalíticas das diferentes famílias das ecto-Nucleotidases.** (A) Localização conhecida e predita das NTPDases encontradas em humanos e patógenos, baseado em evidências experimentais e motivos de sequência. (Sansom, 2008). (B) Família E-NPP. As enzimas podem ocorrer como dímeros e podem se tornar solúveis (setas), através da clivagem proteolítica. (C) Família das fosfatases alcalinas. (D) Família 5'-nucleotidase de mamíferos. A enzima ocorre em dímeros e pode ser liberada da membrana por uma fosfolipase endógena GPI-específica (adaptado ZIMMERMANN *et al.*, 2000).

Essas enzimas existem tanto em organismos procariotos quanto em eucariotos (KOMOSZYNSKI & WOJTCZAK, 1996) e já foram descritas em diversos protozoários parasitas, dentre eles, *Trypanosoma rangeli* (FONSECA *et al.*, 2006), *Trypanosoma brucei* (LEITE *et al.*, 2007); *Trypanosoma cruzi* (BISAGGIO *et al.*, 2003; FIETTO *et al.*, 2004), *Leishmania tropica* (MEYER-FERNANDES *et al.*, 1997); *Leishmania amazonensis* (BERREDO-PINHO *et al.*, 2001), *Acanthamoeba sp.* (SISSONS *et al.*, 2004), *Tritrichomonas foetus* (DE JESUS *et al.*, 2002), *Trichomonas vaginalis* (MATOS *et al.*, 2001), *Balamuthia mandrillaris* (MATIN & KHAN, 2008), *Entamoeba histolytica* (BARROS *et al.*, 2000) e *Schistosoma mansoni* (VASCONCELOS *et al.*, 1996).

Ainda existem muitas lacunas com relação ao papel destas enzimas, porém algumas funções já vêm sendo atribuídas a elas, como: salvamento de purinas (BOITZ *et al.*, 2012), participação na imunorregulação, através da regulação da concentração de nucleotídeos extracelulares (MIZUMOTO *et al.*, 2002; LANGSTON *et al.*, 2003; BOURS *et al.*, 2006), participação na adesão celular, infectividade, virulência e sobrevivência dos parasitos (NAKKAR *et al.*, 1998; BERREDO-PINHO *et al.*, 2001; FIETTO *et al.*, 2004).

## 1.2 Sinalização Purinérgica

Os nucleosídeos e nucleotídeos (Adenosina, ADP, ATP, UDP e UTP) são componentes encontrados no meio extracelular em pequenas concentrações, porém estes não conseguem atravessar a membrana plasmática das células, sendo necessária sua ligação em moléculas específicas, chamadas de receptores purinérgicos, os quais são encontrados na superfície de inúmeras células do corpo, incluindo as células do sistema imune e não-imune (BURNSTOCK *et al.*, 2007; BOURS *et al.*, 2006).

Os receptores purinérgicos podem ser divididos em duas principais classes: Receptores do tipo P1, os quais se ligam especificamente a adenosina (Ado), e os Receptores do tipo P2, que se ligam aos nucleotídeos (ATP, ADP, UDP). (DI VIRGILIO *et al.*, 2001; RAVELIC *et al.*, 1998). Os receptores P1 são classificados em quatro subclasses de receptores ligados a proteína G, nomeados de A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2b</sub> e A<sub>3</sub>, os quais se ligam a adenosina (Ado) com diferentes afinidades. Já os receptores P2 são subdivididos em receptores P2Y e P2X. Os receptores P2Y consistem em receptores metabotrópicos acoplados a uma proteína G, e são compostos por oito membros funcionalmente descritos (P2Y<sub>1</sub>, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14), estes são

caracterizados por apresentarem uma região N-terminal extracelular e uma região C-terminal intracelular (sendo esta última a que influencia no grau de acoplamento com a proteína G) e 7 regiões transmembranares; já os receptores P2X consistem de receptores ionotrópicos, ligados a canais iônicos, que quando ativados ocasionam a abertura de um poro na membrana celular. Estes são compostos por sete membros (P2X<sub>1-7</sub>), os quais são caracterizados por possuir as porções N e C-terminal intracelulares e por apresentarem duas regiões transmembrana (TM1 e TM2) (GOUNARIS *et al.*, 2002; BURNSTOCK *et al.*, 2007). (Figura 5).

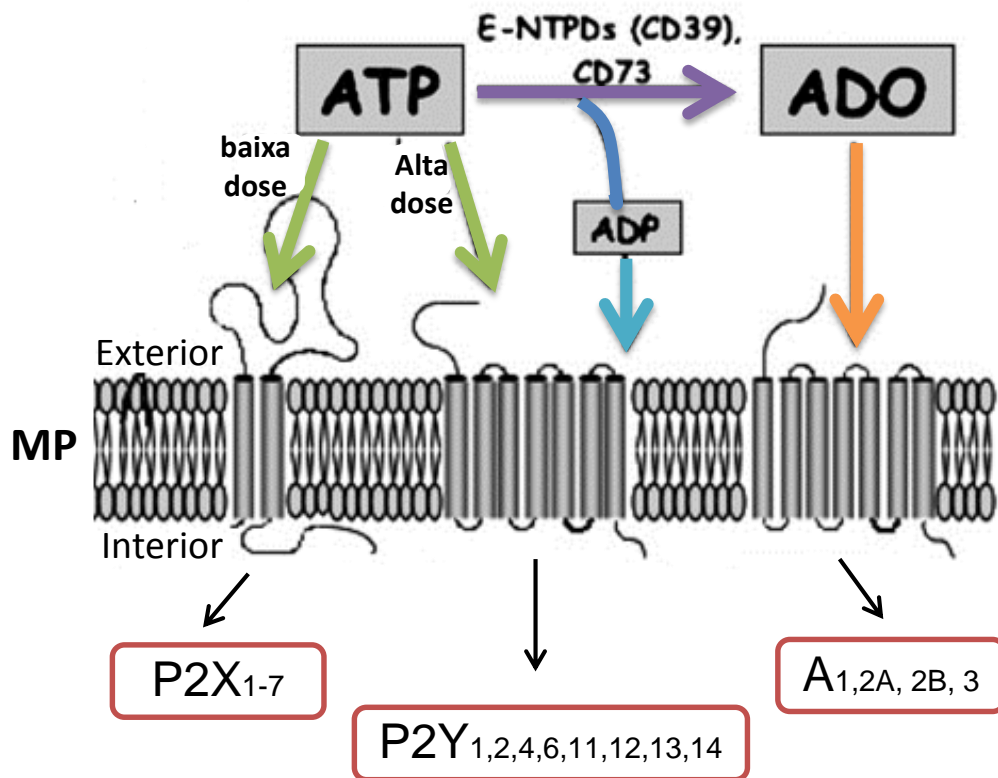
Diversos estudos já demonstraram a importância dos nucleotídeos extracelulares e sua participação na inflamação, agregação plaquetária, resposta imune, entre outros (ROBSON *et al.*, 2006; ATKISON *et al.*, 2006).

O ATP e outros nucleotídeos, quando acumulados no meio extracelular, devido a estresse ou por lesão celular, indicam “sinal de perigo” para o sistema imune, e provocam uma resposta inflamatória do hospedeiro. (SANSOM *et al.*, 2008). O ATP em particular, quando se liga aos receptores do tipo P2, induz a liberação de citocinas pro-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-12 e a produção de TNF- $\alpha$  (BOURS *et al.*, 2006; LA SALA *et al.*, 2003). Por outro lado, adenosina, nucleosídeo gerado pelo catabolismo enzimático do ATP, quando se liga aos receptores do tipo P1, é reconhecida como uma molécula imuno-modulatória e, inibe a liberação de citocinas pro-inflamatórias, induzindo a liberação de IL-10 (DEAGLIO *et al.*, 2007).

Sendo assim, a ação combinada da enzima E-NTPDase (CD39), hidrolisando ATP  $\rightarrow$  ADP  $\rightarrow$  AMP e da enzima 5'-nucleotidase (CD73), hidrolisando AMP  $\rightarrow$  Ado é de grande importância para o controle do nível de ATP extracelular (BOURS *et al.*, 2006).

Como já é sabido, as E-NTPDases já foram descritas em organismos eucariotos (KOMOSZYNSKI & WOJTCZAK, 1996) e em diversos protozoários parasitas, inclusive nos tripanossomatídeos, tendo como uma de suas principais funções a hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados a monofosfatados (PLESNER *et al.*, 1995). Neste sentido, estas enzimas são de grande importância para os parasitas durante este balanço ATP e Ado (pró-inflamatório e anti-inflamatório, respectivamente), uma vez que estas podem ajudá-lo na fuga do sistema imune do hospedeiro vertebrado, através de sua atividade ecto-NTPDásica, desativando as respostas de defesa de seu hospedeiro que envolvam ATP e ADP extracelular, como a ativação plaquetária e a reativação citolítica de linfócitos T (FIETTO *et al.*, 2004).





**Figura 5 – Diagrama topológico de Purinoreceptores.** Nucleotídeos medeiam efeitos biológicos através de uma serie de receptores, os quais são classificados por sua afinidade por ATP, ADP e outros nucleotídeos. A adenosina gerada age via quatro grupos de receptores seletivos acoplados a proteína G (modificado de YEGUTIKIN *et al.*, 2008).

### 1.2.1 Purinas e Tripanosomatídeos

As purinas são extremamente importantes em uma variedade de processos celulares e metabólicos vitais para os organismos, sendo essenciais para a síntese dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), produção de energia, entre outros. Ao contrário dos hospedeiros vertebrado e invertebrado, os tripanosomatídeos são incapazes de sintetizar o anel de purina, ou seja, não realizam síntese *de novo* de purinas, sendo absolutamente dependentes de seus hospedeiros para aquisição destas, que são essenciais a sua sobrevivência. (BOITZ *et al.*, 2012; EL KOUNI *et al.*, 2003).

Os tripanosomatídeos expressam uma variedade de enzimas que realizam a hidrólise dos nucleosídeos, nucleotídeos e ácidos nucleicos de seus hospedeiros. Dentre elas, podemos citar, Ecto-nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase (E-NTPDases), Ecto-nucleotídeo fosfatase/fosfodiesterase (E-NPPases), fosfatases alcalinas, 5'-nucleotidases, entre outras (ZIMMERMANN *et al.*, 1996; 1998; 2000).

Alguns trabalhos já vêm sendo publicados, mostrando uma associação destas enzimas com parasitas apicomplexos e evidenciando um papel potencial destas no salvamento das purinas, além de outras potenciais funções (SANSOM *et al.*, 2008). Em 1985, GOTTLIEB e *cols.* observou que os níveis das atividades 3'- e 5'-nucleotidases de *Crithidia fasciculata* eram regulados pela disponibilidade de Ado no meio de cultura onde, especificamente, os organismos cultivados em meio contendo concentrações reduzidas de purina eram os que apresentavam maiores níveis da atividade desta enzima, quando comparadas com os organismos controle, cultivados em meio completo.

BERREDO-PINHO e *cols.* (2001) e DE SOUZA e *cols.* (2010) mostraram que parasitas cultivados na presença de Ado apresentavam uma diminuição da atividade ATPásica, visto que uma das funções propostas para as ecto-nucleotidases seria a obtenção de bases de purina, neste sentido, uma maior disponibilidade desta no meio de cultura, contribuiria para a diminuição da atividade da enzima.

Em 2012, FRASSON e *cols.* mostraram que parasitas (*Trichomonas vaginalis*) cultivados em condições onde a suplementação com soro era limitada (apenas 1% de soro), particularmente um isolado clínico, apresentavam um significativo aumento da hidrólise de ATP, ADP e AMP extracelular e dos níveis de expressão do gene da enzima NTPDase.

Esses estudos corroboram entre si e sugerem fortemente um papel fundamental destas enzimas na geração de adenosina, a qual é essencial para o crescimento e metabolismo dos parasitas (MUNAGALA & WANG, 2003).

Diversos trabalhos científicos têm sido realizados buscando uma melhor compreensão do papel das E-NTPDases nos processos de infectividade e virulência de parasitos. Em 1998, NAKKAR e *cols.* observaram a presença de diferentes isoformas da NTPDase em diferentes cepas de *Toxoplasma gondii*, correlacionando a presença das isoformas da NTPDase I e II com as cepas virulentas e a presença apenas da isoforma da NTPDase I nas cepas avirulentas.

Estudos realizados por FIETTO e *cols.* em 2004, mostraram a localização da TcNTPDase na superfície externa de todas as formas evolutivas do *T. cruzi*; neste mesmo ano MEYER-FERNANDES e *cols.* (2004) realizaram experimentos com as diferentes formas evolutivas deste parasito (tripomastigotas, amastigota e epimastigota) e observaram uma atividade E-ATPásica dependente de  $Mg^{2+}$ , cerca de 20 vezes maior nas formas infectantes (tripomastigotas e amastigota) quando comparada a forma não infectante (epimastigota).

DE SOUZA e *cols.*, em 2010, avaliaram as atividades ecto-NTPDásicas em cepas virulentas (< 15 passagens) e avirulentas (> 100 passagens) de *L. amazonensis*, a fim de correlacionar o papel desta enzima com a virulência do parasito. Eles observaram que parasitas com mais de 100 passagens em cultura apresentavam redução na atividade de hidrólise do ATP e do ADP, enquanto que os parasitos com menos de 15 passagens apresentavam o resultado oposto a este. Neste mesmo trabalho, foi observado que os parasitas (> 100 passagens) eram menos virulentos *in vivo*, produziam uma menor lesão e menor resposta imune do hospedeiro vertebrado.

Ainda são necessários muitos esforços para se compreender melhor o papel das ecto-NTPDases em parasitos. No entanto, fortes evidências sugerem que estas enzimas estão relacionadas aos processos de infectividade e virulência dos tripanosomatídeos, porém, até o presente momento, a maioria dos estudos publicados nesta área estão voltados para a atividade enzimática das ecto-NTPDases em parasitas intactos ou frações de membrana plasmática; no entanto, na parte externa da membrana celular existem diversas outras enzimas, que compartilham atividades ecto-nucleotidásicas distintas. Sendo assim, há uma falta de informação sobre a contribuição específica de cada uma destas enzimas durante este processo. Esta especificidade necessária para ampliar o conhecimento pode ser adquirida através das ferramentas da Biologia Molecular, utilizando-se as análises de expressão gênica, onde se encontra a vantagem de avaliar especificamente o alvo de interesse.

### 1.2.2 Expressão Gênica em Tripanossomatídeos

Os tripanossomatídeos não apresentam condensação cromossômica em seu ciclo celular e por isso, diferentes abordagens têm sido necessárias a fim de se analisar sua diversidade genética, como: a busca por novos marcadores enzimáticos, polimorfismos em seus fragmentos de restrição do kDNA, cariótipos moleculares, *fingerprints* de DNA, dentre outros; o que evidencia a enorme plasticidade de seu genoma. (GIBSON & MILES, 1986; AYMERICH *et al.*, 1989; MOREL *et al.*, 1980; MACEDO *et al.*, 1992).

Os tripanossomatídeos apresentam, além de seu DNA nuclear, um DNA mitocondrial (ou kDNA), o qual é formado por uma rede de cadeias circulares concatenadas e compactadas de DNA mitocondrial, denominada cinetoplasto, que é composto por dois tipos de estruturas: os maxicírculos e os minicírculos. Os maxicírculos são compostos pelos genes que mantêm as funções mitocondriais (WESTEMBERG *et al.*, 2006) e muitos deles sofrem regulação pós-transcricional num processo conhecido como edição de RNA, no qual a molécula de mRNA sofre adição ou deleção de uma ou mais moléculas de uridina (SIMPSON *et al.*, 1987).

Já os minicírculos, são moléculas de DNA que codificam sequências, que quando transcritas, dão origem a pequenas moléculas de RNA, conhecidas como RNAs guias, determinando o local e o número de inserções ou deleções a serem feitas; uma outra característica destes é agir como um fator mutagênico, se integrando ao genoma do hospedeiro (TEIXEIRA *et al.*, 1991; SIMÕES-BARBOSA *et al.*, 1999).

O genoma do tripanossomatídeos é composto por várias sequências de DNA em *tandem*, estas sequências são compostas por genes codificadores de proteínas, como as que formam o glicocálice do parasita, genes codificadores dos diferentes tipos de RNA e proteínas constitutivas (*housekeeping*) como histonas, tubulina, actina, dentre outras; além disso, existem as sequências que atuam como espaçadores ou conectores, podendo estas estarem situadas entre genes codificadores de proteínas ou de RNA.

Diferente da maioria dos eucariotos, os tripanossomatídeos apresentam um mecanismo de controle da expressão gênica diferenciado, sendo este do tipo policistrônico, ou seja, os cromossomos são transcritos em longos mRNAs policistrônicos, (os quais geralmente não codificam funcionalmente para proteínas que estejam relacionadas), que devem ser processados em mRNAs monocistrônicos antes se serem traduzidos (CAMPBELL *et al.*, 2003). Os mRNAs monocistrônicos

(maduros) são gerados a partir de transcritos primários por trans-splicing e poliadenilação (CLAYTON *et al.*, 2002). O trans-splicing consiste no processo de adição de uma sequência de 39 nucleotídeos (mini-éxon ou splice leader- SL-) na extremidade 5' de cada mRNA (PARSONS *et al.*, 1984). Adicionalmente, a poliadenilação (adição da cauda poli(A)), é feita na porção 3' do mRNA. Ambos os eventos são dependentes de regiões ricas em polipirimidina, localizadas nas regiões intergênicas (HUMMEL *et al.*, 2000; BENZ *et al.*, 2005; SIEGEL *et al.*, 2005). Os mRNA policistrônicos são transcritos na mesma taxa, enquanto que os mRNAs monocistrônicos apresentam diferentes níveis em sua expressão (HAILE & PAPADOPOULOU, 2007).

Outra diferença encontrada nos tripanossomatídeos é que estes não apresentam promotores para a RNA polimerase II (responsável por transcrever os mRNAs em geral, os genes da sequência líder e os genes de pequenos RNAs presentes no nucléolo). Sendo assim, estes organismos promovem a regulação da expressão gênica a nível pós-transcricional, durante o processamento dos transcritos primários (trans-splicing e poliadenilação), da estabilidade do mRNA ou da estabilidade dos produtos da tradução (VANHAME & PAYS, 1995; ÁVILA *et al.*, 2001; BRINGAUD *et al.*, 2007). Já é sabido que os mRNAs do *T.cruzi* podem ser armazenados no citoplasma, reprimindo a transcrição (GOLDENBERG *et al.*, 1985) e sugerindo assim que a mobilização do mRNA pelos polissomas possa ser um mecanismo de regulação pós-transcricional da expressão de alguns genes em tripanossomatídeos (ÁVILA *et al.*, 2001).

Essa expressão diferencial dos genes nos tripanossomatídeos é indispensável para sua sobrevivência, visto que estes precisam se adaptar aos diversificados ambientes encontrados em seus hospedeiros, ocasionando intensas mudanças morfológicas e metabólicas durante seu ciclo evolutivo. (CLAYTON & SHAPIRA, 2007). Sendo assim, a síntese constitutiva dos transcritos e a seleção das mensagens certas apenas na etapa de maturação do mRNA permite ao parasito uma mudança na expressão dos genes mais rápida para se adaptar ao novo ambiente e sobreviver. (GOMEZ *et al.*, 2010).

Os eventos regulatórios que controlam a abundância de mRNA na célula tem recebido considerável atenção nos últimos anos, sendo a degradação diferencial destas moléculas, as diferenças de estrutura e sua estabilidade na célula os principais mecanismos que vem sendo estudados. TEIXEIRA e *cols.*, em 1999, mostraram em *T.cruzi* que pequenas variações (inserções ou deleções) nas regiões

UTRs de alguns genes podem funcionar como marcadores moleculares para estabelecer relações entre expressão de genes e estrutura de populações. Existem evidências de que o SL confere estabilidade ao mRNA, o que garante uma maior resistência a degradação por RNAses dentro da célula. Transcritos desprovidos do SL perdem sua estabilidade e não são traduzidos (ULLU *et al.*, 1996).

Seja por estes mecanismos ou por outros que ainda não são conhecidos, um grande número de genes é diferencialmente expresso durante o ciclo celular dos tripanossomatídeos, sendo assim é de extrema importância compreender estes complexos mecanismos de iniciação e terminação da transcrição neste grupo de eucariotos (ARCHER *et al.*, 2009; MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2004).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar a modulação da expressão do gene correspondente à ecto-NTPDase I (TcNTPDase-1) entre diferentes subpopulações do *Trypanosoma cruzi* (DTUs I-VI), diferentes etapas do seu ciclo evolutivo, e durante o choque térmico.

### 2.2 Objetivos Específicos

- 1) Padronizar uma reação de PCR em Tempo Real para a quantificação relativa da expressão gênica da TcNTPDase-1 de *T. cruzi* pelo método do  $\Delta\Delta Ct$ .
- 2) Avaliar os níveis de expressão da TcNTPDase-1, através da quantificação de seu RNA mensageiro por RT-PCR em Tempo Real, em condições padrões de cultivo de epimastigotas de *T. cruzi* de diferentes subpopulações, pertencentes aos grupos I a VI, em cepas virulentas e avirulentas.
- 3) Avaliar a expressão da TcNTPDase-1 durante a curva de crescimento de formas epimastigotas, a 28°C e 37°C, buscando observar a regulação da expressão do gene em condições de carência nutricional e em função da mudança de temperatura.
- 4) Avaliar os níveis de expressão da TcNTPDase-1, através da quantificação de seu RNA mensageiro por RT-PCR em Tempo Real, em diferentes estágios do ciclo evolutivo do parasito (epimastigota, amastigota e tripomastigota), obtidos através da infecção *in vitro* de células Vero.
- 5) Avaliar as atividades ecto-ATPásica e ecto-ADPásica (ecto-NTPDásica) nas diferentes subpopulações e formas evolutivas de *T. cruzi*, comparando os resultados com as análises de expressão gênica da TcNTPDase-1.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Cultivo de *Trypanosoma cruzi*

As formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, Dm28c (*T.cruzi* I), Y (*T.cruzi* II), INPA 3663 (*T.cruzi* III), INPA 4167 (*T.cruzi* IV), LL014 (*T.cruzi* V) e CL-14 (*T.cruzi* VI), foram cultivadas em meio BHI (Brain Heart Infusion – BD®, USA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino termodesativado, durante 5 ou 7 dias a 28°C ou 37°C. Após este período, as células foram recolhidas por centrifugação, lavadas três vezes com tampão de lavagem (NaCl 116mM, KCl 5,4mM, Hepes-KOH pH 7,2 50mM, D-glicose 5,5mM), e ressuspensas na mesma solução. O crescimento celular foi estimado por contagem das células na Câmara de Neubauer.

#### 3.2 Cultivo de Célula VERO

A linhagem de células VERO ( $1 \times 10^6$  células) foi cultivada em garrafas de 75cm<sup>3</sup>, contendo meio RPMI 1640 (Gibco BRL) suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino; a cultura foi mantida a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após cultivo de 48h, as células foram infectadas (proporção 1:10) com tripomastigotas sanguíneos, coletados de camundongos suíços, infectados com a cepa Y de *T.cruzi*, no dia do pico de parasitemia. Após 5-6 dias de infecção, o sobrenadante foi coletado, centrifugado a 500Xg por 5 min, e deixado em repouso a 37°C durante 30 min, para a migração das formas tripomastigotas para o sobrenadante, enquanto as formas amastigotas permaneceram no pellet. Após este procedimento, o sobrenadante foi coletado e centrifugado, a 3.000Xg por 10 min para coleta das formas tripomastigotas.

#### 3.3 Medida da atividade ecto-ATPásica e ecto-ADPásica

Epimastigotas, tripomastigotas ou amastigotas intactos de *T.cruzi* ( $0,5 \times 10^8$  células) foram incubados durante 1h a 28°C (epimastigota) ou 37°C (tripomastigota e amastigota) em meio de reação contendo 116mM NaCl, 5,4mM KCl, 5,5mM D-glicose, 5mM MgCl<sub>2</sub> e 50mM Hepes-Tris, na presença de 5mM de ATP ou ADP (Sigma-Aldrich), em um volume final de 0,5mL. A reação foi disparada pela adição dos parasitas intactos vivos e, interrompida pela adição de 1mL de 0,2M HCl gelado. A suspensão de células foi centrifugada a 15.000Xg por 5 min e, foi retirada uma



alíquota do sobrenadante para quantificação do fosfato inorgânico (Pi), através do método colorimétrico Fiske & Subbarow (TAUSSKY *et al.*, 1953).

### **3.4 Extração de RNA**

A extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. Para a extração de RNA das diferentes cepas (cultivadas como descrito anteriormente) foram adicionados 250µL de pool (aproximadamente  $1 \times 10^8$  parasitos) para 1mL de Trizol. A seguir, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 5 min., para haver completa dissociação do complexo nucleoprotéico. Após este intervalo, foram adicionados 200µL de clorofórmio e os eppendorfs foram agitados vigorosamente e incubados à temperatura ambiente por 2 a 3 min. As amostras foram centrifugadas a 12.000Xg durante 15 min a 4°C.

A fase aquosa foi então transferida para um eppendorf de 1,5mL e foram adicionados 500µL de isopropanol. A mistura foi homogeneizada, incubada à temperatura ambiente por 10 min. e, centrifugada a 12.000Xg por 10 min. a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 75%, a amostra foi centrifugada a 7.500Xg por 5 min a 4°C; o sobrenadante novamente foi descartado.

Posteriormente, o precipitado de RNA foi ressuspenso em água DEPC; alíquotas de 5µL foram utilizadas para quantificação do RNA por espectrofotometria a 260/280/230nm. A integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1,5%, na presença de formaldeído.

### **3.5 Síntese de cDNA**

Para a síntese de cDNA utilizamos o kit Superscript III (Invitrogen); Em tubos de 0,2mL, foram preparados os mix RNAs/Iniciadores adicionando-se 3µg RNA (respectivas cepas), os Oligo (dT)<sub>20</sub> 50µM, a mistura de dNTP 10mM e a água DEPC qsp 10µL.

As amostras foram incubadas no termociclador a 65°C por 5 min., e depois misturadas com 10µl de mix de síntese de cDNA (RT buffer 10X, MgCl<sub>2</sub> 25mM, DTT 0,1M, RNaseOUT 40U/µL e Superscript III RT 200U/µL) ou com 10µl de mix de síntese de cDNA controle (RT buffer 10X, MgCl<sub>2</sub> 25mM, DTT 0,1M, RNaseOUT 40U/µL e H<sub>2</sub>O – sem a adição da enzima Superscript III). Após a incubação, as

amostras foram colocadas no gelo por pelo menos 1 min. Após este tempo, elas foram homogeneizadas cuidadosamente com a mão e foram centrifugadas rapidamente (spin), sendo incubadas no termociclador por 50 min a 50°C; depois, para terminar a reação, foram incubadas a 85°C por 5 min e colocadas imediatamente no gelo. Após terem sido rapidamente centrifugadas, foi adicionado 1µL de RNase H a cada tubo e, incubado novamente no termociclador a 37°C por 20 min. Após, o cDNA foi armazenado à -20°C.

### 3.6 PCR com gradiente de temperatura

Para o teste dos iniciadores (*TcNTPDase-1*) e para verificar a temperatura de hibridação ideal na PCR, foram realizados ensaios de PCR convencional e PCR com gradiente de temperatura de hibridação, respectivamente, utilizando amostras de DNA concentradas e/ou diluídas (1:1000) do clone CL Brener (extraídas com DNA mini kit- QIAGEN, segundo o protocolo do fabricante). Estes produtos foram aplicados em um gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo.

### 3.7 Quantificação da expressão do gene da *TcNTPDase-1* por RT-PCR em Tempo Real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em um sistema ABI Prism 7500 Fast (Applied Biosystems), através do método da quantificação relativa ( $\Delta\Delta C_t$ ), utilizando-se o sistema que emprega o corante fluorescente SYBR Green (SYBR Green PCR Master Mix ® - Applied Biosystems). Os iniciadores e as concentrações utilizadas para esses ensaios foram: *TcNTPDase-1 Fw* (600nmol/L): 5'-GCGGAACCGCAACACCCTCA-3' / *TcNTPDase-1 Rv* (600nmol/L): 5'-CGGTCGAGCTGAAGCGCCAA-3', que amplificam uma região de 111 pares de base, pertencente ao terço inicial da sequência do RNA mensageiro (Número de acesso ao GeneBank: AY540630). Como normalizadores da quantificação relativa por RT-PCR em tempo real, foram utilizados os iniciadores *TcCalmodulina Fw* (600nmol/L): 5'-CCCGACGGAGGCGGAGCTGC-3' / *TcCalmodulina Rv* (600nmol/L) : 5'-GTCCACGTCCGCTCGCGGA-3', que amplificam uma região de 268 pares de base, que foram previamente desenhados para o gene da calmodulina, a partir da CL-Brener (Número de acesso ao GeneBank: X52096.1); e os iniciadores *TcGAPDH Fw* (300nmol/L): 5'-GTGCGGCTGCTGTCAACAT-3' / *TcGAPDH Rv* (300nmol/L): 5'-AAAGACATGCCCGTCAGCTT-3', que amplificam uma região de 100 pares de base,

desenhados previamente para o gene GAPDH de *T.cruzi* (Número de acesso ao GeneBank: XM\_807044.1).

As condições para reação da RT-PCR foram: 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 62°C por 1 minuto. Para monitorar a especificidade dos oligonucleotídeos, curvas de dissociação foram realizadas após cada experimento, resultando em um único pico. As reações foram realizadas em duplicatas usando 2µL de amostra de cDNA, em um volume total de 20µL. O cálculo da expressão gênica foi realizado pelo software ExpressionSuite v.1.0.3 para Windows® (Applied Biosystem), o qual calcula o *Fold Change* de acordo com o proposto por LIVAK & SCHMITTGEN em 2001 e, normalização dos resultados foi feita através da média geométrica dos valores de Ct dos endógenos (Calmodulina e GAPDH), conforme proposto por VANDESOMPELE e *cols.*, 2002.

### **3.8 Sequenciamento de DNA**

Foi realizada uma PCR convencional utilizando os cDNAs das diferentes cepas/clones do *T.cruzi* (DTUs I - VI) e os oligonucleotídeos descritos. Uma parte do produto da PCR foi visualizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, observando-se bandas únicas. Em seguida, estes foram purificados utilizando o Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kits (GE), segundo protocolo do fabricante. As amostras então foram submetidas ao sequenciamento automático (sequenciador 48 capilar ABI-3730, Applied Biosystems) utilizando os mesmos oligonucleotídeos da PCR, na plataforma de Sequenciamento de DNA do PDTIS/ FIOCRUZ. A qualidade das sequências obtidas foi verificada através do software Sequence Scanner V 1.0 (Applied Biosystems) e as mesmas foram alinhadas utilizando-se o software MEGA V 4.0.

### **3.9 Análise Estatística**

Todos os experimentos foram realizados em duplicata experimental e triplicata biológica; os resultados foram analisados estatisticamente através do software Sigmaplot v11, utilizando os testes t-student ou Rank Sum, de acordo com a variância entre as amostras.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Desenho dos Iniciadores

Os iniciadores utilizados neste trabalho foram desenhados utilizando a ferramenta Primer-Blast, disponível no sítio do National Center for Biotechnology Information (NCBI) ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)). A análise da qualidade dos iniciadores, em relação à formação de *hairpins*, homodímeros e heterodímeros, foi realizada através da ferramenta Oligoanalyzer, disponível no sítio da *Integrated DNA Technologies* (IDT - <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>).

Para o alvo TcNTPDase-1, os iniciadores amplificaram uma região de 111 pares de base, pertencente ao terço inicial da sequência do RNA mensageiro (Número de acesso ao GeneBank: AY540630) do gene de cópia única correspondente à enzima TcNTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi* (FIETTO *et al.*, 2004).

Os iniciadores TcGAPDH, geraram um amplicon de 100 pares de base na PCR, este alvo foi utilizado como um dos normalizadores da quantificação relativa por RT-PCR em Tempo Real; estes iniciadores foram desenhados previamente com base na sequência do gene GAPDH (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* (Número de acesso ao GeneBank: XM\_807044.1).

Os iniciadores TcCalmodulina, que produziram um amplicon de 268 pares de base na PCR, foram utilizados para amplificar o gene correspondente à calmodulina de *T. cruzi*, este foi utilizado como o segundo normalizador da quantificação relativa por RT-PCR em Tempo Real; estes oligonucleotídeos foram previamente desenhados com base na sequência do gene da Calmodulina da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* (Número de acesso ao GeneBank: X 52096.1). (Tabela 2).

A especificidade dos iniciadores foi avaliada por PCR convencional e em Tempo Real, e estes mostraram que amplificavam especificamente sequências de *Trypanosoma cruzi*.

**Tabela 2 – Sequência dos iniciadores para os alvos TcNTPDase-1, Calmodulina, GAPDH e *T.cruzi*.**

	<b>Alvos</b>	<b>Sequência dos Iniciadores</b>	<b>Amplicon</b>
<b>Alvo Principal</b>	TcNTPDase-1	Fw – 5'-GCG GAA CCG CAA CAC CCT CA -3' Rv – 5'-CGG TCG AGC TGA AGC GCC AA -3'	111pb
<b>Endógeno</b>	Calmodulina	Fw – 5'-CCC GAC GGA GGC GGA GCT GC-3' Rv – 5'-GTC CAC GTC GGC CTC GCG GA- 3'	268pb
<b>Endógeno</b>	GAPDH	Fw – 5'-GTG CGG CTG CTG TCA ACA T-3' Rv – 5'-AAA GAC ATG CCC GTC AGC TT- 3'	100pb
<b>Primers 121/122</b>	Cruzi	Fw- 5'-AAA TAA TGT ACG GG(T/G) GAG ATG CAT GA-3' Rv- 5'-GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA-3'	330pb

## 4.2 Padronização dos ensaios de RT-PCR em Tempo Real

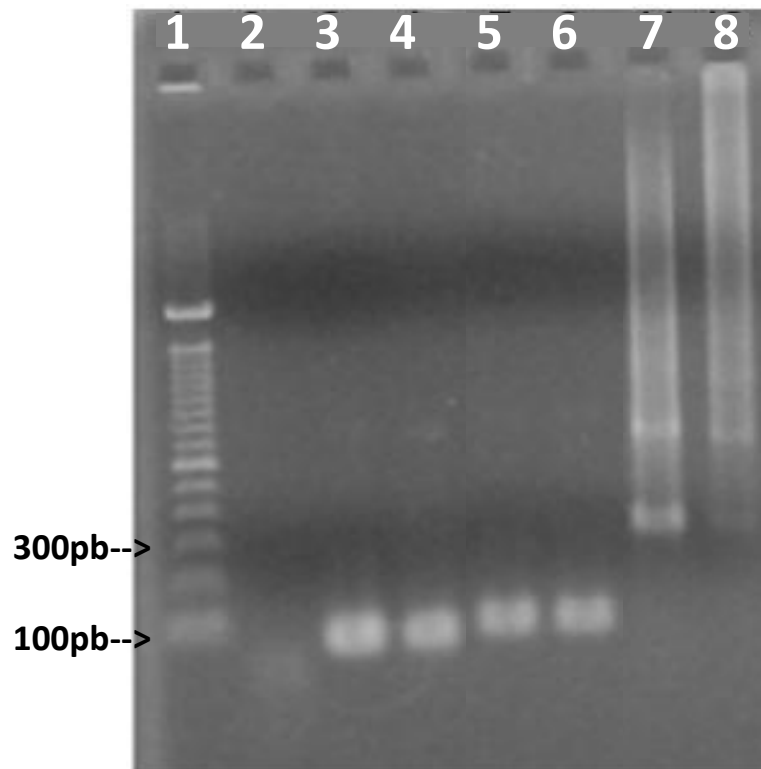
Para verificar a funcionalidade dos oligonucleotídeos TcNTPDase-1, desenhados pelo nosso grupo, amostras concentradas de DNA de *T. cruzi*, do clone CL Brener -  $10^7$  epimastigotas/mL (extraídas com DNA mini kit – QIAGEN, segundo protocolo do fabricante) e amostras diluída de DNA de *T. cruzi* (1:1000) foram testadas em uma concentração de 0,2 $\mu$ M de iniciador. O DNA foi amplificado no Termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems®) e, para visualização do resultado, os produtos da PCR convencional foram aplicados em um gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo e fotodocumentado. Como controle positivo da reação, foram utilizados os iniciadores 121 e 122, que amplificam uma região de 330 pares de base do DNA do cinetoplasto (kDNA) de *T. cruzi*. Para controle negativo, foi utilizada H<sub>2</sub>O ultrapura, no lugar de DNA. Pela PCR convencional, pudemos visualizar no gel de agarose uma única banda para TcNTPDase-1 (111pb), tanto em amostras de DNA diluídas (1:1000) ou concentradas (figura 6).

A fim de avaliar qual seria a temperatura de anelamento ideal para nossos ensaios de PCR em Tempo Real, amostras de DNA do clone CL Brener combinadas com o oligonucleotídeo TcNTPDase-1 foram submetidas a uma reação de PCR com gradiente de temperatura de anelamento variando de 63°C a 53°C (63°C; 61,1°C; 58,4°C; 55,8°C; 53,7°C; 53°C). Para visualização dos resultados, os produtos da PCR convencional foram aplicados em um gel de agarose 1,5% e, corado com brometo de etídeo. Na Figura 7 (letra A), podemos observar que a temperatura de anelamento ideal para o nosso alvo ficou entre 58,4°C e 55,8°C. Realizamos também um controle negativo, sem DNA adicionado, com o objetivo de verificar se ocorreria a dimerização dos iniciadores nas temperaturas testadas. Nenhuma banda foi observada no gel nestes controles (dados não mostrados).

Com o objetivo de avaliar a melhor concentração de iniciadores a ser utilizada em nossos ensaios de PCR em Tempo Real, diferentes combinações de concentrações foram testadas para os iniciadores senso e anti-senso, respectivamente, sendo as seguintes: 100nM/100nM; 300nM/100nM; 600nM/100nM; 100nM/300nM; 300nM/300nM; 600nM/300nM; 100nM/600nM; 300nM/600nM; 600nM/600nM. Para este ensaio, foi utilizado o fluoróforo SYBR Green para geração de fluorescência.

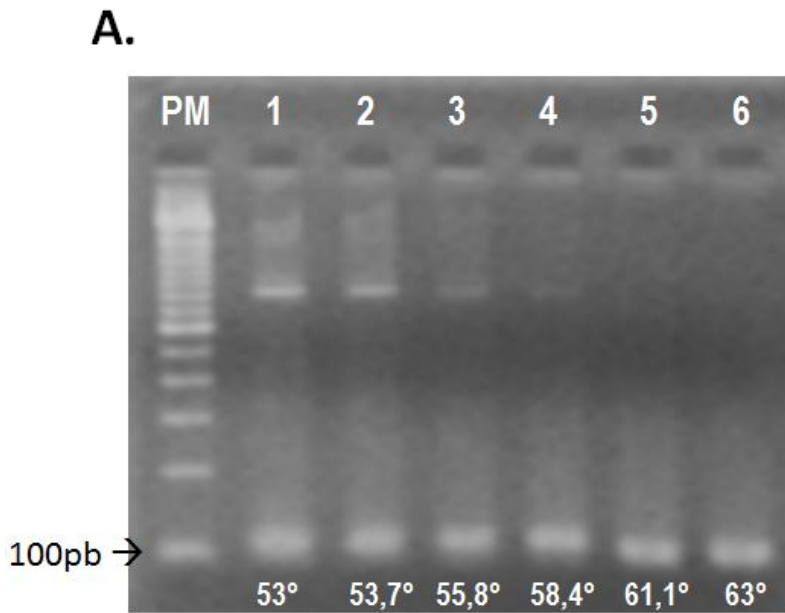
Através dos valores médios de CTs obtidos, e da fluorescência gerada ( $\Delta R_n$ ), observamos que a melhor combinação de *iniciadores* para TcNTPDase-1 foi de 600nM/600nM (Figura 7 – B).

A fim de padronizar a quantificação relativa das nossas amostras, pelo método do Ct comparativo ( $\Delta\Delta Ct$ ), foi produzida uma curva padrão de cDNA de *T.cruzi* (diluição seriada 1:5, de 10ng/ $\mu$ L a 0,0032ng/ $\mu$ L) para avaliar os três diferentes alvos testados (TcNTPDase-1, TcCalmodulina e TcGAPDH). Observamos ampliações com valores de Ct adequados à quantificação dos alvos, em toda as concentrações de cDNA da curva padrão (Figura 7 – D). Observamos também que para cada alvo analisado, foram gerados picos bem definidos na curva de dissociação (Figura 7 – E), comprovando a especificidade dos *iniciadores* utilizados. Ao analisar as curvas padrão geradas para os três alvos, não observamos diferenças significativas entre as suas eficiências, o que nos possibilitou quantificar nossas amostras pelo método do Ct comparativo ou método do  $\Delta\Delta Ct$ . Mesmo assim, para validar a utilização do método do  $\Delta\Delta Ct$ , foram graficados os valores de  $\Delta Ct$ , calculados a partir da diferença entre o *threshold cycle* (Ct) referente ao gene da TcNTPDase-1 e o respectivo Ct dos genes normalizadores, através da fórmula [ $\Delta Ct = Ct (TcNTPDase-1) - Ct (TcCalmodulina)$ ] ou [ $\Delta Ct = Ct (TcNTPDase-1) - Ct (TcGAPDH)$ ]. A figura 7 - C mostra as retas geradas para a validação do método, onde podemos observar valores de *slope* (inclinação) de -0,06 para a TcCalmodulina e de 0,1 para TcGAPDH, o que nos mantém dentro dos valores de *slope* desejados para o método do  $\Delta\Delta Ct$  ( $-0,1 < Slope < 0,1$ ) (LIVAK & SCHMITDEN, 2001).



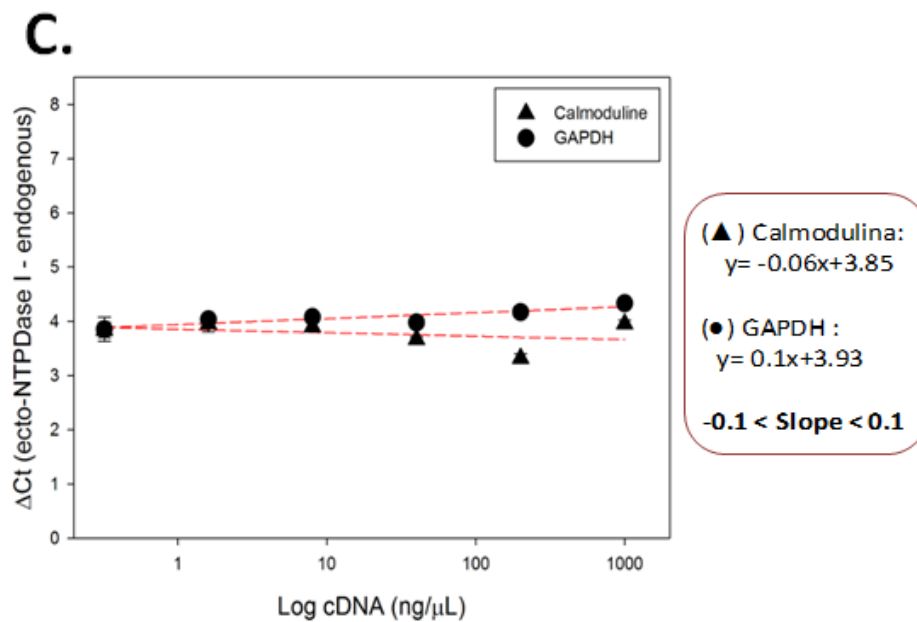
**Figura 6 - Teste dos Primers para TcNTPDase-1 com cepa CL. Brener (*T.cruzi* VI) por PCR Convencional.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando o fragmento de 111 e 112 pb correspondente a TcNTPDase-1 e o fragmento de 330 pb correspondente ao kDNA de *T.cruzi*, amplificado com os iniciadores 121/122 através de PCR convencional. (PM: Padrão de Peso Molecular 100pb; Coluna 2: Controle Negativo “água”; Coluna 3: 0,4 $\mu$ M dos primers TcNTPDase-1 combinado com 2 $\mu$ L de DNA concentrado; Coluna 4: 0,4 $\mu$ M dos primers TcNTPDase-1 combinado com 2 $\mu$ L de DNA 1:1000; Coluna 5: 0,2 $\mu$ M dos primers TcNTPDase-1 combinado com 2 $\mu$ L de DNA concentrado; Coluna 6: 0,2 $\mu$ M dos primers TcNTPDase-1 com 2 $\mu$ L de DNA 1:1000; Coluna 7: 0,4 $\mu$ M dos primers kDNA combinado com 2 $\mu$ L de DNA concentrado; Coluna 8: 0,2 $\mu$ M dos primers kDNA combinado com 2 $\mu$ L de DNA concentrado).

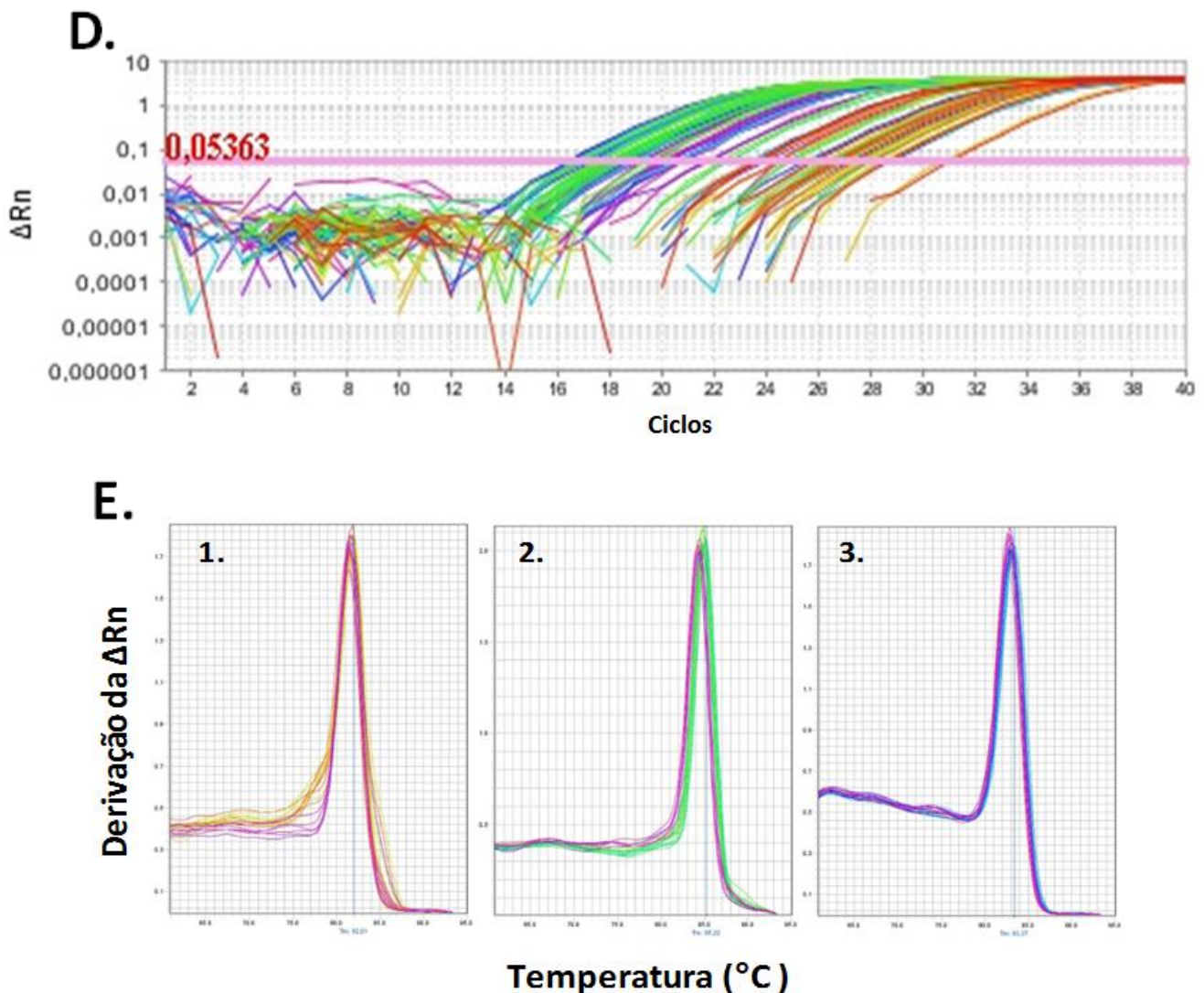




**B.**

Primer NTPDase I (nM)		Alvo DNA de <i>T.cruzi</i>	
Foward	Reverse	CT	CT SD
100	100	33,25	0,07
300	100	32,49	0,25
600	100	32,47	0,09
100	300	31,70	0,35
300	300	30,55	0,13
600	300	30,47	0,22
100	600	31,48	0,05
300	600	29,77	0,16
<b>600</b>	<b>600</b>	<b>29,63</b>	<b>0,04</b>





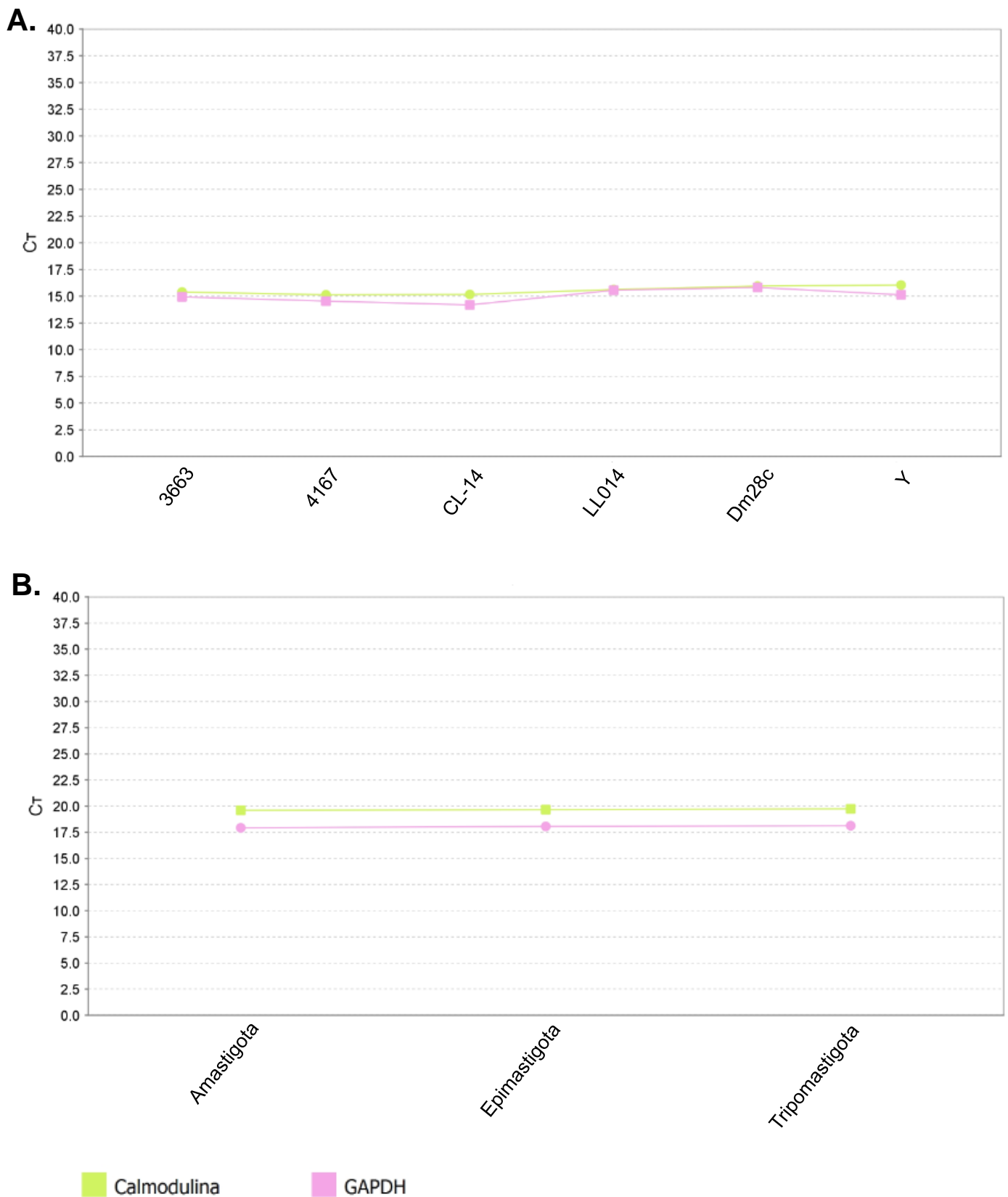
**Figura 7 – Padronização da RT-PCR em Tempo Real para análise da expressão da NTPDase-1 de *T. cruzi*.** **A.** Gradiente de Temperatura de Anelamento. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando a amplificação do iniciador TcNTPDase-1 nas diferentes temperaturas de anelamento testadas (Peso Molecular (PM); 63°C; 61,1°C; 58,4°C; 55,8°C; 53,7°C; 53°C), respectivamente. **B.** Diferentes concentrações dos iniciadores TcNTPDase-1 X CTs. A tabela evidencia os valores de CT para as diferentes concentrações de iniciadores. Em negrito, destaca-se a concentração 600nM/600nM de iniciadores selecionados. **C.** Validação dos ensaios de PCR em Tempo Real (Quantificação relativa) pelo método do  $\Delta\Delta Ct$ , para os alvos TcNTPDase-1, TcCalmodulina e TcGAPDH. **D.** Curva de Amplificação para análise da Expressão do Gene da TcNTPDase-1 nas diferentes cepas do *T. cruzi*. Curva de Amplificação correspondente as amostras de cDNA sintetizadas a partir do mRNA das diferentes subpopulações e formas evolutivas do *T. cruzi*. Teste realizado utilizando o fluoróforo SYBR Green. **E.** Curvas de Dissociação dos ensaios de PCR em Tempo Real. 1: Alvo TcNTPDase-1. 2: Alvo TcCalmodulina. 3: Alvo TcGAPDH.

### **4.3 Avaliação dos Genes de Expressão Constitutiva**

#### **4.3.1 Expressão dos genes Calmodulina e GAPDH para as diferentes Cepas/Clones e formas evolutivas do *T.cruzi***

No sentido de avaliar se os genes escolhidos, Calmodulina e GAPDH, seriam bons alvos para normalização dos nossos ensaios de RT-PCR em Tempo Real, apresentando uma expressão constitutiva entre as diferentes cepas/clones e formas evolutivas do *T.cruzi* utilizadas neste projeto, realizamos um gráfico baseado nos valores de CT obtidos por estes alvos, para cada uma das amostras testadas.

Observamos que ambos os genes testados foram bons candidatos a controle endógeno, pois apresentaram valores de *score* (0,379 e 0,549), respectivamente, bem próximos de zero, o que indica que não houve mudanças significativas nos valores de Ct entre as amostras testadas. (Gráfico 1 - A e B).



**Gráfico 1 – Avaliação dos genes normalizadores para os ensaios de RT-PCR. A.** Análise dos genes endógenos, Calmodulina e GAPDH, para as diferentes cepas do *T.cruzi* (Score:0,379). **B.** Análise dos genes endógenos, Calmodulina e GAPDH, para as diferentes formas evolutivas do *T.cruzi* (Score:0,549).

## 4.4 Análise da Expressão do Gene TcNTPDase-1 por RT-PCR em Tempo Real

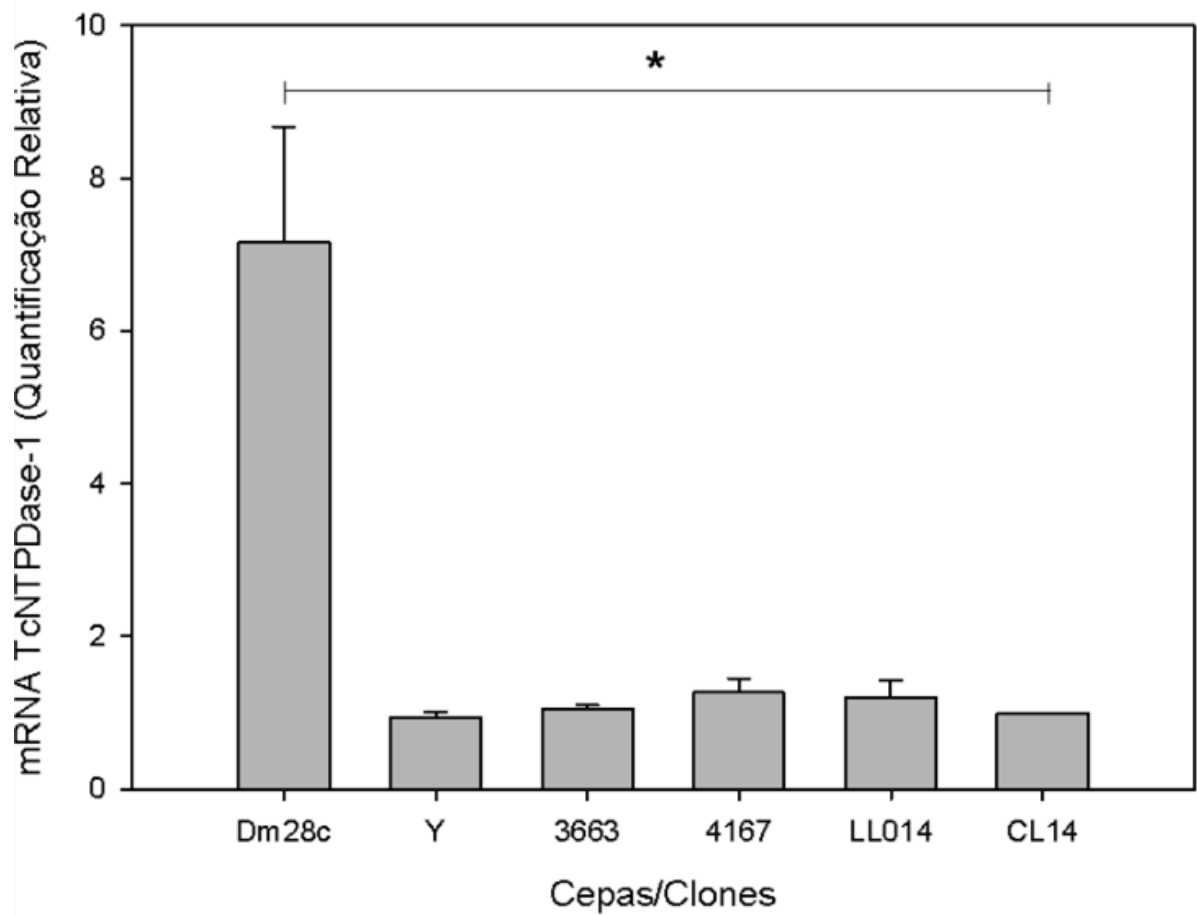
### 4.4.1 Expressão da TcNTPDase-1 nas diferentes cepas/clones de *T.cruzi*

Para avaliar a expressão do gene da TcNTPDase-1 entre os diferentes isolados de *T.cruzi*, nós selecionamos cepas ou clones isolados de mamíferos ou hospedeiros invertebrados, pertencentes às DTUs de I – VI (Tabela 3). Os cDNAs sintetizados a partir das amostras de RNA das diferentes cepas (Y, 3663 e 4167) e clones (Dm28c, LL014 e CL-14) do *T.cruzi* foram amplificados por PCR em Tempo Real. A expressão gênica da TcNTPDase-1 foi calculada em relação ao clone avirulento CL-14 (TcVI), um clone isolado da cepa CL (SOARES *et al.*, 2003; ATAYDE *et al.*, 2004), que foi utilizado como calibrador.

De acordo com o Gráfico 2, observamos que diferenças significativas na expressão do gene da TcNTPDase-1 foram encontradas entre as diferentes subpopulações do *T.cruzi*. Observamos que as cepas/clone 3663, 4167 e LL014 apresentavam os mesmos níveis de expressão do gene da TcNTPDase-1 que o clone CL-14 (TcVI). Por outro lado, o clone Dm28c (TcI) expressou  $7,2 \pm 1,5$  vezes mais o gene desta enzima, quando comparado ao clone CL-14.

Tabela 3 – Diferentes cepas/clones do *T.cruzi* e suas respectivas DTUs (Unidades Discretas de Tipagem).

<i>Cepas/Clones</i>	<i>DTUs</i>	<i>Cidade/ País</i>	<i>Origem</i>
<b>Dm28c</b>	<i>T.cruzi</i> I	Carabobo, Venezuela	<i>Didelphis marsupialis</i>
<b>Y</b>	<i>T.cruzi</i> II	São Paulo, Brasil	<i>Homo sapiens</i>
<b>3663</b>	<i>T.cruzi</i> III	Amazonas, Brasil	<i>Panstrongylus geniculatus</i>
<b>4167</b>	<i>T.cruzi</i> IV	Amazonas, Brasil	<i>Rhodnius brethesi</i>
<b>LL014</b>	<i>T.cruzi</i> V	Chaco, Argentina	<i>Triatoma infestans</i>
<b>CL-14</b>	<i>T.cruzi</i> VI	Rio Grande do Sul, Brasil	<i>Triatoma infestans</i>



**Gráfico 2 – Análise da Expressão da TcNTPDase-1 nas formas epimastigotas dos diferentes isolados de *T. cruzi*.** A quantificação relativa pelo método do  $\Delta\Delta C_t$  foi realizada utilizando o clone CL-14, avirulento, como calibrador. \* $p < 0,05$ .

#### **4.4.2 Sequenciamento dos produtos de PCR da TcNTPDase-1 obtido a partir das diferentes subpopulações do *T.cruzi***

Para avaliar se uma possível existência de polimorfismos entre as diferentes cepas e clones estariam afetando a quantificação dos níveis de mRNA, realizamos o sequenciamento dos produtos de PCR correspondentes ao alvo TcNTPDase-1. Para isso, foi feita uma PCR convencional com o cDNA das diferentes subpopulações do *T.cruzi* (Dm28c; Y; 3663; 4167; LL014; CL-14). Os produtos da PCR para TcNTPDase-1 foram purificados e as amostras foram enviadas para a plataforma de sequenciamento de DNA (PDTIS/Fiocruz).

De acordo com a Figura 8, podemos observar que o alinhamento do DNA entre as diferentes cepas/clones do *T.cruzi* indicou uma identidade de 98,2% entre elas – devido a presença de 2 polimorfismos. Isto significa que a diferença entre os níveis de expressão gênica observada para as amostras indica, de fato, a uma variação na quantidade de mRNA correspondente ao gene TcNTPDase-1, entre elas.



```

1 50
Dm28c GCGGAACCGCAACACCCTCATGCTGCAGTCCGTCGAGGAGTGCAAGAAGG
Y GCGGAACCGCAACACCCTCATGCTGCAGTCCGTCGAGGAGTGCAAGAAGG
3663 GCGGAACCGCAACACCCTCATGCTGCAGTCCGTCGAGGAGTGCAAGAAGG
4167 GCGGAACCGCAACACCCTCATGCTGCAGTCCGTCGAGGAGTGCAAGAAGG
LL014 GCGGAACCGCAACACCCTCATGCTGCAGTCCGTCGAGGAGTGCAAGAAGG
Cl_14 GCGGAACCGCAACACCCTCATGCTGCAGTCCGTCGAGGAGTGCAAGAAGG
*****

51 100
Dm28c AGTTGGAGCTGCTGAAAGAAAACGGTCGTGGCGCGGTGACGTTGGCGCTT
Y AGTTGGAGCTGCTGAAAGAAAACGGTCGTGGCGCGGTGACGTTGGCGCTT
3663 AGTTGGAGCTGCTGAAAGAAAACGGTCGTGGCGCGGTGACTTTGGCGCTT
4167 AGTTGGAGCTGCTGAAAGAAAACGGTCGTGGCGCGGTGACGTTGGCGCTT
LL014 AGTTGGAGCTGCTGAAAGAAAACGGTCGTGGCGCGGTGACGTTGGCGCTT
Cl_14 AGTTGGAGCTGCTGAAAGAAAACGGTCGTGGCGCGGTGACTTTGGCGCTT
*****

101 111
Dm28c CAGCTCGACCG
Y CAGCTCGACCG
3663 CAGCTCGACCG
4167 CAGCTCGACCA
LL014 CAGCTCGACCG
Cl_14 CAGCTCGACCG
*****

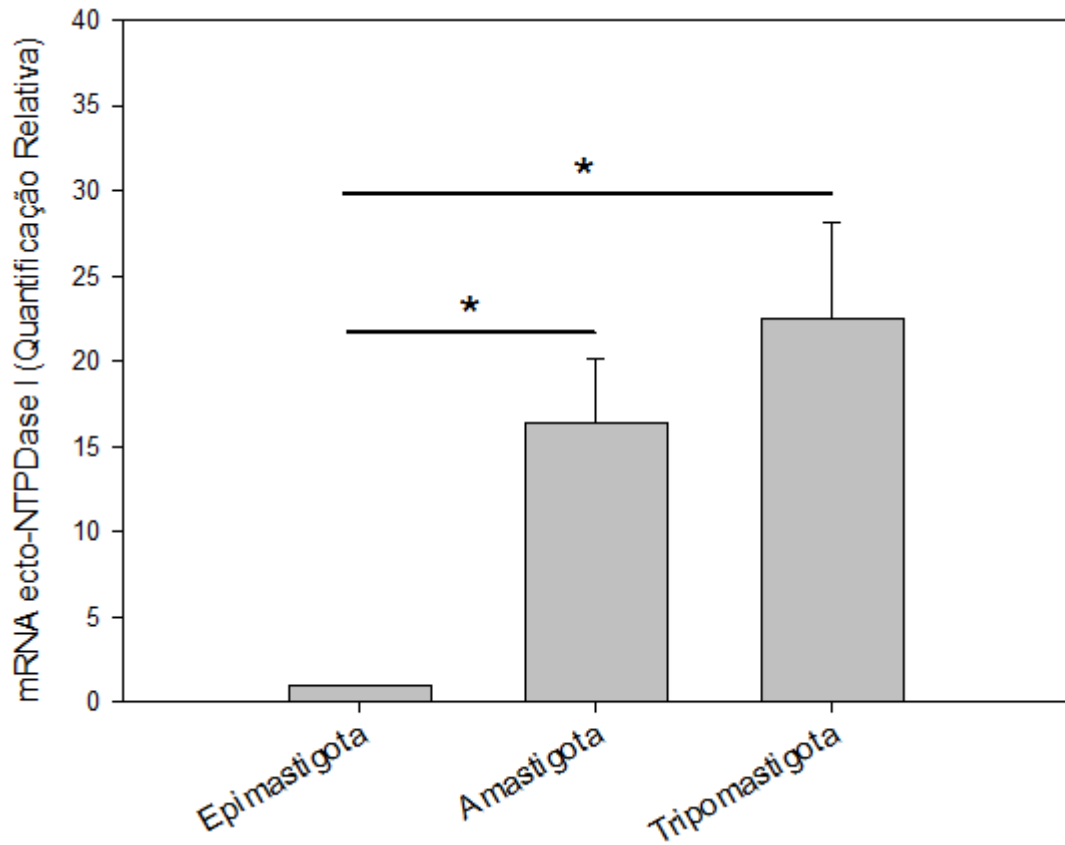
```

**Figura 8 – Alinhamento das seqüências de DNA proveniente dos produtos da PCR para TcNTPDase-1. Os asteriscos indicam identidade entre os nucleotídeos.**

#### 4.4.3 Expressão da TcNTPDase-1 nas diferentes formas evolutivas do *T.cruzi*

Para avaliar a expressão da TcNTPDase-1 em formas infectantes e não infectantes do *T.cruzi*, foram realizadas infecções *in vitro* de células VERO, utilizando tripomastigotas sanguíneos (cepa Y), para obtenção das diferentes formas evolutivas do parasita (tripomastigota e amastigota). Os cDNAs das diferentes formas evolutivas foram então amplificados por PCR em Tempo Real, como descrito na metodologia, e os níveis de mRNA da TcNTPDase-1 foram estimados e comparados entre as diferentes formas evolutivas.

Observamos que as formas tripomastigota de cultura e amastigota apresentaram, respectivamente, uma expressão de  $22,5 \pm 5,6$  e  $16,3 \pm 3,8$  vezes maior do gene desta enzima quando comparada com a forma não-infectante, epimastigotas (Gráfico 3). Assim, observamos que a expressão gênica da TcNTPDase-1 é modulada positivamente em formas infectantes do parasito.



**Gráfico 3 – Análise da Expressão da TcNTPDase-1 nas formas infectantes e não-infecantes de *T. cruzi*, cepa Y (n=3). A. Níveis de mRNA da TcNTPDase-1 em epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas estimados por RT-PCR. A quantificação relativa pelo método do  $\Delta\Delta C_t$  foi realizada utilizando a forma epimastigota como calibrador. \* $p < 0.05$**

#### 4.4.4 Expressão da TcNTPDase-1 durante a Curva de Crescimento de epimastigotas de *T.cruzi* em diferentes temperaturas

A fim de avaliar a expressão da TcNTPDase-1 durante todas as fases do cultivo celular das formas epimastigotas e se as diferenças de temperatura de cultivo, que mimetizam as temperaturas encontradas nos hospedeiros invertebrado e vertebrado, poderiam influenciar na expressão deste gene, epimastigotas da cepa Y foram cultivadas durante 7 dias a uma temperatura de 28°C e 37°C (Gráfico 4 – A). Os cDNAs foram amplificados por PCR em Tempo Real, como descrito na metodologia e, os níveis de mRNA das diferentes condições foram estimados e comparados.

Observamos um pequeno aumento, porém significativo ( $p < 0,05$ ), nos níveis de mRNA da TcNTPDase-1 no sexto e no sétimo dia de cultivo a 28°C ( $3,7 \pm 1,1$  e  $4,4 \pm 0,8$  vezes maior que no primeiro dia, respectivamente). Por outro lado, observamos que os epimastigotas cultivados a 37°C, apresentavam uma expressão do gene desta enzima  $17,7 \pm 3,1$  vezes maior, no sétimo dia de cultivo, quando comparado ao primeiro dia do inóculo (Gráfico 4 – B). No entanto, apesar do aumento da expressão ter sido maior a 37°C, o crescimento celular foi menor (Gráfico 4 – A).

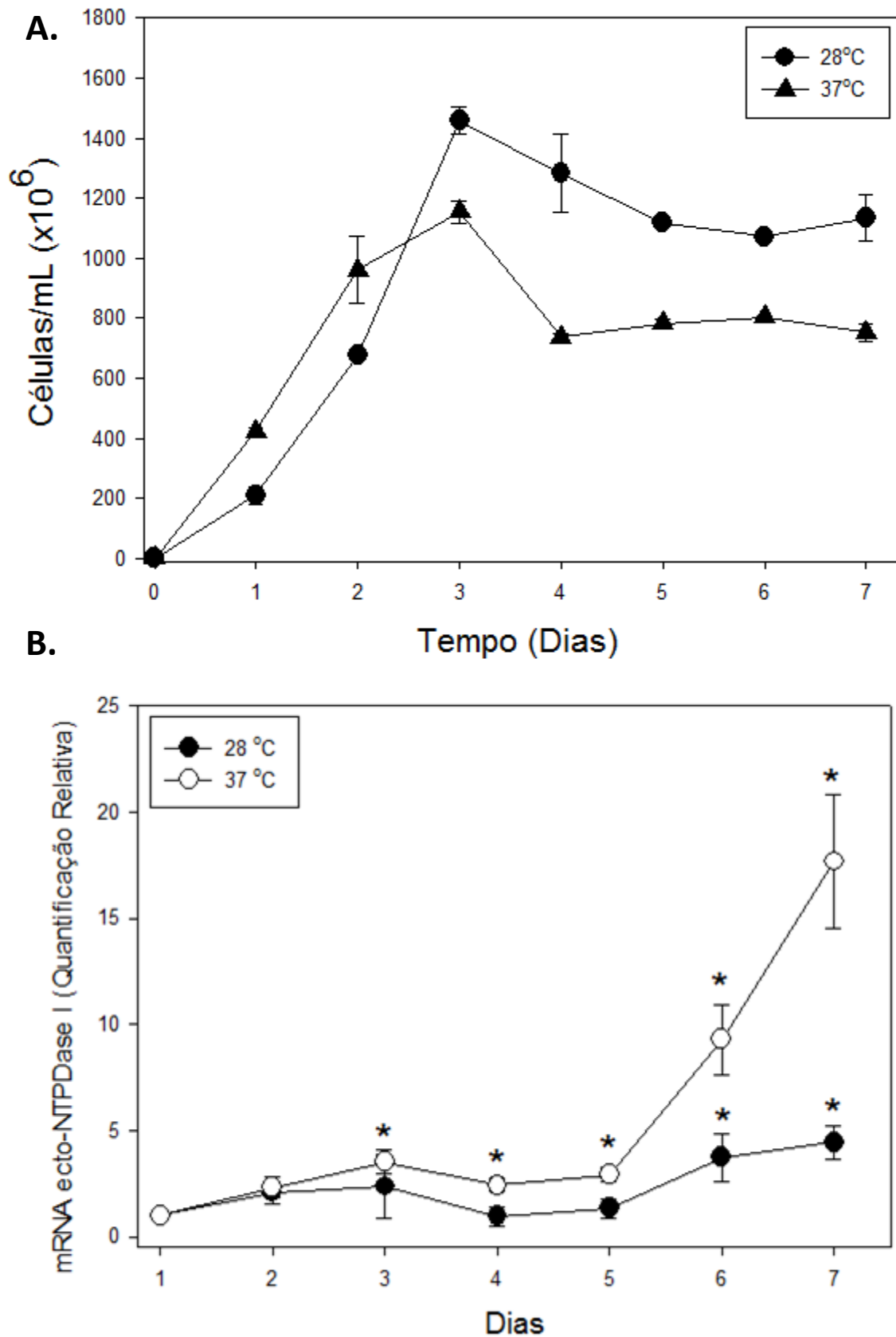


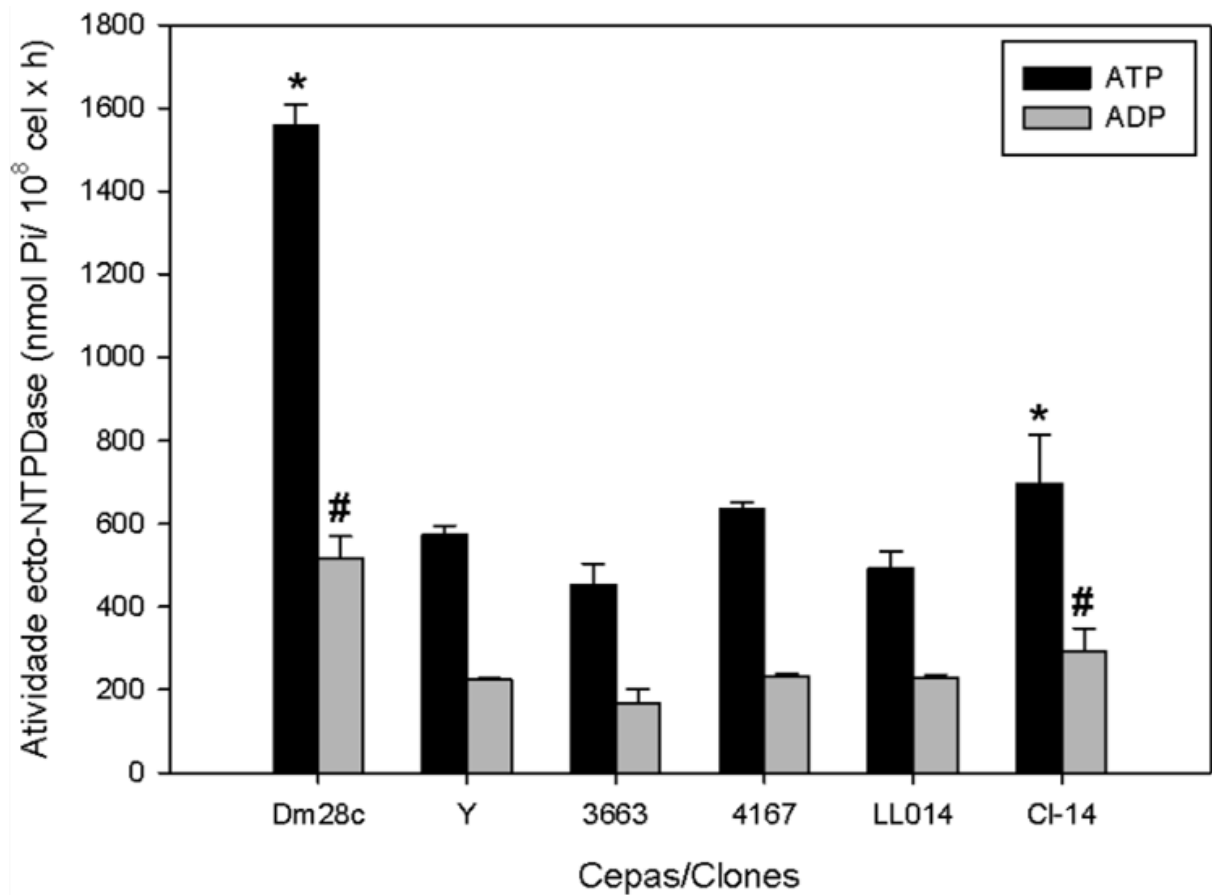
Gráfico 4 – Expressão do gene TcNTPDase-1 durante o cultivo *in vitro* de epimastigotas e indução de choque-térmico (n=3). A. Curvas de crescimento de epimastigotas de *T.cruzi* em meio BHI, em diferentes temperaturas 28°C (●) e 37°C (▲). B. Níveis de mRNA durante a curva de crescimento de *T.cruzi*. A Quantificação Relativa pelo método do  $\Delta\Delta Ct$  foi realizada utilizando epimastigotas (cepa Y) do primeiro dia de cultivo como calibrador. 28°C (●) e 37°C (○). \*p<0.001

## **4.5 Avaliação da atividades ecto-ATPásica e ecto-ADPásica em *T.cruzi***

### **4.5.1 Atividade ecto-ATPásica e ecto-ADPásica nas cepas/clones de *T.cruzi***

A fim de avaliar se as diferenças observadas nos níveis de mRNA da TcNTPDase-1 resultariam em um aumento das atividades ecto-nucleotidásicas (ATPásica e ADPásica) das diferentes subpopulações de *T.cruzi*, foram realizados ensaios de atividade enzimática, utilizando formas epimastigotas das diferentes cepas e clones. As medidas de atividade ecto-nucleotidásica foram realizadas com células vivas, cuja viabilidade foi avaliada antes e depois dos experimentos, utilizando o corante azul de trypan.

Observamos que similar aos níveis de mRNA, as atividades ecto-ATPásicas e ecto-ADPásicas se mostraram, respectivamente, 2,3 e 1,8 vezes maior no clone Dm28c, quando comparado ao clone CL-14, avirulento (Gráfico 5), indicando que o aumento da expressão gênica da TcNTPDase-1 também se traduz em um aumento da quantidade de enzima.



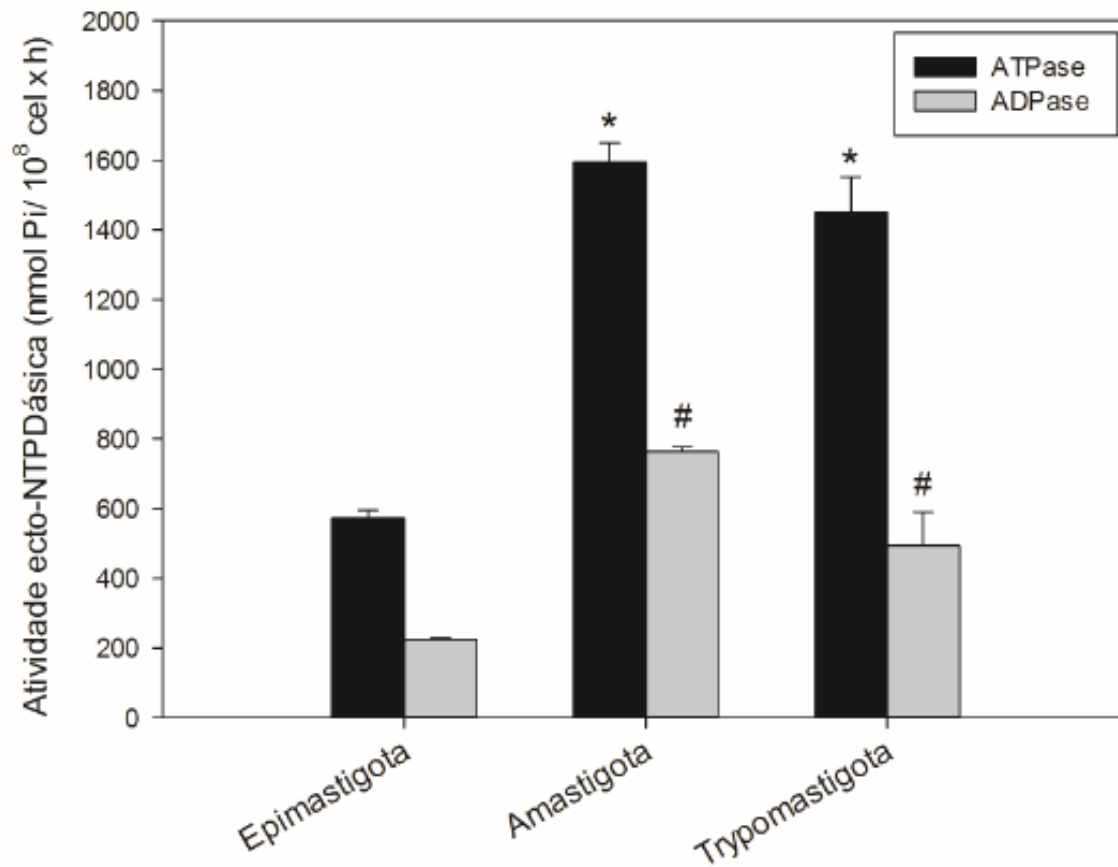
**Gráfico 5 – Atividades ecto-ATPase e ecto-ADPase entre as diferentes cepas/clones do *T. cruzi*.** As atividades ecto-nucleotidases foram estimadas nas formas epimastigotas do *T. cruzi*, utilizando 5mM de ATP ou ADP como substrato. \*, # p<0,05 (em relação ao clone CL-14).

#### **4.5.2 Atividade ecto-ATPásica e ecto-ADPásica nas diferentes formas evolutivas de *T.cruzi***

Para avaliar se as diferenças no nível de mRNA, observadas em nossos ensaios de expressão gênica, para as diferentes formas evolutivas (epimastigota, tripomastigotas e amastigota), resultariam também em um aumento das atividades ecto-ATPásicas e ecto-ADPásicas, foram realizados ensaios de atividade enzimática com as diferentes formas evolutivas de *T.cruzi*; tripomastigota e amastigota, obtidas *in vitro* e, epimastigotas de cultura. Mais uma vez, as medidas de atividade ecto-nucleotidásica foram realizadas com células vivas, cuja viabilidade foi avaliada antes e depois dos experimentos, utilizando o corante azul de tripan.

Foi observado um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) das atividades ecto-ATPásica e ecto-ADPásicas nas formas tripomastigotas (2,9 e 3,0) e amastigotas (2,8 e 3,4) vezes, respectivamente, quando comparadas a forma epimastigota, não-infectante (Gráfico 6), indicando que o aumento da expressão gênica da TcNTPDase-1 possa contribuir para um aumento da atividade da enzima entre as formas evolutivas de *T.cruzi*.





**Gráfico 6 – Atividades ecto-ATPase e ecto-ADPase entre as diferentes formas evolutivas de *T. cruzi*.** As atividades ecto-nucleotidasas foram estimadas nas formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas, utilizando 5mM de ATP ou ADP como substrato. \*, #  $p < 0,05$  (em relação a forma epimastigota).

#### 4.6 Artigo Submetido à Publicação

Os resultados aqui apresentados nos geraram um manuscrito, intitulado “*Nucleoside triphosphatediphosphohydrolase1 (TcNTPDase-1) gene expression is increased during heat shock and on infective forms of Trypanosoma cruzi.*”, o qual foi submetido à revista *Parasites & Vectors* e aceito com modificações. Estas já foram realizadas e enviadas novamente aos *referees*. No presente momento estamos aguardando resposta.

1 **Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase1 (TcNTPDase-1) gene**  
2 **expression is increased during heat shock and on infective forms of**  
3 ***Trypanosoma cruzi*.**

4 Natália Lins Silva-Gomes<sup>1</sup>; Vitor Ennes-Vidal<sup>1</sup>; Julliane de Castro Ferreira Carolo<sup>1</sup>,  
5 Marcos Batista Meuser<sup>2</sup>, Maria Nazaré Soeiro<sup>2</sup>, Rubem Menna-Barreto<sup>2</sup> and Otacilio  
6 Cruz Moreira<sup>1,\*</sup>.

7 <sup>1</sup>Laboratorio de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz/  
8 FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

9 <sup>2</sup>Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ, Rio de Janeiro,  
10 Brazil

11 \*Corresponding author: Av. Brasil, 4365. Pavilhão Leônidas Deane, sala 209.  
12 Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil. CEP 21941360, Tel: (+55) 21 3865 8153. E-mail:  
13 otacilio@ioc.fiocruz.br

14 **e-mails:**

15 Natália Lins da Silva Gomes: natalia.lins@ioc.fiocruz.br

16 Vitor Ennes-Vidal: vidal@ioc.fiocruz.br

17 Julliane de Castro Ferreira Carolo: julliane.castro@ioc.fiocruz.br

18 Marcos Batista Meuser: meusermb@ioc.fiocruz.br

19 Maria Nazaré Soeiro: soeiro@ioc.fiocruz.br

20 Rubem Menna-Barreto: rubemb@ioc.fiocruz.br

21 Otacilio Cruz Moreira: otacilio@ioc.fiocruz.br

22

23 **Abstract:**

24 **Background**

25 Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolases (Ecto-NTPDases) are  
26 enzymes that hydrolyze tri- and/or di-phosphate nucleotides. Evidences point to their  
27 participation in *Trypanosoma cruzi* virulence and infectivity. In this work, we evaluate  
28 TcNTPDase-1 gene expression in comparison with ecto-NTPDase activity, in order to  
29 study the role of TcNTPDase-1 in parasite virulence, infectivity and adaptation to heat  
30 shock.

31 **Findings**

32 Comparison between distinct *T. cruzi* isolates (Y, 3663 and 4167 strains, and  
33 Dm28c, LL014 and CL-14 clones) showed that TcNTPDase-1 expression was  $7.2 \pm 1.5$   
34 times higher in the Dm28c than the CL-14 avirulent clone. A remarkable expression  
35 increase was also observed in the trypomastigote and amastigote forms ( $22.5 \pm 5.6$  and  
36  $16.3 \pm 3.8$  times higher, respectively), indicating that TcNTPDase-1 is overexpressed in  
37 *T. cruzi* infective forms. Moreover, heat shock and long-term cultivation also induced a  
38 significant increment on TcNTPDase-1 expression.

39 **Conclusions**

40 Our results suggest that TcNTPDase-1 plays an important role on *T. cruzi*  
41 infectivity and adaptation to stress conditions, such as long-term cultivation and heat  
42 shock.

43

44 **Key-words:** *T. cruzi*, TcNTPDase-1, gene expression, infectivity, virulence

45

46

47

48

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

## Findings:

### Background

Chagas disease is a neglected illness caused by the parasite protozoan *Trypanosoma cruzi*, which affects 8 million people in endemic areas of Latin America [1]. Its different spectrum and the course of chronic infection may be consequences of complex interactions between genetic variability of *T. cruzi* subpopulations (classified into TcI to TcVI) [2], host immunogenetics and eco-epidemiological characteristics [2,3]. Current chemotherapy is based on the drugs nifurtimox and benznidazole, which present a lack of effectiveness on the chronic phase of the disease [4]. In this scenario, the search for new drugs and targets to chemotherapy is pivotal.

Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (Ecto-NTPDases, EC 3.6.1.5) are enzymes that hydrolyze tri- and/or di-phosphate nucleotides [5,6]. Since extracellular ATP is an immune-modulatory molecule that stimulates the secretion of IFN- $\gamma$  and IL-2 [7], it is hypothesized that ecto-ATPase activity in parasites can be important to the evasion mechanism from the host immune defense, although the mechanism is not clearly elucidated [8]. In 2004, a 2,282 bp mRNA encoding a full-length NTPDase was cloned, sequenced [9] and named *T. cruzi* NTPDase-1 (TcNTPDase-1; Genbank: AY540630.1), which presents a single copy gene at the genome. In this work, we have developed a quantitative Real-Time RT-PCR assay to quantify TcNTPDase-1 mRNA levels, using TcGAPDH and TcCalmoduline as housekeeping genes (Fig. S1), aiming to contribute to the knowledge about the role of this NTPDase to *T. cruzi* infectivity and virulence. In this sense, we evaluated the TcNTPDase-1 expression in distinct evolutive forms (epimastigotes and cell culture-derived amastigotes and trypomastigotes) and parasite isolates, as the Cl-14, which is described as an avirulent *T. cruzi* clone, since it is unable to promote infection and to induce immune response in a murine model [10, 11].

During its life cycle, *T. cruzi* undergoes profound adaptations triggered by a wide range of environmental conditions between the vertebrate or invertebrate hosts, such as variations in pH and temperature. The epimastigote and metacyclic trypomastigote forms interact with the triatomine insect vector at 28°C and the amastigote and trypomastigote forms interacts with the mammal vector at 37°C. This heat shock may induce a response from the parasite, promoting the modulation of ecto-ATPase activity [12]. Thus, considering the importance of the ecto-NTPDase activity on the parasite's purine salvage pathway [13] and heat shock adaptation, the expression of TcNTPDase-1 was also analyzed during *T. cruzi* epimastigote cultivation, at different temperatures, to investigate the expression regulation in response to long-term cultivation or induced by heat shock.

### Methods

#### *Parasite cultivation*

The *T. cruzi* Y, 3663, 4167 strains, and Dm28c, LL014 and CL-14 clones were obtained from the *Coleção de Protozoários da Fundação Oswaldo Cruz* (COLPROT-FIOCRUZ). *T. cruzi* laboratory-adapted epimastigotes were cultivated in BHI medium, supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, at 28 °C for 5 days, to reach late-log growth phase.

#### *Production of cultured derived trypomastigotes and amastigotes*

1 The isolation of trypomastigote and amastigote forms was carried out using Vero  
2 cells, as detailed elsewhere [21]. Briefly, cell cultures were infected with mice-derived  
3 bloodstream trypomastigotes, in a 10:1 parasite/host cell ratio. Infected cells were  
4 maintained at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After 5–6 days, the supernatant was  
5 collected, centrifuged at 500 ×g for 5 min, and allowed to stand at 37°C for 30 min for  
6 the migration of trypomastigotes into the supernatant. The amastigotes remained in the  
7 pellet.

#### 8 9 *Ecto-ATPase and ecto-ADPase activity measurements*

10 The extracellular hydrolysis of ATP or ADP by intact parasites was carried out  
11 through the measurement of inorganic phosphate (Pi) released at the supernatant, as  
12 previously described by De Souza *et al.*, 2010 [18]. Briefly, ecto-ATPase and ecto-  
13 ADPase activities were estimated by the incubation of intact cells ( $0.5 \times 10^8$  parasites)  
14 for 1 h at 28 °C, in a reaction medium containing 116mM NaCl, 5.4mM KCl, 5.5mM d-  
15 glucose, 5mM MgCl<sub>2</sub>, and 50mM HEPES-Tris buffer, in the presence of 5 mM ATP or  
16 ADP (Sigma-Aldrich), in a final volume of 0.5 mL. The reaction was started by the  
17 addition of living parasites and terminated by the addition of 1 mL of ice cold HCl  
18 0.2M. The cell suspensions were pelleted and supernatant aliquots were used for  
19 inorganic phosphate (Pi) quantification, through the Fiske & Subbarow colorimetric  
20 method.

#### 21 22 *RNA isolation and cDNA synthesis*

23 Total RNA from *T. cruzi* ( $1 \times 10^8$  cells) was extracted using TRIzol Reagent  
24 (Invitrogen, USA) and treated with DNase I (Sigma-Aldrich, USA), following  
25 manufacturer's instructions. RNA quantity and purity was estimated by  
26 spectrophotometry at 260/280/230 nm. RNA integrity was verified through  
27 electrophoresis on a 1.5% (w/v) agarose gel. All reverse transcriptase reactions were  
28 performed from 3 µg of RNA using a Superscript III First-strand System (Invitrogen,  
29 USA), according to the manufacturer's instructions.

#### 30 31 *Ecto-NTPDase-1 gene expression quantification by Real-Time RT-PCR*

32 Real-time quantitative PCR assays were performed in ABI Prism 7500 fast  
33 sequence detection system using Power SYBR Green PCR mastermix (Applied  
34 Biosystems, USA). The following primers and concentrations were used: *TcNTPDase-I*  
35 *Fw* (600 nmol/L), 5'-GCGGAACCGCAACACCCTCA-3'; *TcNTPDase-I Rv* (600  
36 nmol/L), 5'-CGGTCGAGCTGAAGCGCCAA-3'; *TcCalmoduline Fw* (600 nmol/L),  
37 5'-CCCGACGGAGGCGGAGCTGC-3'; *TcCalmoduline Rv* (600 nmol/L), 5'-  
38 GTCCACGTCGGCCTCGCGGA-3'; *TcGAPDH Fw* (300 nmol/L), 5'-  
39 GTGCGGCTGCTGTCAACAT-3'; and *TcGAPDH Rv* (300 nmol/L), 5'-  
40 AAAGACATGCCCGTCAGCTT- 3'. The conditions for the RT-qPCR were as  
41 follows: 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 62°C  
42 for 1 minute. To monitor the primers specificity, melting curves were performed after  
43 each experiment, resulting in a single peak. Reactions were performed in duplicates  
44 using 2 µL of cDNA template, in a total volume of 20 µL. The relative quantitative  
45 measurement of target gene levels was performed using the  $\Delta\Delta C_t$  method [14]. As  
46 endogenous housekeeping control genes, *T. cruzi* Calmoduline and GAPDH genes were  
47 used. PCR assays were tripled, and data were pooled.

#### 48 49 *Statistical analysis*

1 All experiments were performed at least in biological triplicates and  
2 experimental duplicates. Data are expressed as arithmetic mean  $\pm$  Standard Deviation.  
3 Student's t test or Mann-Whitney Rank-Sum test were adopted to analyze the statistical  
4 significance of the apparent differences. All statistical tests were performed with  
5 SigmaPlot for Windows Version 12 (Systat Software). Differences were considered  
6 statistically significant when  $p < 0.05$ .

## 7 8 **Results and discussion**

9 There are several evidences that NTPDases are related to virulence and  
10 infectivity in protozoan parasites [15-21]. Nevertheless, most of the studies reported  
11 ecto-NTPDase enzymatic activities in intact parasites or plasma membrane fractions.  
12 Taking into account that plasma membranes share distinct ecto-nucleotidase activities,  
13 there is a lack of information regarding the specific contribution of each enzyme on  
14 these processes. Recently, Mariotini-Moura *et al.* (2013) [22] performed heterologous  
15 expression, purification and molecular characterization of TcNTPDase-1. By using  
16 specific polyclonal antibodies, they confirmed the presence of TcNTPDase-1 not only  
17 on the surface of *T. cruzi*, but also in the kinetoplast, nucleus, intracellular vesicles,  
18 flagellum and flagellum insertion region. The two latter localizations suggest that the  
19 enzyme may have a role on nutrient acquisition. It was also shown that the treatment of  
20 the parasite with anti-TcNTPDase-1 antibody decreases adhesion of *T. cruzi* to Vero  
21 cells, corroborating the importance of this enzyme to parasite-vertebrate host  
22 interaction.

23 Therefore, we used a gene expression quantification approach to evaluate the  
24 specific contribution of TcNTPDase-1 to parasite virulence, infectivity and adaptation  
25 to heat shock. To evaluate gene expression of TcNTPDase-1 between distinct *T. cruzi*  
26 isolates, we selected representative strains or clones isolated from mammalian or  
27 invertebrate hosts, belonging from TcI to TcVI (Table 1). The TcNTPDase-1 mRNA  
28 levels were quantified in comparison to avirulent Cl-14 *T. cruzi* clone (TcVI). The  
29 expression of TcNTPDase-1 was  $7.2 \pm 1.5$  times higher for the Dm28c clone (Tc I), than  
30 all other isolates, which showed similar low expression levels, like the avirulent Cl-14  
31 clone (Fig. 1A). To investigate if the increase in TcNTPDase-1 mRNA levels would  
32 result in higher ecto-nucleotidase activities, the ecto-ATPase and ecto-ADPase activities  
33 were estimated in intact epimastigotes (Figure 1B). Similar to mRNA levels, the ecto-  
34 ATPase and ecto-ADPase activities, respectively, were about 2.3 and 1.8 times higher  
35 for the Dm28c clone than the avirulent Cl-14 clone. The significant increase in both  
36 mRNA and ecto-NTPDase activity levels suggests the positive modulation of  
37 TcNTPDase-1 expression in epimastigotes from Dm28c clone occurred both at gene  
38 and protein levels. To exclude the possibility that the existence of polymorphisms at the  
39 TcNTPDase-1 gene could affect the gene expression analysis between these samples,  
40 PCR products for the TcNTPDase-1 were sequenced. The DNA alignment indicated a  
41 higher identity (98.2%) between them (Fig. 1C). Comparison between epimastigotes  
42 forms of the distinct strain/clones suggested that the higher Dm28c TcNTPDase-1  
43 expression could be associated to the parasite interaction with the invertebrate host, but  
44 other experiments should be performed for better evaluation. In fact, Dm28c is a *T.*  
45 *cruzi* clone with an elevated rate of colonization of the *Rhodnius prolixus* intestine,  
46 although it presents low virulence to the vertebrate host.

47 To investigate TcNTPDase-1 expression in infective parasite forms, we obtained  
48 cell-derived trypomastigotes and amastigotes, through the infection of Vero cells with  
49 bloodstream-derived trypomastigotes (Y strain). TcNTPDase-1 mRNA levels (Fig. 2A)  
50 and ecto-NTPDase activities (Fig. 2B) were estimated and compared between evolutive

1 forms. A remarkable increase in the TcNTPDase-1 mRNA levels related to  
2 trypomastigote and amastigote forms was observed ( $22.5\pm 5.6$  and  $16.3\pm 3.8$  times higher  
3 than epimastigotes, respectively). The ecto-ATPase and ecto-ADPase activities were  
4 also significantly higher in trypomastigotes and amastigotes. The ectoATPase was 2.9  
5 and 2.8 times higher and the ecto-ADPase was 3.0 and 3.4 times higher in  
6 tripomastigotes and amastigotes, respectively, when compared to the non-infective  
7 epimastigote form. Accordingly, we observed a simultaneous increase in mRNA and  
8 ecto-NTPDase activities in infectant forms of *T. cruzi*, suggesting the positive  
9 modulation of TcNTPDase-1 expression both at gene and protein levels. It corroborates  
10 with previous data obtained by Meyer-Fernandes *et al.*, 2004 [20], which described  
11 increased  $Mg^{2+}$ -dependent ecto-ATPase activities in trypomastigote and amastigote  
12 forms. The positive modulation of TcNTPDase-1 expression corroborates with the  
13 hypothesis that this enzyme plays an important role on *T. cruzi* infectivity.

14 During its life cycle, *T. cruzi* is exposed to different environments and  
15 temperatures between insect and mammalian hosts (28 and 37 °C, respectively). Parasite  
16 exposition to 37 °C induces an overexpression of various proteins, including heat shock  
17 proteins, which may be important to parasite invasion and proliferation [23, 24].  
18 Therefore, in order to evaluate the TcNTPDase-1 expression levels during cellular  
19 growth and in response to heat shock, epimastigotes (Y strain) were cultivated for 7 days  
20 at 28°C and 37 °C (Fig. 3A). At 28°C, we observed a slight but significant increase at  
21 TcNTPDase-1 mRNA level by the sixth and seventh days after the inoculum ( $3.7\pm 1.1$   
22 and  $4.4\pm 0.8$  times higher than day 1, respectively). In contrast, at 37°C, the expression  
23 was  $17.7\pm 3.1$  times higher, at the seventh day after the inoculum, suggesting that heat  
24 shock and long-term cultivation could increase TcNTPDase-1 gene expression (Fig.  
25 3B). Similar data were observed for the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis* by  
26 Frasson *et al.* (2012) [25]. These authors described the higher NTPDase expression  
27 levels in parasites cultivated in a limited serum supplementation condition, particularly  
28 for the clinical isolate. In conjunction, our results suggest the role of TcNTPDase-1 on  
29 *T. cruzi* infectivity and adjustment to stress conditions such as nutrients starvation and  
30 heat shock. Due to its importance for *T. cruzi*, TcNTPDase-1 should be investigated in  
31 future studies as a candidate target for Chagas Disease chemotherapy.

### 32 33 **Competing interests:**

34 The authors declare that they have no competing interests.

### 35 36 **Authors' contributions:**

37 Conceived the experiments: NLSG, VEV, JCF and OCM. Performed the  
38 experiments: NLSG, VEV, JCF, MBM. Analyzed the data: NLSG, VEV, JCF, MNS,  
39 RMB, OCM. RMB, MNS and OCM participated in study design and coordination and  
40 helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### 41 42 **Acknowledgments:**

43 The authors thank Dr. Luciana P. Rangel for critical reading of the manuscript  
44 and English revision, as well as the Program for Technological Development in Tools  
45 for Health (PDTIS-Fiocruz) for the facilities on the Real Time PCR and DNA  
46 sequencing platforms and *Coleção de Protozoários da Fundação Oswaldo Cruz*  
47 (*Colprot*), for having provided the *T. cruzi* isolates used in this study. This work was  
48 supported in by a grant from FIOCRUZ and CNPq (PAPES VI – Process 407688/2012-  
49 9).

- 1  
2 **References:**  
3 1. Rassi, AJr, Rassi, A, Rezende, JM: **American Trypanosomiasis (Chagas Disease).**  
4 *Infect Dis Clin N Am* 2012, **26**: 275–291.  
5  
6 2. Zingales, B, Andrade, SG, Briones, MRS, Campbell, DA, Chiari, E, Fernandes, O,  
7 Guhl, F, Lages-Silva, E, Macedo, AM, Machado, CR, Miles, MA, Romanha, AJ, Sturm,  
8 NR, Tibayrenc, M, Schijman, AG: **A new consensus for *Trypanosoma cruzi***  
9 **intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI.**  
10 *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009, **104**: 1051–1054.  
11  
12 3. Campbell, DA, Westenberger, SJ, Sturm, NR: **The determinants of Chagas disease:**  
13 **connecting parasite and host genetics.** *Current Molecular Medicine* 2004, **4**: 549–  
14 562.  
15  
16 4. Bern, C: **Antitrypanosomal therapy for chronic chagas’ disease.** *N Eng J Med*  
17 2011, **364**: 2527–34.  
18  
19 5. Plesner, L: **Ecto-ATPases: identities and functions.** *International Review of*  
20 *Cytology* 1995, **158**: 141–214.  
21  
22 6. Zimmermann, H: **Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures,**  
23 **catalytic properties and a search for function.** *Trends in Pharmacological Science*  
24 1999, **20**: 231–236.  
25  
26 7. Langston, HP, Ke, Y, Gewirtz, AT, Dombrowski, KE, Kapp, JA: **Secretion of IL-2**  
27 **and IFN-gamma, but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular**  
28 **ATP.** *J Immunol* 2003, **170**: 2962–2970.  
29  
30 8. Sansom, FM, Robson, SC, Hartland, EL: **Possible effects of microbial ecto-**  
31 **nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions.**  
32 *Microbiol Mol Biol Rev* 2008, **72**: 765–781.  
33  
34 9. Fietto, JLR, DeMarco, R, Nascimento, IP, Castro, IM, Carvalho, TMU, De Souza, W,  
35 Bahia, MT, Alves, MJM, Verjovski-Almeida, S: **Characterization and**  
36 **immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*.**  
37 *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004, **316**: 454–460.  
38  
39 10. Lima, MT, Jansen, AM, Rondinelli, E, Gattass, CR: ***Trypanosoma cruzi*:**  
40 **properties of a clone isolated from CL strain.** *Parasitol Res* 1991, **77**: 77–81.  
41  
42 11. Soares, MB, Gonçalves, R, Pyrrho, AS, Costa, DA, Paiva, CN, Gattass, CR:  
43 **Balanced cytokine-producing pattern in mice immunized with an avirulent**  
44 ***Trypanosoma cruzi*.** *An Acad Bras Cienc* 2003, **75(2)**: 167–72.  
45  
46 12. Giarola, NL, de Almeida-Amaral, EE, Collopy-Júnior, I, Fonseca-de-Souza, AL,  
47 Majerowicz, D, Paes, LS, Gondim, KC, Meyer-Fernandes, JR: ***Trypanosoma cruzi*:**  
48 **effects of heat shock on ecto-ATPase activity.** *Exp Parasito*. 2013, **133(4)**: 434-41.  
49



- 1 13. Cohn, CS, Gottlieb, M: **The acquisition of purines by trypanosomatids.** *Parasitol*  
2 *Today* 1997, **13**: 231–235.
- 3
- 4 14. Livak, KJ, Schmittgen, TD: **Analysis of relative gene expression data using real-**  
5 **time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25(4)**:  
6 402–8.
- 7
- 8 15. Nakaar, V, Beckers, CJ, Polotsky, V, Joiner, KA: **Basis for substrate specificity of**  
9 **the *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase.** *Mol Biochem Parasitol*  
10 1998, **97**: 209–220.
- 11
- 12 16. De Jesus, JB, De Sá Pinheiro, AA, Lopes, AH, Meyer- Fernandes, JR: **An**  
13 **ectonucleotide ATP-diphosphohydrolase activity in *Trichomonas vaginalis***  
14 **stimulated by galactose and its possible role in virulence.** *Zeitschrift der*  
15 *Naturforschung C* 2002, **57**: 890–896.
- 16
- 17 17. Berrêdo-Pinho, M, Peres-Sampaio, CE, Chrispim, PP, Belmont-Firpo, R, Lemos,  
18 AP, Martiny, A, Vannier-Santos, MA, Meyer-Fernandes, JR: **A Mg-dependent ecto-**  
19 **ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition**  
20 **and virulence.** *Arch Biochem Biophys* 2001, **391**: 16–24.
- 21
- 22 18. De Souza, MC, De Assis, EA, Gomes, RS, Marques da Silva, EA, Melo, MN,  
23 Fietto, JL, Afonso, LC: **The influence of ecto-nucleotidases on *Leishmania***  
24 ***amazonensis* infection and immune response in C57B/6 mice.** *Acta Trop* 2010, **115**:  
25 262–269.
- 26
- 27 19. Ennes-Vidal, V, Castro, RO, Britto, C, Barrabin, H, D'Avila-Levy, CM, Moreira,  
28 OC: **CrATP interferes in the promastigote-macrophage interaction in *Leishmania***  
29 ***amazonensis* infection.** *Parasitology* 2011, **138(8)**: 960–8.
- 30
- 31 20. Meyer-Fernandes, JR, Saad-Nehme, J, Peres-Sampaio, CE, Belmont-Firpo, R,  
32 Bisaggio, DFR, Do Couto, LC, De Souza, ALF, Lopes, AHSC, Souto-Padrón, T: **A**  
33 **Mg-dependent ecto-ATPase is increased in the infective stages of *Trypanosoma***  
34 ***cruzi*.** *Parasitol Res* 2004, **93**: 41–50.
- 35
- 36 21. Santos, RF, Pôssa, MA, Bastos, MS, Guedes, PM, Almeida, MR, Demarco, R,  
37 Verjovski-Almeida, S, Bahia, MT, Fietto, JL: **Influence of Ecto-Nucleoside**  
38 **Triphosphate Diphosphohydrolase Activity on *Trypanosoma cruzi* Infectivity and**  
39 **Virulence.** *PLoS Negl Trop Dis* 2009, **3(3)**: e387.
- 40
- 41 22. Mariotini-Moura, C, Bastos, MS, de Castro, FF, Trindade, ML, de Souza  
42 Vasconcellos, R, Neves-do-Valle, MA, Moreira, BP, de Freitas Santos, R, de Oliveira,  
43 CM, Cunha, LC, Souto, XM, Bressan, GC, Silva-Júnior, A, Baqui, MM, Bahia, MT, de  
44 Almeida, MR, Meyer-Fernandes, JR, Fietto, JL: ***Trypanosoma cruzi* nucleoside**  
45 **triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization,**  
46 **immunolocalization and possible role in host cell adhesion.** *Acta Trop* 2013,  
47 **130C**:140-147.
- 48

- 1 23. Alcina, A, Fresno, M: **Early and late heat-induced proteins during Leishmania**  
 2 **526 mexicana transformation.** *Biochemical and Biophysical Research* 1988, **156:**  
 3 1360–1367.  
 4  
 5 24. Rodrigues, DC, Silva, R, Rondinelli, E, Ürményi, TP: **Trypanosoma cruzi:**  
 6 **modulation of HSP70 mRNA stability by untranslated regions during heat shock.**  
 7 *Experimental Parasitology* 2010, **126:** 245–253.  
 8  
 9 25. Frasson, AP, Charão, MF, Rosemberg, DB, De Souza, AP, Garcia, SC, Bonorino, C,  
 10 Bogó, MR, De Carli, GA, Tasca, T: **Analysis of the NTPDase and ecto-5'-**  
 11 **nucleotidase profiles in serum-limited *Trichomonas vaginalis*.** *Mem Inst Oswaldo*  
 12 *Cruz* 2012, **107(2):** 170-177.

13  
 14  
 15 **Tables**

16 **Table 1. Identification and classification of *T. cruzi* strains/clones used in this work.**

Strain/ Clone	DTUs	Origin	Host
Dm28c	<i>T. cruzi</i> I	Carabobo, Venezuela	<i>Didelphis marsupialis</i>
Y	<i>T. cruzi</i> II	São Paulo, Brazil	<i>Homo sapiens</i>
3663	<i>T. cruzi</i> III	Amazonas, Brazil	<i>Panstrongylus geniculatus</i>
4167	<i>T. cruzi</i> IV	Amazonas, Brazil	<i>Rhodnius brethesi</i>
LL014	<i>T. cruzi</i> V	Chaco, Argentina	<i>Homo sapiens</i>
CL-14	<i>T. cruzi</i> VI	Rio Grande do Sul, Brazil	<i>Triatoma infestans</i>

17 DTU: Discrete Typing Unit.

18  
 19 **Figure Legends**

20 **Figure 1. TcNTPDase-1 expression in epimastigote forms from distinct *T. cruzi***  
 21 **isolates. A. TcNTPDase-1 mRNA levels estimated by RT-qPCR.** The relative  
 22 quantification by  $\Delta\Delta Ct$  method was performed using the avirulent C1-14 clone as  
 23 calibrator. \* $p < 0.05$ . **B. Ecto-ATPase and ecto-ADPase activities between distinct *T.***  
 24 ***cruzi* strain/clones.** The ecto-nucleotidase activities were estimated in *T. cruzi*  
 25 epimastigotes, using 5 mM ATP or ADP as substrate. \*, #  $p < 0.05$  (versus C1-14 clone).  
 26 **C. Alignment of DNA sequence from PCR products for the TcNTPDase-1.** The  
 27 asterisks indicate identity between the nucleotides.

28  
 29 **Figure 2. TcNTPDase-1 expression in infective and non-infective forms of *T. cruzi*.**  
 30 **A. TcNTPDase-1 mRNA levels in epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes,**  
 31 **estimated by RT-qPCR.** The relative quantification by  $\Delta\Delta Ct$  method was performed  
 32 using the epimastigote form as calibrator. \* $p < 0.05$ . **B. Ecto-ATPase and ecto-ADPase**  
 33 **activities in distinct evolutive forms.** The ecto-nucleotidase activities were estimated  
 34 in epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes, using 5 mM ATP or ADP as  
 35 substrate. \*, # $p < 0.05$  (versus epimastigotes).

36  
 37 **Figure 3. TcNTPDase-1 gene expression during epimastigote *in vitro* cultivation**  
 38 **and induced by heat-shock. A. Growth curve of *T. cruzi* epimastigotes, in BHI**  
 39 **medium, at different temperatures. (●) 28°C, (○) 37°C. B. TcNTPDase-1 mRNA**  
 40 **levels during *T. cruzi* growth curve.** The relative quantification by  $\Delta\Delta Ct$  method was  
 41 performed using epimastigotes (Y strain) from the first day of cultivation as calibrator.  
 42 (●) 28°C, (○) 37°C. \* $p < 0.001$  (versus day 1).

43

1 **Supplementary Figure Legend**  
2 **Figure S1. Standardization of Real-Time RT-qPCR for the *T. cruzi* ecto-NTPDase**  
3 **I gene expression analysis. A.** Representative amplification curves for the  
4 TcNTPDase-1, GAPDH and Calmoduline targets. **B.** Representative melting curves for  
5 the TcNTPDase-1, GAPDH and Calmoduline targets. **C.** Validation of the  $\Delta\Delta C_t$  method  
6 for GAPDH and Calmoduline as housekeeping genes. Slopes: 0.1 (TcNTPDase-1-  
7 GAPDH) and -0.06 (TcNTPDase-1-Calmoduline).

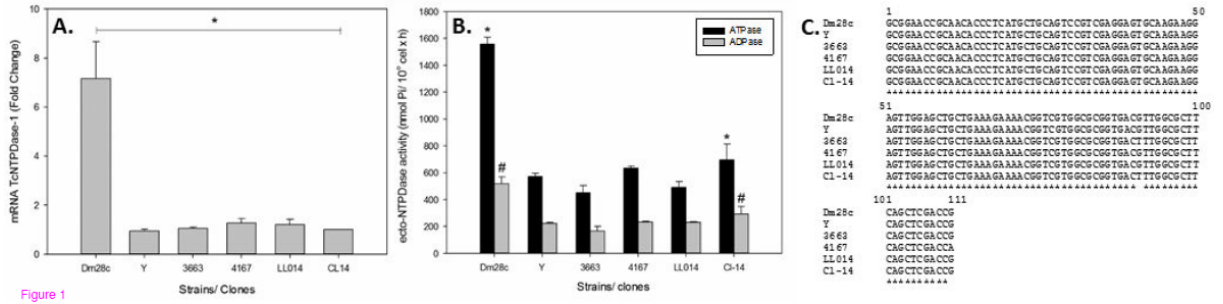


Figure 1

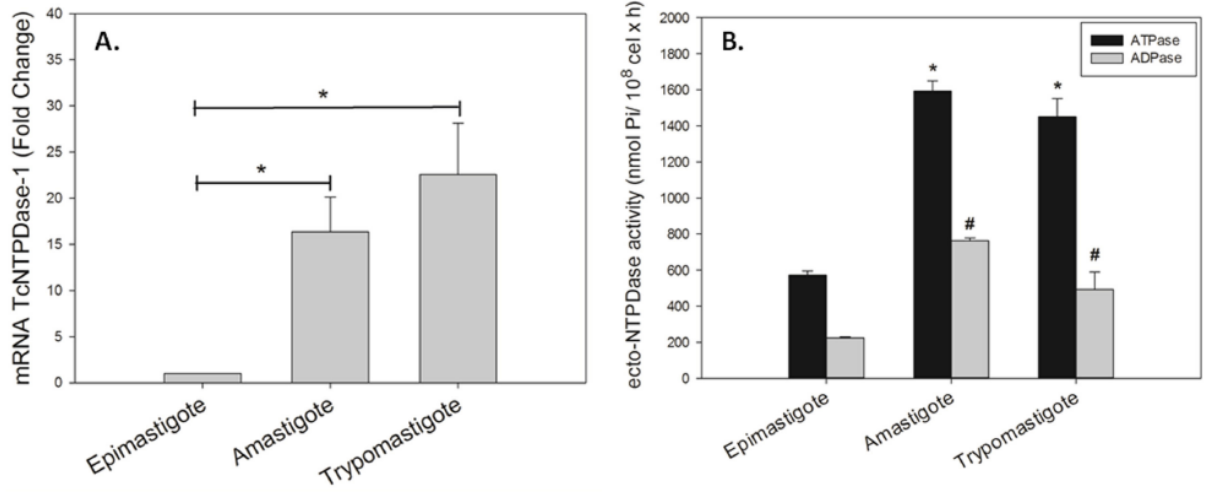


Figure 2

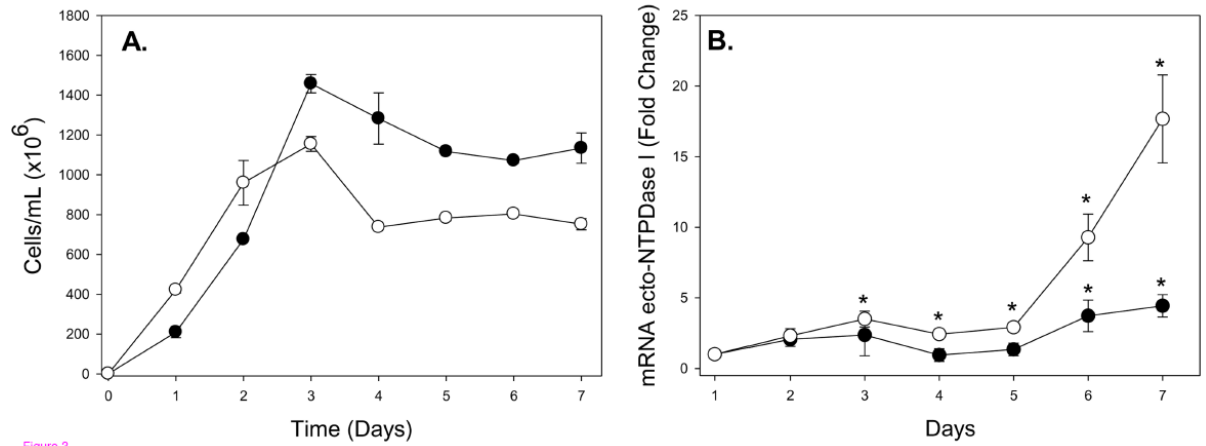
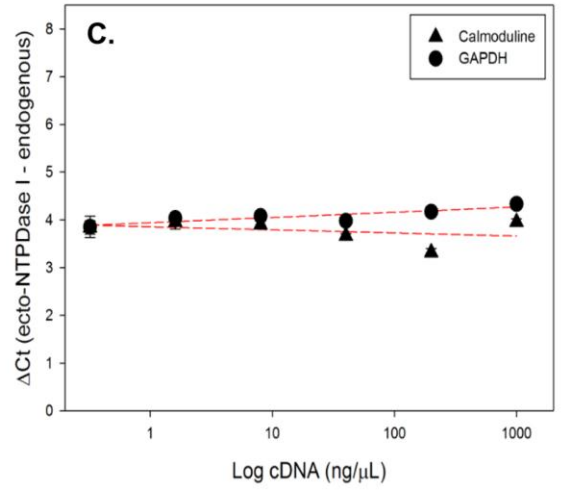
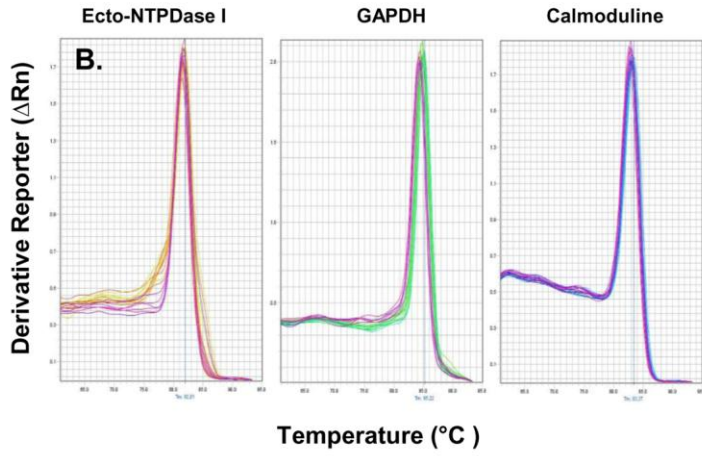
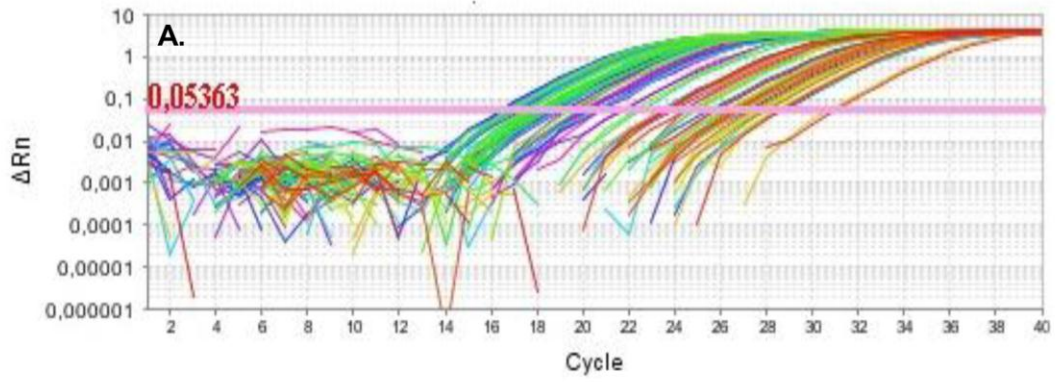


Figure 3



## 5 DISCUSSÃO

Diversos são os trabalhos publicados evidenciando a participação das NTPDases nos processos de infectividade, virulência e sobrevivência de alguns protozoários parasitas (NAKKAR *et al.*, 1998; DE JESUS *et al.*, 2002; BERRÊDO-PINHO *et al.*, 2001; DE SOUZA *et al.*, 2010; ENNES-VIDAL *et al.*, 2011; MEYER-FERNANDES *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2009). No entanto, até o presente momento, a maioria destes estudos apenas apresentaram dados com relação à atividades enzimáticas (ecto-ATPásicas e ecto-ADPásicas) em parasitas intactos ou em frações de membrana plasmática; sendo assim, estudos visando uma contribuição mais específica destas enzimas nestes processos necessitam ser realizados.

Portanto, no presente trabalho, em uma primeira abordagem, foi realizada a padronização de um ensaio de PCR em Tempo Real, utilizando-se três diferentes alvos: TcNTPDase-1 (Alvo principal), Calmodulina e GAPDH (Alvos endógenos), com a finalidade de se avaliar especificamente a expressão do gene da enzima TcNTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi* em suas diferentes cepas/clones de diferentes DTUs (TcI - TcVI) - comparando isolados virulentos e avirulentos-; em seus diferentes estágios evolutivos (epimastigotas, amastigota e tripomastigota) e; nas diferentes etapas de seu ciclo biológico (temperatura de seus hospedeiros invertebrado - 28°C- e vertebrado - 37°C-).

Uma vez alcançadas as condições ideais para a RT-PCR em Tempo Real, melhor combinação de concentração para cada um dos oligonucleotídeos utilizados e a temperatura de anelamento ideal para os nossos experimentos, foram iniciados os procedimentos para obtenção de nossas amostras de interesse, as quais foram quantificadas e avaliadas por espectrofotometria e convertidas a cDNA, por reação de transcriptase reversa. Estes cDNAs foram então submetidos a RT-PCR em Tempo Real, para análise da expressão gênica. Como não foram observadas diferenças significativas entre as eficiências dos diferentes alvos estudados, quantificamos nossas amostras pelo método do Ct comparativo ( $\Delta\Delta Ct$ ).

A fim de avaliar se os alvos selecionados para normalização dos nossos ensaios de RT-PCR apresentariam expressão constitutiva entre as diferentes cepas e formas evolutivas de *T. cruzi* testadas, avaliamos os valores de CTs obtidos para as diferentes amostras, para cada um dos alvos citados. Não foram observadas grandes diferenças nos valores de Ct para os alvos Calmodulina e GAPDH entre as

diferentes amostras testadas (cepas/clones e formas evolutivas), mostrando que estes alvos seriam bons candidatos para normalização dos nossos ensaios de RT-PCR, pois apresentavam valores de *score* (0,379 e 0,549, respectivamente, analisados pelo software ExpressionSuite – Applied Biosystems) bem próximos de zero, o que significa que as variações de Ct entre as amostras e entre os alvos candidatos à genes constitutivos foram mínimas.

Após a padronização dos nossos ensaios de RT-PCR e definição dos normalizadores a serem utilizados neste projeto, iniciamos nossos experimentos de expressão gênica entre as distintas cepas/clones do *T.cruzi* e observamos diferenças significativas na expressão do gene TcNTPDase-1 entre as diferentes subpopulações estudadas, onde epimastigotas da cepa Y (*T.cruzi* II), 3663 (*T.cruzi* III), 4167 (*T.cruzi* IV) e LL014 (*T.cruzi* V) apresentaram níveis de expressão do gene da TcNTPDase-1 muito similares a do clone CL-14 (*T.cruzi* VI), avirulento, o qual foi utilizado como calibrador. Por outro lado, o clone Dm28c (*T.cruzi* I) expressou  $7,2 \pm 1,5$  vezes mais o gene desta enzima quando comparado ao clone CL-14 (Gráfico 1). Este resultado nos motiva a investigar comparativamente a interação entre os epimastigotas destes diferentes isolados com o hospedeiro invertebrado, uma vez que a o clone Dm28c, justamente o que apresenta uma maior expressão da TcNTPDase-1, é um dos melhores modelos descritos de interação com os insetos triatomíneos. Talvez a TcNTPDase-1 possa ter um papel muito importante nesta interação. Porém, outros experimentos necessitam ser realizados para uma melhor avaliação. De fato, trabalhos realizados (MELLO *et al.*, 1996) mostraram que o clone Dm28c de *T.cruzi* apresenta uma elevada taxa de colonização no intestino de *Rhodnius prolixus*, apesar de possuir uma baixa virulência no hospedeiro vertebrado.

A fim de identificar se o aumento nos níveis de mRNA resultaria em um aumento da atividade ecto-nucleotidásica, as atividades ecto-ATPásica e ecto-ADPásica foram avaliadas nas formas epimastigotas de *T.cruzi* (Gráfico 4). Similar aos níveis de mRNA observados, as atividades ecto-ATPásica e ecto-ADPásica, respectivamente, foram 2,3 e 1,8 vezes maiores no clone Dm28c, quando comparado ao clone CL-14 (avirulento). Este aumento significativo tanto no mRNA quanto na atividade da enzima ecto-NTPDase, sugere que há uma modulação positiva na expressão da TcNTPDase-1, nos epimastigotas do clone Dm28c, tanto no gene como em nível de proteína. Além disso, os dados aqui obtidos estão de acordo com estudos já publicados na literatura, que mostraram que cepas de *T.cruzi*

pertencentes a diferentes subpopulações exibem variações em suas atividades ectonucleotidásicas, podendo estar relacionadas à virulência destes parasitos (GIAROLA *et al.*, 2013).

Buscando excluir a possibilidade de que a existência de polimorfismos entre as diferentes cepas/clones poderiam estar afetando nossas análises de expressão gênica, os produtos da PCR para o alvo TcNTPDase-1 foram sequenciados. O alinhamento do DNA indicou uma identidade de 98,2% entre as diferentes subpopulações estudadas (Figura 5). Esta porcentagem se deve a presença apenas de 2 polimorfismos encontrados, o primeiro ocorrendo em uma posição de 1 nucleotídeo anterior ao sítio de ligação do iniciador anti-senso (na cepa 3663 e no clone CL-14) e o segundo ocorrendo no final da sequência alvo (apenas na cepa 4167). Comparando os níveis de expressão da TcNTPDase-1 entre as diferentes cepas/clones e a existência dos polimorfismos, observamos que eles não influenciaram na ligação dos oligonucleotídeos, de modo a confirmar as diferenças observadas na expressão do gene da TcNTPDase-1 entre as diferentes cepas/clones.

Para investigar a expressão da TcNTPDase-1 nas diferentes formas evolutivas do parasita, foram realizados ensaios de infecção *in vitro* (cepa Y), para obtenção das formas tripomastigotas e amastigotas. Os níveis de mRNA (Gráfico 2) e de atividade enzimática (Gráfico 5) foram estimados e comparados entre as diferentes formas evolutivas. Observamos um elevado aumento da expressão da TcNTPDase-1 nas formas tripomastigotas e amastigotas ( $22,5 \pm 5,6$  e  $16,3 \pm 3,8$  vezes maior que a forma epimastigotas, respectivamente). As atividades ecto-ATPásicas e ecto-ADPásicas foram também, significativamente maiores nas formas amastigotas e tripomastigotas. A ecto-ATPásica foi 2,9 e 2,8 enquanto que a ecto-ADPásica foi 3,0, e 3,4 vezes maiores nas formas tripomastigotas e amastigotas, respectivamente, quando comparadas com a forma não infectante, epimastigota. Observamos um simultâneo aumento do mRNA e da atividade ecto-NTPDase nas diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*, sugerindo novamente uma modulação positiva da expressão da TcNTPDase-1 tanto no gene como a nível de proteína. Esses nossos resultados corroboram com dados prévios obtidos por MEYER-FERNANDES e *co/s.*, 2004, onde foi observado um aumento da atividade ecto-ATPásica, dependente de  $Mg^{2+}$ , nas formas tripomastigotas e amastigotas. Essa modulação positiva da expressão da TcNTPDase-1 corrobora com a hipótese de que esta enzima apresenta um importante papel na infectividade do *T. cruzi*. Estudos



feitos por BISAGGIO e cols. em 2003 mostraram que parasitas tratados com inibidores da atividade ecto-ATPase (Suramina e DIDS) apresentavam uma diminuição da atividade ATPase, adesão e internalização de macrófagos nas infecções *in vitro*. Outro estudo de acordo com esta hipótese foi realizado pelo grupo de SANTOS e cols. em 2009, mostrando que a alta taxa de hidrólise de ecto-ATP/ADP é importante para manter a capacidade dos parasitas em infectar células VERO e que a inibição da ecto-NTPDase modula a infectividade e virulência em camundongos, sugerindo mais uma vez que a NTPDase é um facilitador da infecção para o *T.cruzi*.

Durante o ciclo de vida, *T.cruzi* é exposto a diferentes ambientes e temperaturas que são encontrados em seus hospedeiros invertebrados e vertebrados (28°C e 37°C, respectivamente). Alguns estudos publicados já descreveram que parasitas, quando expostos a temperatura de 37°C superexpressam várias proteínas, incluindo as proteínas de choque térmico, as quais podem ser importantes para o processo de proliferação e invasão do parasita (LAWRENCE & ROBERT-GERO, 1985; ALCINA *et al.*, 1988; ALCINA & FRESNO, 1988; RODRIGUES *et al.*, 2010). Sendo assim, a fim de avaliar os níveis de expressão da TcNTPDase-1 durante o cultivo celular e em resposta ao choque térmico, epimastigotas da cepa Y foram cultivadas durante 7 dias a 28°C e 37°C (Gráfico 3 – Letra A). Observamos um pequeno, porém significativo, aumento dos níveis de mRNA da TcNTPDase-1 a 28°C, no sexto e sétimo dia de cultivo após o inóculo ( $3,7 \pm 1,1$  e  $4,4 \pm 0,8$  vezes maior que no primeiro dia de cultivo, respectivamente). Por outro lado, quando a 37°C, a expressão da TcNTPDase-1 foi  $17,7 \pm 3,1$  vezes maior, no sétimo dia após o inóculo, sugerindo que o choque-térmico e o longo período de cultivo pode aumentar a expressão do gene da TcNTPDase-1 (Gráfico 3 – B). Estes resultados aqui apresentados sugerem que a temperatura a 37°C pode apresentar um efeito modulador positivo para a atividade ecto-NTPDásica, ou seja, a temperatura de 37°C (temperatura do hospedeiro mamífero) pode funcionar como um indicativo para o parasita, de que este está dentro do hospedeiro vertebrado e precisa invadir suas células para escapar assim da resposta imunológica deste e conseqüentemente se manter vivo. Uma outra hipótese que este resultado nos sugere está ligada ao fato desta enzima possuir um papel importante na aquisição de purinas, visto que os tripanossomatídeos não apresentam via de síntese *de novo* de purinas (COHN & GOTTLIEB, 1997); como durante o longo período de cultivo, os nutrientes vão se tornando escassos no meio

de cultura, ocasionando um estresse nutricional para os parasitos, sugerimos então que estes possam aumentar a expressão do gene desta enzima para captar os resquícios de nutrientes ainda existentes no meio de cultura, para poder assim se manter e multiplicar. Dados similares foram observados para o protozoário parasita *Trichomonas vaginalis* por FRASSON e cols. 2012, onde os autores descreveram um aumento no nível da expressão da NTPDase em parasitas cultivados em uma condição de suplementação de soro limitado. Por outro lado, foi observado por DE SOUZA e cols., 2010 que quando promastigotas metacíclicos de *L.amazonensis*, eram cultivados na presença de adenosina, estes apresentavam uma diminuição na atividade da TcNTPDase-1 e, conseqüentemente uma diminuição na hidrólise de nucleotídeos extracelulares. Estes resultados também foram previamente observados por BERREDO-PINHO e cols., 2001, onde parasitos cultivados na presença de adenosina apresentavam uma diminuição de sua atividade ATPásica.

Um dado recente observado por MARIOTINI-MOURA e cols. em 2013, onde através de expressão heteróloga, purificação e caracterização molecular da TcNTPDase-1, utilizando anticorpos policlonais específicos, foi confirmada a presença da enzima TcNTPDase-1 na superfície do *T.cruzi*, na região do cinetoplasto, núcleo, vesículas intracelulares, no flagelo e na região de inserção flagelar. As duas últimas localizações sugerem mais uma vez que esta enzima possa ter um papel importante na aquisição de nutrientes. Sendo assim, sugerimos que o aumento da disponibilidade de adenosina no meio de cultura possa contribuir para uma diminuição da atividade enzimática, por outro lado, a escassez dos nutrientes ocasiona um efeito reverso porém, mais estudos necessitam ser realizados para confirmação destes dados.

A compreensão do papel das ecto-NTPDases em parasitos ainda possui muitas lacunas. No entanto, existem fortes evidências de que elas estejam relacionadas aos processos de infectividade e virulência dos tripanossomatídeos, sugerindo que estas enzimas possam ser bons alvos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas, uma vez que estas enzimas são encontradas na superfície externa das células dos parasitas (não sendo necessário que o fármaco transpasse muitas barreiras para chegar no seu alvo), estas se mostram implicadas na sobrevivência dos parasitos, e são amplamente distribuídas entre os diferentes patógenos eucariotos de humanos, o que torna estas enzimas alvos bastante interessantes (SANSOM *et al.*, 2008).

Neste sentido, com o objetivo de avaliar a identidade e similaridade entre as NTPDases de humano e de *T.cruzi*, realizamos um alinhamento comparando a sequência de aminoácidos da CD39 humana (GenBank: NP\_001767) com a TcNTPDase-1 (GenBank: AY540630.1), utilizando o BLAST2SEQ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Observamos apenas uma identidade de 25% e similaridades de 41% (positivas) entre elas (Figura 9). Sugerindo mais uma vez que estas enzimas possam ser alvos bastante promissores para a quimioterapia desta moléstia. Porém, muitos estudos ainda precisam ser realizados buscando a caracterização de diferenças cruciais entre as NTPDases destes parasitos e as NTPDase dos mamíferos, com o sentido de que possam ser desenhados fármacos específicos contra estes parasitos, sem causar grandes efeitos colaterais ao homem, uma vez que estudos já vêm sendo publicados mostrando diferenças entre o sítio ativo das NTPDases de mamíferos e dos patógenos eucariotos de humanos (IVANENKOV *et al.*, 2003; MURPHY-PIEDMONTE *et al.*, 2005).

```

TcNTPDase1 MKQSMARSRR LKRPCISLTF ALLCLFLVTV VYITAYTVGK FSDMARGREK 50
CD39 -----
-----

TcNTPDase1 LDLTDRIIHS MTKRFQECQA QKQLLKNHT TARMALEIAQ ETKKKLEMEL 100
CD39 -----
-----

TcNTPDase1 GLMRRNTLM LQSVVECKKE LELLKENGGRG AVTLALQLDR LTKERQFYMD 150
CD39 --MRRNTLM LQSVVECKKE LELLKENGGRG AVTLALQLDR LTKERQFYMD 150
*****

TcNTPDase1 AIAVVGSSD VGRRQTADV AAIKEFDEW EDAAQNKTEL LTNCNNAMRR 200
CD39 AIAVVGSSD VGRRQTADV AAIKEFDEW EDAAQNKTEL LTNCNNAMRR 200
*****

TcNTPDase1 YSIVFDAGST ACR1 GSRVHVFRYN ----LTSTPH AG----- 250
CD39 YSIVFDAGST GSRVHVFRMK GTKDLTSQQK ESNVKTFC SK NILAILGFSS 250
*****

TcNTPDase1 -----NF SWNGTRPSLT 300
CD39 IIAVIALAV GLTQNKALPE NVKYGIVLDA GSSHTSLYIY KWPAEKENDT 300
*

TcNTPDase1 SFLRLDDEL F VENYEPLSGL ANPNDAVASL SPLIEAAKAY IPESLHACVP 350
CD39 GVVHQVEE CR VKGPGISK FV QKVNEIGIYL TDCMERAREV IPRSQH QETE 350
* * * * *

TcNTPDase1 ACR2 IEMKATAGLR RIGREHAEAV LDVVRRLFAR GPFWMQSELD SVRILEGWEE 400
CD39 VYLGATAGMR -LLRMESEEL ADRVLDVVER SLSNYPDFQ GARIITGQEE 400
* * * * *

TcNTPDase1 ACR3 GPLAWLTVNY LLGALNG--- ----- ACR4 DKNTATILDL GGGSTQIVMH 450
CD39 GAYGWITINY LLGKFSQKTR WFSIVPYETN NQETFALDL GGASTQVTFV 450
* * * * *

TcNTPDase1 PSDPKAIEAY AEF SYALKVN GRSFVVYQHS YEGNGLHAAK EQLLQAVAN 500
CD39 PQN--QTIES PDNALQFRLY GKDYNVYTHS FLCYGK---D QALWQKLAKD 500
* * * * *

TcNTPDase1 NTGANSKVQE ANKIATGTEA TPGASADVA V DAFPCFPKGY VHTETGISNT 550
CD39 IQVASNEILR DPCFHPGYK VVNVSDLYKT PCTKRFEMTL PFQQFEIQGI 550
* * * * *

TcNTPDase1 RDGGKVPSME ECSALFRRHV VRKHQPCVSN SCGFNGVFQP DISAVPMVPV 600
CD39 GN--YQQCHQ SILELFN--- ---TSYCPYS QCAFNGIFLP PLQGD-FGAF 600
* * * * *

TcNTPDase1 YA FSFYDRL KPYIKDEVIR VQDVLDIASQ VCRSMKSVRE LLEQNDTKKN 650
CD39 SAFYFVMKFL N--LTSEKVS QEKVTEMMKK FC-----AQP WEEIKTSYAG 650
* * * * *

TcNTPDase1 KGSLKPEMEC FELSYLFTLL RYGF GFPPE- -QKLHI AKKI NGFETA WALG 700
CD39 VKEKYLSEYC FSGTYILSLL LQGYHFTADS WEHIHFIGKI QGSDAGWTLG 700
* * * * *

TcNTPDase1 ASLVSLEGQS A----- 750
CD39 YMLNLTNMIP AEQPLSTPLS HSTYVFLMVL FSLVLF TVAI IGLLIFHKPS 750
*

TcNTPDase1 ----- 757
CD39 YFWKDMV 757

```

**Figura 9 – Alinhamento das seqüências de aminoácidos da CD39 humana com a TcNTPDase-1.** As regiões em cinza destacam as ACRs (Regiões Conservadas de Apirase) e os asteriscos indicam a identidade entre as seqüências. CD39 Humana (GenBank: NP\_001767) / TcNTPDase-1 (GenBank: AY540630.1)

## 6 CONCLUSÕES

- Observamos que as diferentes subpopulações do *T. cruzi* (TcI - TcVI) e suas diferentes formas evolutivas apresentaram uma modulação diferenciada na expressão do gene da enzima TcNTPDase-1. Notamos que o clone Dm28c (*T. cruzi* I) foi o que apresentou maior expressão do gene TcNTPDase-1, quando comparado as demais cepas/clones Y (*T. cruzi* II), 3663 (*T. cruzi* III), 4167 (*T. cruzi* VI) e LL014 (*T. cruzi* V), as quais expressaram os mesmos níveis do gene da TcNTPDase-1 que o clone CL-14 (*T. cruzi* VI), avirulento. Com relação às diferentes formas evolutivas, notamos que as formas infectantes (tripomastigota e amastigota) apresentaram maior expressão do gene TcNTPDase-1 que a forma epimastigota, não infectante, sugerindo a participação desta enzima na infectividade do parasito.
- Os resultados de atividade enzimática corroboraram com os dados de expressão gênica, onde dentre as diferentes cepas/clones estudadas, o clone Dm28c foi o que apresentou uma maior atividade ecto-NTPDásica. E, dentre as diferentes formas evolutivas, as formas infectantes amastigota e tripomastigotas foram as que apresentaram uma maior atividade ecto-NTPDásica.
- A expressão do gene da TcNTPDase-1 aumentou durante a curva de crescimento de epimastigotas do *T. cruzi* a 28°C e 37°C. No entanto, esse aumento foi mais pronunciado a 37°C, o que sugere uma modulação positiva da expressão do gene, em resposta ao estresse induzido por choque térmico e carência nutricional, por longo período de cultivo.

## 7 PERSPECTIVAS

- Avaliar o papel da TcNTPDase-1 nos processos de infectividade e virulência de *Trypanosoma cruzi*, em modelos *in vitro* e *in vivo*.
- Realizar experimentos de citometria de fluxo e imunoblotting, utilizando um anticorpo específico para a NTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi*, a fim de avaliar a modulação da expressão do gene TcNTPDase-1 em nível de proteína, corroborando com os dados de atividade ecto-NTPDásica.
- Produção de uma cepa Dm28c recombinante de *T.cruzi*, nocaute para o gene da TcNTPDase-1. Avaliar o efeito do nocaute ou bloqueio da TcNTPDase-1 na infectividade do parasita, na interação *in vivo* e *ex vivo* do parasita com o intestino de seu hospedeiro invertebrado e na virulência do parasito, através de infecções experimentais em camundongos, avaliando mortalidade, parasitemia e parasitismo nos diferentes tecidos e resposta imune dos camundongos. Alternativamente, realizar o bloqueio da enzima TcNTPDase-1, utilizando inibidores da atividade ecto-ATPásica, já descritos na literatura (CrATP, DIDS e Suramina) ou com anticorpos anti-NTPDase.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcina A, Fresno M. Early and late heat-induced proteins during *Leishmania mexicana* transformation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988; 156:1360-1367.

Alcina A, Urzainqui A, Carrasco L. The heat shock response in *Trypanosoma cruzi*. *Europ J of Biochem*. 1988; 172:121-127.

Alves AM, Tanuri A, De Almeida DF, Von Krüger WM. Reversible changes in the isoenzyme electrophoretic mobility pattern and infectivity in clones of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. 1993; 77:246-53.

Andrade SG. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Baiano. *Rev Patol*. 1974; 3:65-121.

Andrade SG, Magalhães JB, Pontes AL. Evaluation of chemotherapy with benzonidazole and nifurtimox, in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull World Health Org*. 1985; 63: 721-726.

Andrade SG, Campos RF, Steindel M, Guerreiro ML, Magalhães JB, Almeida MC, Reis JN, Santos VC, Valadares HM, Reis MG, Macedo AM. Biological, biochemical and molecular features of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: its correspondence with the new *T.cruzi* Taxonomy Consensus (2009). *Mem Inst Osw Cruz*. 2011; 106: 948-956.

Archer SK, Luu VD, De Queiroz RA, Brems S, Clayton C. *Trypanosoma brucei* PUF9 regulates mRNAs for proteins involved in replicative processes over the cell cycle. *PLoS Pathog*. 2009; 5:1000565.

Atayde VD, Neira I, Cortez M, Ferreira D, Freymüller E, Yoshida N. Molecular basis of non-virulence of *Trypanosoma cruzi* clone CL-14. *Int J Parasitol*. 2004; 34:851-60.

Atkinson B, Dwyer K, Enjyoji K, Robson SC. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. *Blood Cells Mol Dis*. 2006; 36:217-222.

Aufderheide A, Salo , Madden M, Streit J, Buikstra J, Guhl F *et al*. A 9000 Year Record of Chagas Disease. *PNAS* 2004;101:2034- 2039.

Ávila AR, Yamada-Ogatta SF, Da Silva VM, Krieger MA, Nakamura CV, De Souza W, Goldenberg S. Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol Biochem Parasitol*. 2001;117:169-77.

Aymerich S, Goldenberg S. The karyotype of *Trypanosoma cruzi* Dm 28c: comparison with other *T.cruzi* strains and Trypanosomatids. *Exp Parasitol*. 1989; 69:107-115.

- Barros FS, De Menezes LF, Pinheiro AA, Silva EF, Lopes AH, De Souza W, Meyer-Fernandes JR. Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in *Entamoeba histolytica*. Arch. Biochem. Biophys. 2000; 375:304-314.
- Benz C, Nilsson D, Andersson B, Clayton C, Guilbride DL. Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol. 2005; 143:125-134.
- Berreto-Pinho M, Peres-Sampaio CE, Chrispim PP, R. Belmont- Firpo, A. P. Lemos, A. Martiny, M. A. Vannier-Santos, and J. R. Meyer-Fernandes. A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. Arch. Biochem. Biophys. 2001; 391:16–24.
- Bisaggio DF, Peres-Sampaio CE, Meyer-Fernandes JR, Souto-Padron T. Ecto-ATPase activity on the surface of *Trypanosoma cruzi* and its possible role in the parasite-host cell interaction. Parasitol. Res. 2003; 91:273-282.
- Boitz JM, Ullman B, Jardim A, Carter NS. Purine salvage in *Leishmania*: complex or simple by design?. Trends Parasitol. 2012; 28:345-352.
- Bonaldo MC, Souto-Padron T, De Souza W, Goldenberg S. Cell-Substrate Adhesion during *Trypanosoma cruzi* Differentiation. The Jour of Cell Biol. 1988; 106:1349-1358.
- Bours MJ, Swennen EL. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. Pharmacol Ther. 2006; 112:358-404.
- Bringaud F, Müller M, Cerqueira GC, Smith M, Rochette A, El-Sayed NM. Members of a large retroposon family are determinants of post-transcriptional gene expression in *Leishmania*. PLoS Pathog. 2007;3:1291-307.
- Brost P, Fairlamb AH. Surface receptors and transporters to *Trypanosoma brucei*. Rev Microbiol.1998; 52:745-778.
- Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. Cell Mol Life Sci. 2007; 64:1471-1483.
- Campbell DA, Thomas S, Sturm NR. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal?. Microbes Infect. 2003; 13:1231-40.
- Cançado JR. Tratamento específico. In: CANÇADO J. R.; CHUSTER M. Cardiopatia Chagásica, Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas. 1985.
- Chagas C. Nova Tripanosomíase humana - Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi*, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Osw C. 1909; 1:159-218.
- Chiari E, Tafuri WL, Alvarenga NJ, Soares SJ. Findings on the behavior, in vertebrate and invertebrate hosts, of different cultures of *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop São Paulo.1973; 15:255-60.
- Clayton CE. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. Embo J. 2002; 21:1881-8.



- Clayton CE, Shapira M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol.* 2007; 156:93-101.
- Cohn CS, Gottlieb M. The acquisition of purines by trypanosomatids. *Parasitol Today.* 1997; 13:231-235.
- Coura JR, Castro SL. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem. Inst. Osw Cruz.* 2002; 97:3-24.
- Coura JR, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its Discovery. *Mem Inst Osw Cruz.* 2009; 104:31-40.
- Coura JR, Albajar-Viñas P. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nat.* 2010; No prelo.
- DaRocha WD, Bartholomeu DC, Macêdo CD, Horta MF, Cunha-Neto, Donelson JE, Teixeira SM. Characterization of cDNA clones encoding ribonucleoprotein antigens expressed in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Parasitol Res.* 2002; 88: 292-300.
- De Jesus JB, Lopes AHC, Meyer-Fernandes JR. Characterization of na ecto-ATPase of *Tritrichomonas foetus*. *Vet Parasit.* 2002; 103:29-42.
- De Lana ML, Chiari CA, Chiari E, Morel CM, Gonçalves AM, Romanha AJ. Characterization of two isolates of *Trypanosoma cruzi* obtained from the patient Berenice, the first human case of Chagas' disease described by Carlos Chagas in 1909. *Parasitol Res.* 1996; 82:257-60.
- De Souza W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Pharm. Des.* 2002; 8:269-285.
- De Souza MC, De Assis EA, Gomes RS, Da Silva EAM, Melo MN, Fietto JLR, Afonso LCC. The influence of ecto-nucleotidases on Leishmania amazonensis infection and immune response in C57B/6 mice. *Act Trop.* 2010; 115:262-269.
- Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *Jour Exp Med.* 2007; 204:1257-1265.
- Di Virgilio F, Borea PA, Illes P. P2 receptors meet the immune system. *Tre in Pharmacol Sc.* 2001; 22:5-7.
- Di Virgilio F. Purinergic mechanism in the immune system: a signal of danger for dendritic cell. *Pur Sig.* 2006; 1:205-209.
- Dias JCP, Coura JR. Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral (J. C. P. Dias & J. R. Coura, org.). *Mem Inst Osw Cruz.* 1997; 486:33-66.
- Dias JCP. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. *Mem Inst Osw Cruz.* 2007b; 102:11-18.

- El Kouni MH. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. *Pharmacol Therm.* 2003; 99:283-309.
- Ennes-Vidal V, Castro ROS, Britto C, Harrabin H, D'Avila-Levy CM, Moreira OC. CrATP interferes in the promastigote-macrophage interaction in *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitol.* 2011; 138:960–968.
- Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC, Naiff RD, Barrett TV, Degraive W, Zingales B, Campbell DA, Coura JA. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am J trop med hyg.* 1998; 58:807-811.
- Ferreira LF, Britto C, Cardoso MA, Fernandes O, Reinhard K, Araújo A. Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected tissues from Chilean mummies. *Acta Trop.* 2000; 75:79-84.
- Fietto JL, De Marco R, Nascimento IP, Castro IM, Carvalho TM, De Souza W, Bahia MT, Alves MJ, Verjovski-Almeida S. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 316:454-460.
- Fonseca FV, Fonseca de Souza AL, Mariano AC, Entringer PF, Gondim KC, Meyer-Fernandes JR. *Trypanosoma rangeli*: characterization of a Mg-dependent ecto ATP-diphosphohydrolase activity. *Exp. Parasitol.* 2006; 112:76–84.
- Frasson, AP, Charão, MF, Rosemberg, DB, De Souza, AP, Garcia, SC, Bonorino, C, Bogo, MR, De Carli, GA, Tasca, T: Analysis of the NTPDase and ecto-5'-nucleotidase profiles in serum-limited *Trichomonas vaginalis*. *Mem Inst Osw Cruz* 2012, 107: 170-177.
- Freitas JM, Lages-Silva E, Crema E, Pena SDJ, Macedo AM. Real time PCR strategy for *Trypanosoma cruzi* major lineage identification directly on human infected tissues. *Inter J Parasit.* 2005; 35:411-417.
- Garcia S, Ramos CO, Senra JF, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de-Carvalho AC, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MB. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Ag and Chemoth.* 2005; 49(4):1521-1528.
- Giarola NLL, De Almeida-Amaral EE, Collopy-Júnior I, De Souza ALF, Majerowicz D, Paes LS, Gondim KC, Meyer-Fernandes JR. *Trypanosoma cruzi*: Effects of heat shock on ecto-ATPase activity. 2013;
- Gibson WC, Miles MA. The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. *Embo J.* 1986; 5:1299-1305.
- Goldenberg S, Salles JM, Contreras VT, Lima MPF, Katzin AM, Colli W, Morel CM. Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Lett.* 1985;180:265-70.
- Gomez C, Esther Ramirez M, Calixto-Galvez M, Medel O, Rodriguez MA. Regulation of gene expression in protozoa parasites. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 72:60-45.

Gottlieb M, Dwyer DM. Evidence for distinct 5'- and 3'- nucleotidase activities in the surface membrane fraction of *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 1983; 7:303–317.

Gournaris K. Nucleotidase cascades are catalyzed by secreted proteins of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Infect Immun.* 2002; 70:4917-24.

Guedes PMM, Fietto JLR, De Lana M, Bahia MT. *Adv Chag Dis Chem.* 2006; CMCAIA, in press.

Haile S, Papadopoulou B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol* 2007; 10:569-77.

Handa M, Guidott G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 218:916-923.

Hummel HS, Gillespie RD, Swindle J. "Mutational analysis of 3' splice site selection during trans-splicing". *J Biol Chem.* 2000; 275:35522-35531.

Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde [homepage na internet]. Disponível em: <http://www.icict.fiocruz.br/>.

Ivanenkov VV, Murphy-Piedmonte DM, Kirley, TL. Bacterial expression, characterization, and disulfide bond determination of soluble human NTPDase6 (CD39I2) nucleotidase: implications for structure and function. *Biochem.* 2003; 42: 11726–11735.

Kirchhoff LV. Epidemiology of American trypanosomiasis (Chagas disease). *Adv parasitol.* 2011; 75:1-18.

Kleffmann T, Schmidt J, Schaub GA. Attachment of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes to hydrophobic substrates and use of this property to separate stages and promote metacyclogenesis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1998; 45:548-555.

Komoszynski M, Wojtczak A. Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. *Bioch et Biophys act.* 1996; 233-241.

La Sala A, Di Virgilio F, Idzko M, Norgauer J, Girolomoni G. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J.Leukoc.Biol.* 2003; 73:339-343.

Langston HP, Ke Y, Gewirts AT, Dombrowski KE, Kapp JA. Secretion of IL-2 and INF- $\gamma$ , But not IL-4, by Antigen-Specific T cells Requires Extracellular ATP. *Jour Immunol.* 2003; 2962-2970.

Lawrence F, Robert-Gero M. Induction of heat shock and stress proteins in promastigotes of three *Leishmania* species. *Proc of the Nat Acad of Sc USA.* 1985; 82:4414–4417.

Leite S, Thomaz R, Fonseca FV, Panizzutti R, Vercesi AE, Meyer-Fernandes JR. *Trypanosoma brucei brucei*: Biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. *Exp Parasitol*. 2007; 115:315-323.

Leslie M. Infectious diseases, Drug developers finally take aim at a neglected disease. *Scien*. 2011; 333:933–5.

Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Meth*. 2001; 25:402-8.

Macedo AM, Martins MS, Chiari E, Pena SD. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol Bioch Parasitol*. 1992; 55:147-53.

Mariotini-Moura C, Silva e Bastos M, De Castro FF, Trindade ML, Vasconcellos RS, Neves-do-Valle MAA, Moreira BP, Santos RF, De Oliveira CM, Cunha LCS, Souto XM, Bressan GC, Silva-Júnior A, Baqui MMA, Bahia MT, De Almeida MR, Meyer-Fernandes JR, Fietto JLR. *Trypanosoma cruzi* nucleoside triphosphatediphosphohydrolase1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion. *Act Trop*. 2013; 130:140-147.

Martinez-Calvillo S, Nguyen D, Stuart K, Myler PJ. Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Euk Cell*. 2004; 3:506-517.

Maslov DA, Simpson L. Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa. *Parasit T*. 1995; 11:30-32.

Matin A, Khan NA. Demonstration and partial characterization of ecto-ATPase in *Balamuthia mandrillaris* and its possible role in the host-cell interactions. *Ap Microb*. 2008; 47:348-354.

Matos JA, Borges FP, Tasca T, Bogo MR, De carli GA, Fauth MG, Dias RD, Bonan CD. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. *Inter Jour Parasitol*. 2001; 31:770-775.

Mello CB, Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA. Differential in vitro and in vivo behavior of three strains of *Trypanosoma cruzi* in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol*. 1996; 82:112-21.

Meyer-Fernandes JR, Dutra PM. Mg-dependent ecto-ATPase activity in *Leishmania tropica*. *Arch Biochem Biophys*. 1997; 341:40-6.

Meyer-Fernandes JR, Saad-Nehme J, Peres-Sampaio CE, Belmont-Firpo R, Bisaggio DFR, Do Couto LC, De Souza ALF, Lopes AHSC, Souto-Padron T. A Mg-dependent ecto-ATPase is increase in the infective stages of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*. 2004; 93:41-50.

Ministério da Saúde [homepage na internet]. Disponível em: <http://www.saude.gov.br>.

Mizumoto N, Kumamoto T, Robson SC. CD39 is the dominant Langerhans cell associated ecto-NTPDase: Modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat Med.* 2002; 8:358-365.

Morel CM, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci.* 1980; 77:6810- 6814.

Munagala, NR, Wang CC. Adenosine is the primary precursor of all purine nucleotides in *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol.* 2003; 127:143-149.

Murphy-Piedmonte DM, Crawford PA, Kirley TL. Bacterial expression, folding, purification and characterization of soluble NTPDase5 (CD39l4) ecto- nucleotidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005; 1747:251–259.

Nakkar V, Beckers CJ, Polotsky V, Joiner KA. Basis for substrate specificity of the *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. *Mol Biochem Parasitol.* 1998; 97:209-220.

Neves DP. *Parasitologia Humana.* 2.ed. São Paulo: Atheneu; 2007. p.494.

Organização Panamericana de Saúde/Organização Mundial de Saúde [homepage na internet]. Escritório Regional para as Américas [atualizado em 14 de abril de 2014]. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/>.

Parsons M, Nelson RG, Watkins KP, Agabian N. Trypanosome mRNAs share a common 5' spliced leader sequence. *Cell.* 1984; 38:309-16.

Plesner L. Ecto-ATPases: identities and functions. *Int. Rev. Cytol.* 1995; 158:141-142.

Previato JO, Jones C, Xavier MT, Wait R, Travassos LR, Parodi AJ, Mendonça-Previato L. Structural characterization of the major glycosyl-phosphatidylinositol membrane-anchored glycoprotein from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* Y-strain. *Jour of Biol Chem.* 1995; 270:7241-7250.

Raether W, Hanel H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitol Res.* 2003; 90:19-39.

Rassi A, Amato Neto V. Tentativa de tratamento específico, por meio da ticlopidina, de pacientes com doença de Chagas em fase crônica. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000; 33: 225-226.

Rassi AJR, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet.* 2010; 375:388-402.

Rassi AJR, Rassi A, Rezende JM. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin N Am.* 2012; 26:275-291.

- Ravelic V, Burnstock G. Receptors for purine and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 1998; 50:413-92.
- Rey L. Bases da Parasitologia Médica. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.40-41.
- Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Pur Sig.* 2006; 2:409-430.
- Rodrigues DC, Silva R, Rondinelli E, Ürményi TP. *Trypanosoma cruzi*: modulation of HSP70 mRNA stability by untranslated regions during heat shock. *Exp Parasitol.* 2010; 126:245-253.
- Sansom FM, Robson SC, Hartland EL. Possible Effects of Microbial Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolases on Host-Pathogen Interactions. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008; 72:765-781.
- Santos RF, Pôssa MAS, Bastos MS, Guedes PMM, Almeida MR, De Marco R, Verjovski-Almeida S, Bahia MT, Fietto JLR. *PLOS Negl Trop Dis.* 2009; 3:387-398.
- Siegel TN, Tan KSW, Cross GAM. Systematic study of sequence motifs for RNA trans splicing in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol.* 2005; 25:9586-9594.
- Simões-Barbosa A, Barros AM, Nitz N, Arganaraz ER, Teixeira ARL. Integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircle sequence in the host genome may be associated with autoimmune serum factors in Chagas disease patients. *Mem Inst Osw Cruz.* 1999; 94:249-252.
- Simpson L. The mitochondrial genome of Kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. *Rev of Microbiol.* 1987; 41:363-382.
- Sissons J, Alsam S, Jayasekera S, Khan NA. Ecto-ATPases of clinical and non-clinical isolates of *Acanthamoeba*. *Microb Pathog.* 2004; 37:231-239.
- Soares MB, Gonçalves R, Pyrrho AS, Costa DA, Paiva CN, Gattass CR. Balanced cytokine-producing pattern in mice immunized with an avirulent *Trypanosoma cruzi*. *An of the Bra Acad of Sc.* 2003; 75:167-172.
- Souto RP, Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol bioch parasitol.* 1993; 62:45-52.
- Tanowitz HB, Kirchoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. Chagas' disease. *Clin Microbiol.* 1992; 5:400-419.
- Tausky HH, Shorr E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J Biol Chem.* 1953; 202:675-685.

- Teixeira ARL, Lacava Z, Santana JM, Luna H. Insertion of *Trypanosoma cruzi* DNA in the genome of mammal host cell through infection. Rev Soc Bras Med Trop. 1991; 24:55-58.
- Teixeira SM, Kirchhoff LV, Donelson JE. *Trypanosoma cruzi*: suppression of tuzin gene expression by its 5'UTR and spliced leader addition site. Exp Parasitol. 1999; 93:143-151.
- Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. Proc Nat Acad Sc USA. 1986; 83:115-119.
- Tibayrenc M, Ayala FJ. Isozyme variability the agent of Chagas'disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. Evol. 1988; 42:277-292.
- Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. Inter Jour for Parasitol. 2001; 31:472-481.
- Ullu E, Tschudi C, Gunzi A. Trans-splicing in trypanosomatid protozoa. Em: Smith, DF, Parson, M. (ed) Molecular Biology of Parasitic Protozoa IRL Press Oxford, 1996; 115-129.
- Urbina JA; Do Campo R. Specific chemotherapy Of Chagas disease: controversies and advances. Trends in Parasitol. 2003; 19: 495-501.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Peape A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Gen Biol. 2002; 3:0034.1
- Vanhame L, Pays E. Control of gene expression in Trypanosomes. Microbiol. Ver 1995;59:223-40.
- Vasconcelos EG, Ferreira ST. Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. Immunological cross- reactivities with potato apyrase and *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. J Biol Chem. 1996; 271:22139-22145.
- Westenberger SJ, Cerqueira GC; El-Sayed NM, Zingales B, Campbell DA, Sturm NR. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and possess a conserved element in the non-coding region. B.M.C. Gen. 2006; 7:60.
- Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. Biochem Biophys Acta. 2008; 1783:673-694.
- Zimmermann H, Braun N. Extracelular metabolism of nucleotides in the nervous system. J Auton Pharmacol. 1996; 16:299-309.
- Zimmermann H, Braun N, Kegel B, Heine P. New insights into molecular structure and function of ecto-nucleotidases in the nervous system. Neurochem. Int. 1998; 32:421-425.

Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. Naunyn Schmied Arch.Pharmacol. 2000; 362:299-309.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiara E; Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E; Macedo AM, Machado CR; Miles MA; Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman A. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Osw Cruz. 2009; 104:1051-54.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol. 2012; 12:240-53.