

MARCELA AUXILIADORA SOUZA PÔSSA

**Avaliação da participação das ecto-nucleotidases do *Trypanosoma cruzi*
nos processos de infecção e virulência em modelo murino**

OURO PRETO, MG

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – NUPEB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Avaliação da participação das ecto-nucleotidases do *Trypanosoma cruzi*
nos processos de infecção e virulência em modelo murino**

Autor: Marcela Auxiliadora Souza Pôssa
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Lopes Rangel Fietto
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Terezinha Bahia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre; área de concentração: Imunobiologia de Protozoários.

OURO PRETO, MG
2008

*“Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor...
Lembre-se: Se escolher o mundo ficara sem o amor,
mas se escolher o amor, com ele conquistará o mundo.”*

Albert Einstein

*A minha **MÃE**, pelo exemplo de vida e coragem;*

*Ao meu noivo, **MARCO ANTÔNIO**, pelo incentivo, amor, carinho e cumplicidade;
sem você, talvez a realização deste sonho seria impossível.*

A Deus, fonte de vida, sabedoria e compreensão, por me dar forças em todos os momentos que precisei e por fazer da minha vida um eterno aprendizado.

A Professora Maria Terezinha Bahia, por ter aberto as portas do Laboratório de doença de Chagas para a minha formação científica, por todo o suporte técnico, material e científico oferecido para a realização deste trabalho e por estar sempre disponível em todos os momentos que precisei.

A Professora Juliana Lopes Rangel Fietto, por ter entregue a mim um projeto tão especial, ao qual me dediquei de coração. Agradeço pela confiança no meu trabalho e pelas palavras de incentivo.

Ao Ramon, que me recebeu no laboratório e compartilhou comigo grande parte deste trabalho. Meu agradecimento por toda a ajuda, compreensão e amizade.

A duas amigas inesquecíveis: Jaila Dias Borges e Silvânia Ferreira, por acreditarem na minha capacidade e me incentivarem a buscar um aprendizado mais completo através da pesquisa. Obrigado por tudo.

Aos professores do Laboratório de Doença de Chagas, pela convivência agradável. Em especial ao professor André Talvani, sempre disponível a ajudar, tirando dúvidas, dando sugestões importantes para o meu trabalho e principalmente pela amizade.

Aos alunos do Laboratório de Doença de Chagas, pela convivência e por todos os momentos de alegria que compartilhamos. Sentirei muitas saudades de todos vocês. Em especial aos que ajudaram neste trabalho: Tassiane, pela ajuda nas curvas de parasitemia e Lívia, em palavras não posso expressar minha eterna gratidão por toda ajuda recebida em várias etapas do meu trabalho, principalmente na finalização dos meus experimentos.

A Vanja, pelos ensinamentos e pela disponibilidade e boa vontade em ajudar sempre que precisei.

Ao Professor George Luiz Lins Machado-Coelho, pela ajuda na análise estatística.

A todos do Laboratório de Imunoparasitologia, pela convivência agradável e por disponibilizarem os equipamentos para a realização da RT-PCR. Em especial a Mirian, pela amizade e por toda disponibilidade em ajudar.

Aos professores do NUPEB, pelos grandes ensinamentos.

Aos funcionários do Biotério Central da Universidade Federal de Ouro Preto: Cristina, Adriana, Rosária, Selma, Jorginho, Marcos, Cláudio. Agradeço por sempre me receberem com o maior carinho e respeito.

A Maria Chaves, técnica do Laboratório de Imunopatologia, pelo processamento do meu material.

A Cida, secretária do NUPEB, por estar sempre disposta a nos atender, com a maior boa vontade, carinho e atenção.

A querida amiga Nilza, minha “mãe japonesa”, que sempre preocupada comigo, me aconselhava, me dava colo nos momentos de desespero; minha eterna gratidão pela sincera amizade.

A Rebeca e André, que Deus colocou na minha vida como verdadeiros irmãos, e assim fui recebida em sua família; agradeço por terem tornado meus dias em Ouro Preto mais alegres e por compartilharem comigo tudo que a vida lhes proporciona. Amo vocês e toda a família Gonzaga.

Aos amigos que conquistei nestes 7 anos de Ouro Preto, especialmente aos verdadeiros, os quais não preciso citar nomes, pois cada um sabe de sua importância em minha vida.

A toda a minha família, pela torcida. Em especial, aos meus sobrinhos: Paulo Felipe, João Pedro, Débora, Luiza, Rafaela, Vinícius e Joãozinho, por encherem a minha vida de alegria e felicidade.

A duas pessoas especiais, as quais dedico esta dissertação:

MÃE, pelo exemplo de vida e perseverança; por me ensinar a enfrentar todos os obstáculos que a vida nos impõe com dignidade, fé e acima de tudo coragem;

Ao meu noivo, *MARCO ANTÔNIO*, meu grande incentivador, pela cumplicidade, amizade, respeito e por muitas vezes abdicar de seus sonhos e desejos em função da realização dos meus. Te amo pra sempre.

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – A Doença de Chagas.....	2
1.2 – Resposta Imune na Doença de Chagas.....	3
1.3 – Tratamento da Doença de Chagas.....	5
1.4 – As Ecto-nucleotidasas.....	8
1.5 – Os nucleotídeos extracelulares e suas funções biológicas.....	10
1.6 – Inibidores de E-NTPDases.....	13
1.7 – As Ecto-nucleotidasas e parasitos.....	14
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 - Objetivo Geral:.....	20
3.2 - Objetivos Específicos:.....	20
4. ANIMAL, MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 – Cepa do Trypanosoma cruzi.....	22
4.2 – Animais.....	22
4.3 – Obtenção das formas tripomastigotas de cultura celular in vitro.....	22
4.4 - Infecção experimental em camundongos.....	23
4.4.1 - Infectividade.....	23
4.4.2 - Parasitemia.....	24
4.4.3 - Mortalidade.....	24
4.5 – Necropsias.....	24
4.6 - Expressão do mRNA para citocinas in situ por RT-PCR.....	25
4.6.1 - Extração de RNA.....	25
4.6.2 - Síntese de cDNA.....	26
4.6.3 - Realização da PCR e quantificação de citocinas.....	27
4.7 – Análise dos níveis séricos de INF- γ e IL-10.....	28
4.8 - Avaliação morfológica.....	29
4.8.1 – Preparação dos cortes histológicos.....	29
4.8.2 – Técnica de Hematoxilina-Eosina (HE).....	29
4.8.3 – Avaliação quantitativa da área ocupada por inflamação.....	29
4.9 – Análise Estatística.....	30
5. RESULTADOS.....	22
5.1 – Avaliação da parasitemia e sobrevivência - Suramina.....	32
5.2 – Avaliação da parasitemia e sobrevivência - Cloreto de Gadolínio (GdCl ₃).....	35
5.3 – Avaliação da parasitemia e sobrevivência - ARL 67156.....	37
5.4 – Análise da expressão do mRNA para citocinas in situ.....	40
5.4.1 – Expressão do mRNA para INF- γ no coração.....	40
5.4.1 – Expressão do mRNA para IL-10 no coração.....	41
5.5 – Níveis séricos de INF- γ e IL-10.....	44
5.5.1 – Níveis séricos de INF- γ	44
5.5.1 – Níveis Séricos de IL-10.....	45
5.6 - Avaliação morfológica.....	46
6. DISCUSSÃO.....	50
7. CONCLUSÃO.....	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

ACRs	<i>Apyrase Conserved Regions</i>
Ado	Adenosina
Ado _e	Adenosina extracelular
ARL 67156	6-N, N-dietil-D-β, γ-dibromometileno ATP
ATP _e	ATP extracelular
Células NK	Células <i>Natural killer</i>
DIDS	4,4'-diisothiocyanatetilbene-2,2'-disulfonic acid
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
E-NPPase	Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
E-NTPDases	Ecto-nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase
NTPDase I	Ecto-nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase Recombinante
Gd	Gadolínio
GdCl ₃	Cloreto de Gadolínio
HEPES	Ácido, N – 2 – hidroxietilpiperazina – N' – 2 etanosulfônico
IFN-γ	Interferon Gama
IL-1β	Interleucina 1β
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
kDa	Kilodaltons
KO	<i>Knock-out</i>
LIT	<i>Liver infusion tryptose</i>
NO	Óxido nítrico
PBS	Salina tamponada com fosfato
PBS-T	Salina tamponada com fosfato acrescida de 0,05% Tween-20
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PP	Período Patente
PPP	Período Pré-patente
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
TCD4 ⁺	Linfócito T auxiliar

TCD8 ⁺	Linfócito T citotóxico
TGF-β	Fator de Transformação de Crescimento Beta
Th1	Linfócito T auxiliar tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar tipo 2
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
HPRT	Hipoxantina Ribosil Transferase

A Doença de Chagas é uma das doenças parasitárias com maior impacto social e econômico na América Latina, acometendo, ainda hoje, milhares de pessoas. Desta forma alvos mais específicos têm sido estudados visando uma abordagem racional para a quimioterapia da doença; visto que os fármacos hoje comercializados oferecem baixos índices de cura na fase crônica da infecção, além de muitos efeitos colaterais. Vias bioquímicas associadas à sobrevivência e virulência do *Trypanosoma cruzi* têm sido estudadas. Neste trabalho foi avaliada a participação das ecto-nucleotidases, nos processos de infecção e virulência do *T. cruzi* em camundongos Swiss, por meio da utilização de inibidores de ecto-nucleotidases, com ação sobre E-NTPDases (Suramina, Gadolínio e ARL67156). O pré-tratamento dos parasitos com diferentes concentrações dos inibidores levou a diminuições significativas da parasitemia e mortalidade. A influência dos pré-tratamentos no curso da infecção foi dose-dependente e as concentrações mais efetivas foram de 300 μ m, 300 μ m e 1mM respectivamente para o GdCl₃, ARL e Suramina. O pré-tratamento dos parasitos levou a um aumento na expressão de INF- γ no coração dos camundongos e dos níveis séricos de INF- γ , nos estágios iniciais da infecção; sugerindo que a inibição de ecto-nucleotidases leve ao aumento da concentração de ATP extracelular (ATP_e), o qual estimularia mecanismos inflamatórios do hospedeiro contra o parasito; evidenciando desta forma a participação das ecto-nucleotidases na modulação da resposta imune. Nossos resultados demonstram que o tratamento dos parasitos, anteriormente ao inóculo, não alterou significativamente a expressão de IL-10 no coração e sua produção no soro dos camundongos. Além disso, ao avaliarmos a intensidade da inflamação no coração dos animais, observamos que o inibidor GdCl₃ foi capaz de reduzir o número de células inflamatórias no coração, tanto no 8^o quanto no 15^o dia de infecção, em relação ao grupo controle infectado. Portanto, nossos dados sugerem a participação efetiva das E-NTPDases no processo infectivo e na modulação da resposta imune do hospedeiro pelo *T. cruzi*. Desta forma, a inibição do metabolismo extracelular de nucleotídeos de adenina surge agora como um novo alvo para o bloqueio da infecção por este parasito; através de uma quimioterapia mais específica.

Chagas disease is one of the main diseases with high economical and social impacts in Latin America, with millions of people with this illness. The current drugs used to treat this disease lead to low cure, especially in the chronic phase and present high toxic non-desired side effects. Because of these there are necessity to develop new drugs and strategies for the control and treatment of Chagas disease. From this point of view biochemical pathways related with surviving capacity and virulence of *Trypanosoma cruzi* could represent good targets. In this work we evaluate the roles of *T. cruzi* ecto-nucleotidases in the infection and virulence procedures in mouse, using parasites pre-treated with the known E-NTPDase inhibitors (Suramin, Gadolinium and ARL67156). The pre-treatment with all inhibitors leaded to significantly decreases in parasitemia and mortality. This influences were dose-dependent and the betters concentrations of inhibitors were: 300µm, 300µm and 1mM, to GdCl₃, ARL and Suramin, respectively. The pre-treatments lead to high levels of INF-γ expression in the heart and serum production, in the earlier stages of infection. These data suggest that ecto-nucleotidase inhibitions could be responsible to increments in extra-cellular ATP concentration that could stimulate hosts inflammatory mechanisms against parasites, evidencing the participation of these ecto-enzymes in the modulation of host immune system. Our data showed that the pre-treatment no change IL-10 heart expression and serum production too. In addition, when we evaluate the inflammation intensity in animal hearts, we observed that GdCl₃ was able to reduce the number of inflammatory cells, both in the 8th an 15th days of infection. Concluding, together our data suggest an effective participation of parasite E-NTPDases in the infection process and in the modulation of host immune system. We believe that the inhibition of these pathways emerge as new good targets to block *T. cruzi* infection and to be used in specific new chemotherapy to Chagas disease.

- Gráfico 1** - Curva de parasitemia utilizando 10 camundongos Swiss infectados via intraperitoneal com 5×10^3 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, derivados de primeira passagem em cultura celular, pré-tratados ou não com diferentes concentrações de Suramina por 10 minutos 34
- Gráfico 2** – Curva de sobrevivência utilizando 10 camundongos Swiss infectados via intraperitoneal com 5×10^3 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, derivados de primeira passagem em cultura celular, pré-tratados ou não com diferentes concentrações de Suramina por 10 minutos 34
- Gráfico 3** - Curva de parasitemia utilizando 10 camundongos Swiss infectados via intraperitoneal com 5×10^3 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, derivados de primeira passagem em cultura celular, pré-tratados ou não com diferentes concentrações de $GdCl_3$ por 10 minutos 36
- Gráfico 4** – Curva de sobrevivência utilizando 10 camundongos Swiss infectados via intraperitoneal com 5×10^3 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, derivados de primeira passagem em cultura celular, pré-tratados ou não com diferentes concentrações de $GdCl_3$ por 10 minutos 37
- Gráfico 5** - Curva de parasitemia utilizando 10 camundongos Swiss infectados via intraperitoneal com 5×10^3 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, derivados de primeira passagem em cultura celular, pré-tratados ou não com diferentes concentrações de ARL 67156 por 10 minutos 39
- Gráfico 6** – Curva de sobrevivência utilizando 10 camundongos Swiss infectados via intraperitoneal com 5×10^3 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, derivados de primeira passagem em cultura celular, pré-tratados ou não com diferentes concentrações de ARL 67156 por 10 minutos 39
- Gráfico 7** – Análise semi-quantitativa da expressão do mRNA da citocina IFN- γ no coração de camundongos Swiss infectados via intraperitoneal com 5×10^3 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, derivados de primeira passagem em cultura celular, pré-tratados ou não com inibidores de E-NTPDases, por 10 minutos (Suramina 1mM – SUR, Gadolínio 300 μ m – $GdCl_3$ e ARL 67156 300 μ m - ARL). O índice de expressão de citocinas foi obtido através da relação entre a média da expressão da citocina do grupo sobre a média da expressão do controle endógeno HPRT 41
- Gráfico 8** – Análise semi-quantitativa da expressão de mRNA da citocina IL-10 no coração de camundongos Swiss infectados via intraperitoneal com 5×10^3 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, derivados de primeira passagem em cultura celular, pré-tratados ou não com inibidores de E-NTPDases por 10 minutos (Suramina 1mM – SUR, Gadolínio 300 μ m – $GdCl_3$ e ARL 67156 300 μ m - ARL). O índice de expressão de citocinas foi obtido através da relação entre a média da expressão da citocina do grupo sobre a média da expressão do controle endógeno HPRT 42

- Gráfico 9** – Análise dos níveis séricos de INF- γ nos camundongos Swiss infectados via intraperitoneal com 5×10^3 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, derivados de primeira passagem em cultura celular, pré-tratados com inibidores da apirase por 10 minutos (Suramina 1mM – SUR, Gadolínio 300 μ m – GdCl₃ e ARL 67156 300 μ m - ARL) ou não (CNI – Controle Não-Infectado; CI – Controle Infectado) 44
- Gráfico 10** – Análise dos níveis séricos de IL-10 nos camundongos Swiss infectados via intraperitoneal com 5×10^3 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, derivados de primeira passagem em cultura celular, pré-tratados com inibidores por 10 minutos (Suramina 1mM – SUR, Gadolínio 300 μ m – GdCl₃ e ARL 67156 300 μ m - ARL) ou não (CNI – Controle Não-Infectado; CI – Controle Infectado) 45
- Gráfico 11** – Análise morfométrica do infiltrado inflamatório no coração dos camundongos infectados via intraperitoneal com 5×10^3 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, derivados de primeira passagem em cultura celular, pré-tratados com os diferentes inibidores por 10 minutos (Suramina 1mM – SUR, Gadolínio 300 μ m – GdCl₃ e ARL 67156 300 μ m - ARL) ou não (CNI – Controle Não-Infectado; CI – Controle Infectado) 46

- Figura 1** - Topografia de membrana e propriedades catalíticas das diferentes famílias de Ecto-nucleotidases 9
- Figura 2** - Diagrama topológico de Purinoreceptores 11
- Figura 3** – Imagem visualizada pela objetiva de 40× e capturada através de microcâmara Leica DM 5000 B sendo processada por meio do programa analisador de imagens Leica Qwin V3, onde a inflamação foi determinada por meio da quantificação do número de núcleos celulares, marcados em azul, presentes no campo de área correspondente a 74966,8 μm^2 27
- Figura 5** – Fotomicrografias do infiltrado inflamatório no coração dos camundongos infectados via intraperitoneal com 5×10^3 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* pré-tratados ou não com inibidores de E-NTPDases 44
- Figura 6** – Fotomicrografias do infiltrado inflamatório no coração dos camundongos infectados via intraperitoneal com 5×10^3 tripomastigotas de cepa Y do *T. cruzi* pré-tratados ou não com inibidores de E-NTPDases 45

Tabela 1 – Resumo das características biológicas dos grupos inoculados com parasitos pré-tratados com diferentes concentrações do inibidor Suramina. Parâmetros analisados: Períodos pré-patente (PPP), Período patente (PP) e Pico de Parasitemia..... 33

Tabela 2 – Resumo das características biológicas dos grupos inoculados com parasitos pré-tratados com diferentes concentrações do inibidor $GdCl_3$. Parâmetros analisados: Períodos Pré-Patente (PPP), Período Patente (PP) e Pico de Parasitemia..... 36

Tabela 3 – Resumo das características biológicas dos grupos inoculados com parasitos pré-tratados com diferentes concentrações do inibidor ARL 67156. Parâmetros analisados: Períodos Pré-Patente (PPP), Período Patente (PP) e Pico de Parasitemia..... 38

Tabela 4 – Resumo dos parâmetros avaliados, nos grupos tratados com os inibidores Suramina, $GdCl_3$ e ARL 67156 em relação ao grupo controle infectado..... 49

1. INTRODUÇÃO

1.1 – A Doença de Chagas

A Doença de Chagas é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário hemoflagelado da Ordem Kinetoplastidea, Família Trypanosomatidae. A infecção chagásica abrange desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina, sendo uma das doenças parasitárias com maior impacto social e econômico na América Latina. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que existam cerca de 13 milhões de indivíduos infectados pelo parasito nas Américas Central e do Sul, com incidência anual de 200.000 novos casos (WHO, 2005).

O ciclo de vida do parasito se alterna em diferentes hospedeiros: vertebrados de diversas ordens e invertebrados pertencentes à família Reduviidae, subfamília Triatominae. Durante o seu desenvolvimento, o parasito possui três formas evolutivas principais: a forma **amastigota**, encontrada intracelularmente em hospedeiros vertebrados, a forma **tripomastigota**, encontrada no sangue dos hospedeiros vertebrados e no intestino posterior dos triatomíneos, sendo eliminada junto com as fezes/urina; e a forma **epimastigota** encontrada no intestino médio e posterior do inseto vetor.

A infecção do hospedeiro vertebrado se dá através das formas tripomastigotas metacíclicas, presentes nas fezes ou urina de triatomíneos infectados com o parasito. Estes excretas, liberados durante ou logo após o repasto sanguíneo do inseto vetor, entram em contato com superfícies mucosas, conjuntiva e lesões na pele; infectando assim as células destes tecidos. Este mecanismo de transmissão é o de maior importância epidemiológica, seguido da transmissão por transfusões sanguíneas e da transmissão congênita. Além disso, mecanismos alternativos de transmissão do parasito podem ocorrer, tais como, em acidentes de laboratório, transplante de órgãos e a transmissão oral (Dias *et al*, 2006).

Após a infecção, o hospedeiro vertebrado desenvolve a fase aguda da doença, a qual é caracterizada por intenso parasitismo, tanto no sangue periférico quanto nos tecidos. Nesta fase da doença a sintomatologia é ausente ou pouco evidente. Nos casos sintomáticos, podem ser observados os sinais característicos de porta de entrada (Chagoma de inoculação ou Sinal de Romanã), além de febre, edema e enfartamento ganglionar. Casos de miocardite e encefalite podem ocorrer nesta fase da infecção, sendo o último normalmente associado a crianças. Na maioria dos casos de infecção aguda, o parasitismo diminui, os sinais clínicos regredem, e o indivíduo evolui então

para a fase crônica da doença. Nesta fase, o parasitismo é escasso e o indivíduo pode apresentar-se durante muitos anos de sua vida na forma assintomática ou indeterminada da doença; ou ainda, após muitos anos de infecção, vir a desenvolver algumas das formas clínicas (cardíaca, digestiva ou mista), podendo evoluir para a morte.

A doença é caracterizada por alta morbidade e mortalidade, podendo, o indivíduo infectado, apresentar formas graves, tais como, cardiopatia chagásica crônica, megaesôfago e megacólon. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima a incidência de cerca de 14.000 mortes anuais decorrentes dos danos irreversíveis ao coração e ao trato digestivo causados pela doença de Chagas (WHO, 2005).

1.2 – Resposta Imune na Doença de Chagas

A resposta imunológica que se segue à infecção pelo *T. cruzi* é bastante complexa, envolvendo o reconhecimento de antígenos do parasito por uma série de receptores de membrana e a ativação de diferentes tipos celulares (Tarleton, 2007). Ao primeiro sinal de infecção, moléculas derivadas do parasito, tais como as GPI-mucinas, são capazes de estimular a síntese de citocinas pró-inflamatórias, bem como de quimiocinas por macrófagos do hospedeiro (Teixeira *et al*, 2002).

A resposta imune inata é considerada muito importante na indução da resistência ao parasito, nas fases iniciais da infecção. Nesta fase, as células *natural Killer* (NK) são primordiais no controle do parasito através da secreção de INF- γ , citocina esta que irá estimular a síntese de IL-12 por macrófagos e a diferenciação celular para o perfil Th1. Desta forma, as células NK são a primeira fonte de INF- γ , antes mesmo do desenvolvimento de uma resposta mediada por células (Brener & Gazzinelli, 1997).

Os macrófagos são células do sistema fagocitário mononuclear que agem como células efetoras, através da produção de óxido nítrico e intermediários reativos de oxigênio; além disso, produzem citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 e TNF- α , relevantes na ativação celular (Brener & Gazzinelli, 1997; Dutra *et al*, 2005). A atividade dos macrófagos na eliminação do *T. cruzi* é potencializada por algumas citocinas, tais como INF- γ e TNF- α , as quais agem sinergicamente sobre estas células,

estimulando os mecanismos citotóxicos, capazes de reduzir significativamente a replicação do parasito; estabelecendo, desta forma, um perfil de resposta Th1 (Brenner & Gazzinelli, 1997; Teixeira *et al*, 2002).

O INF- γ desempenha um papel relevante durante a infecção pelo *T. cruzi*, estando associado tanto ao controle do parasito quanto aos mecanismos que desencadeiam os fenômenos imunopatológicos da doença de Chagas. A produção exacerbada desta citocina poderá desencadear uma inflamação excessiva resultando em danos teciduais para o hospedeiro (Brenner & Gazzinelli, 1997; Bahia-Oliveira *et al*, 2000; Soares *et al*, 2001; Dutra *et al*, 2005).

Diante do papel dual do INF- γ , as citocinas do tipo Th2, irão contribuir para regulação da resposta imune frente à infecção, reduzindo, desta forma, os danos teciduais induzidos pelo processo inflamatório. As citocinas IL-10 e IL-4 são citocinas reguladoras que possuem funções imunossupressoras, agindo através da inibição da ativação de macrófagos e da síntese de oxido nítrico por estas células (Dutra *et al*, 2005).

Utilizando camundongos Knock-out (KO) para IL-10, Abrahamsohn & Coffman, 1996 demonstraram que, quando infectados pelo *T. cruzi*, estes apresentavam baixa parasitemia nas fases iniciais da infecção; provavelmente devido à ação de citocinas inflamatórias, como INF- γ , IL-12 e TNF- α . Demonstrando, desta forma o papel regulador da IL-10.

Portanto, é possível que o balanço entre as respostas Th1 e Th2 seja necessário para determinar o curso da infecção pelo *T. cruzi*, de forma que uma alteração neste equilíbrio poderá contribuir para o desenvolvimento dos fenômenos imunopatológicos da doença de Chagas.

Muitos estudos têm sido realizados para verificar a importância da resposta celular na doença de Chagas. As células T tem sido associadas a reatividade imune contra o parasito, compreendendo a maioria das células do infiltrado inflamatório de pacientes chagásicos cardíacos (Dutra *et al*, 2005).

As células T CD4⁺ Th1, são responsáveis pela produção de citocinas que irão auxiliar os macrófagos na destruição do parasito (DosReis, 1997). Estas células podem contribuir como a maior fonte de INF- γ para a ativação de macrófagos e linfócitos T CD8⁺, o qual exerce um importante papel nos mecanismos de citotoxicidade (Brener & Gazzinelli, 1997).

As células T CD8⁺, além de exercerem um papel citotóxico contra células do hospedeiro, têm sido consideradas importantes em mecanismos protetores, principalmente na fase aguda da infecção; na qual, juntamente com macrófagos e INF- γ , têm sido apresentadas como elementos no controle da proliferação do parasito (Brener & Gazzinelli, 1997). Os linfócitos TCD8⁺ têm sido associados à imunopatologia da doença de Chagas, já que representam a maioria das células do infiltrado inflamatório cardíaco, observada nos estágios tardios da doença (Brener & Gazzinelli, 1997).

Diante do exposto, a compreensão da formação da resposta imune do hospedeiro frente à infecção pelo *T. cruzi*, pode nos fornecer subsídios para se avaliar os mecanismos de escape do parasito, bem como a utilização de moléculas específicas deste nos mecanismos de infecção/virulência; visando a busca por alvos para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos.

1.3 – Tratamento da Doença de Chagas

Muitos esforços têm sido realizados desde a descoberta da Doença de Chagas, no sentido de se encontrar uma droga eficaz na cura desta moléstia, tanto em indivíduos com a doença aguda, quanto nos casos crônicos. Diversos compostos foram testados ao longo dos anos e muitos resultados controversos foram obtidos (Brener *et al*, 1984; Coura *et al*, 2002; Urbina *et al*, 2003).

Desde a década de 70, dois nitrofuranos vêm sendo utilizados: Nifurtimox e Benzonidazol, estas fármacos apresentaram uma resposta efetiva para o tratamento de infecções agudas, entretanto mostraram baixos índices de cura na fase crônica da infecção. Associado à baixa eficácia destes medicamentos, a alta toxicidade e os efeitos colaterais tornam a utilização destes muito restrita; inviabilizando muitas vezes a continuidade do tratamento (Brener *et al*, 1984; Coura *et al*, 2002; Jannin *et al*, 2007;

Guedes *et al*, 2006). Portanto, existe a necessidade contínua de se conhecer e buscar novos medicamentos mais eficazes, visando o desenvolvimento de uma abordagem mais racional para a quimioterapia da Doença de Chagas.

A busca por alvos mais específicos, baseadas em diferenças fisiológicas, bioquímicas e moleculares entre o parasito e o hospedeiro nos permitirá o *design* racional de novas drogas e o uso mais específico de medicamentos já existentes (Guedes *et al.*, 2006). Neste contexto, moléculas envolvidas nos mecanismos de infecção e virulência, nas vias metabólicas essenciais ao parasito, podem ser consideradas alvos promissores.

Neste contexto, estudos visando aprofundar o conhecimento da biologia/bioquímica do *T. cruzi* têm nos permitido a identificação de vias metabólicas essenciais à sobrevivência do parasito e de alvos específicos associados à infectividade/virulência dos mesmos. Diferentes vias e alvos bioquímicos têm sido estudados, tais como, o metabolismo do ergosterol, as cisteíno-proteínases, as tripanotona redutases, as pirofosfatases e a via de salvação de purinas, onde postula-se a participação das ectonucleotidases como fator de virulência, dentre outros (Coura *et al*, 2002; Urbina *et al*, 2003; Guedes *et al*, 2006).

A cruzipaína é uma cisteíno-proteinase responsável pela maior atividade proteolítica em todas as fases do ciclo de vida do *T. cruzi*, desempenhando papel essencial na sobrevivência e crescimento deste parasito. Vários inibidores de cruzipaína vêm sendo testados, tais como os diazometanos e halometil cetonas, entretanto estes compostos apresentam alta reatividade e pouca seletividade, sendo tóxicos para as células do hospedeiro.

Du *et al*, 2002 sintetizaram moléculas de baixo peso molecular com atividade inibitória da cruzipaína, os Tio Semicarbazona e verificaram que tais compostos possuíam atividade tripanocida, além de serem capazes de aumentar a sobrevivência de macrófagos infectados pelo *T. cruzi*. Mais tarde, Fujji *et al*, 2005 verificaram que os Tio Semicarbazona além de inibirem a atividade da cruzipaína no *T. cruzi* apresentavam efeito sobre a rodesaína, uma cisteíno-proteinase expressa em *T. brucei rhodesiense*. Entretanto, neste mesmo trabalho, eles observaram que estes compostos tiveram uma atividade modesta com relação à inibição da proliferação do *T. cruzi*. Estes trabalhos evidenciam o papel importante da cruzipaína na sobrevivência do parasito e sugerem

esta enzima como possível alvo para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas.

Vias essenciais ao *T. cruzi* tem sido estudadas no intuito de se descobrir possíveis alvos de intervenção, levando-se em consideração principalmente diferenças entre o hospedeiro vertebrado e o parasito.

O inositol é uma molécula essencial para o crescimento de animais e microorganismos, incluindo os tripanosomatídeos. Nestes organismos, esta molécula é normalmente encontrada na forma de âncoras de GPI (glicofosfatidilinositol), sendo importante para a modulação de funções vitais, já que desempenha importante papel nas diferentes vias de sinalização destes parasitos (Oliveira *et al*, 2000). Embora âncoras de GPI estejam presentes em muitas proteínas de membrana dos mamíferos, as vias biossintéticas e particularidades desta âncora nos tripanosomatídeos tornam-se consideráveis alvos terapêuticos (Oliveira *et al*, 2000).

Diferenças na via glicolítica dos tripanosomatídeos têm sido estudadas com relação ao desenvolvimento de novos alvos para a quimioterapia. Os tripanosomatídeos, diferentemente dos vertebrados, possuem as enzimas iniciais do metabolismo da glicose localizadas dentro de um compartimento separado, o glicosoma. Esta compartimentalização pode evidenciar diferenças com relação às enzimas citosólicas dos hospedeiros, as quais podem servir de bons alvos para o desenvolvimento de drogas anti-tripanosomatídeos (Opperdoes *et al*, 2001; Verlinde *et al*, 2001).

Sabe-se que alguns parasitos protozoários são incapazes de sintetizar purinas utilizando seus precursores: amino ácidos, ribose, CO₂ e NH₃. Estes parasitos, bem como o *T. cruzi*, utilizam de uma via de salvação de purinas para reciclar bases e nucleotídeos liberados pela degradação de ácidos nucléicos ou os obtém do meio extracelular. Neste sentido, enzimas metabolizadoras de nucleotídeos extracelulares, tais como, as ecto-nucleotidases, são necessárias para que o parasito obtenha moléculas essenciais à sua sobrevivência. Portanto, o estudo de tais enzimas pode nos fornecer importantes avanços para a busca de novos agentes quimioterápicos para o tratamento da doença de Chagas.

1.4 – As Ecto-nucleotidasas

As ecto-nucleotidasas são enzimas integrais de membrana ou solúveis, que incluem membros da família das Ecto-nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase (E-NTPDases), Ecto-nucleotídeo fosfatase/fofodiesterase (E-NPPases), fosfatases alcalinas, 5'-nucleotidasas, dentre outras (Zimmermann, 2000). Os membros da família das E-NTPDases, também conhecidas como apirases ou família CD39, catalizam a hidrólise de nucleotídeos trifosfatados ou ambos nucleotídeos di e trifosfatados, e compartilham 5 domínios altamente conservados, denominados Apyrase Conserved Regions (ACRs), provavelmente ligados à atividade catalítica. Sua atividade é dependente de cátions divalentes, como o cálcio e o magnésio. Membros da família das E-NTPDases estão presentes em vertebrados, invertebrados, plantas e protozoários (Zimmermann, 1999; Zimmermann, 2000). Mais recentemente foi descrita também em um procarioto, *Legionella pneumophila*, agente causador de uma forma severa da pneumonia (Sansom *et al*, 2007).

A família das E-NTPDases pode ser dividida em dois grupos, de acordo com a sua topografia de membrana. O primeiro grupo é composto pelos membros que possuem dois domínios transmembrana, nas regiões amino e carboxi-terminal, compreendendo as isoformas humanas NTPDase 1 a 4. Estes membros diferem entre si pelas suas propriedades catalíticas, evidenciadas pelas diferentes razões de hidrólise ATP/ADP e pela preferência por diferentes nucleotídeos. O segundo grupo é composto pela NTPDase 5 e possivelmente uma isoforma NTPDase 6, estes membros possuem somente o domínio transmembrana na região amino terminal, além disso possuem um sítio de clivagem próximo a esta região, resultando em uma forma solúvel ou secretada desta enzima (Zimmermann, 2000).

O papel das ecto-nucleotidasas é ainda pouco entendido. Alguns trabalhos sugerem sua participação na modulação de processos inflamatórios e na resposta imune, através da regulação da concentração dos nucleotídeos extracelulares (Kannan *et al*, 2002; Langston *et al*, 2003; Leal *et al*, 2005; Atkinson *et al*, 2006; Bours *et al*, 2006); na adesão, infectividade, virulência e sobrevivência de parasitos (Nakaar *et al*, 1998; Berredo-Pinho *et al*, 2001; Asai *et al*, 2002; Bissagio *et al*, 2003; Fietto *et al*, 2004; Pinheiro *et al*, 2006), na resistência a xenobióticos (Thomas *et al*, 2000).

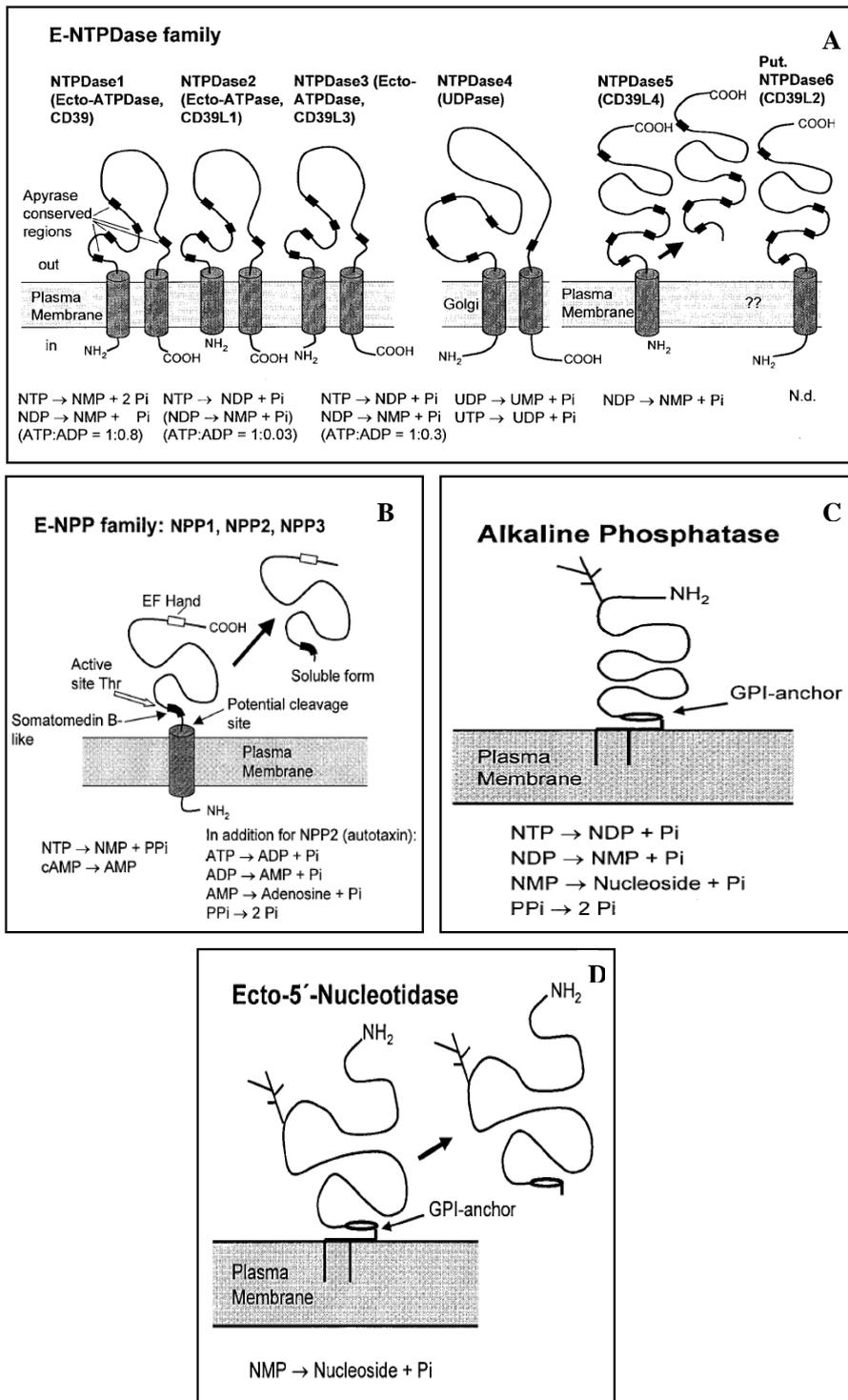


Figura 1 – Topografia de membrana e propriedades catalíticas das diferentes famílias de Ecto-nucleotidas. (A) Família E-NTPDase (B) Família E-NPP (C) Família das Fosfatases Alcalinas (D) Família Ecto- 5'-nucleotidase (Zimmermann, 2000).

1.5 – Os nucleotídeos extracelulares e suas funções biológicas

O ATP e seus produtos de degradação ADP e AMP são componentes normais do meio extracelular, encontrando-se em baixas concentrações neste compartimento, não atravessam a membrana plasmática e irão mediar ações biológicas através da ligação a moléculas específicas na superfície celular; os chamados receptores purinérgicos. Estes receptores são amplamente distribuídos pelos tecidos do corpo, sendo expressos em uma variedade de células [do sistema](#) imune e não-imune (Bours *et al*, 2006).

Os receptores purinérgicos são divididos em duas grandes famílias: nomeadas receptores P1 e P2, os quais se ligam a adenosina (Ado) e nucleotídeos (ATP, ADP, UDP), respectivamente. Os receptores P1 possuem sete domínios transmembrana e são subdivididos em quatro grupos: A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃; os quais são acoplados à proteína G e ligam a Ado com diferentes afinidades (Yegutkin, 2008).

Os receptores do tipo P2 são distribuídos em duas classes distintas: P2Y e P2X. Os primeiros são receptores acoplados a proteína G e os últimos são receptores formadores de canais iônicos. A família de receptores P2Y é composta por 8 subtipos de receptores, os quais são caracterizados por possuírem uma região N-terminal extracelular e a porção C-terminal intracelular, 7 regiões transmembrana; uma diversidade dos *loops* intracelulares e a porção C-terminal que influencia no grau de acoplamento à proteína G. Os membros da família de receptores P2X possuem porções N e C-terminal intracelulares, duas regiões transmembrana (TM1 e TM2) e grandes *loops* extracelulares (Burnstock G, 2006). Agonistas e antagonistas destes receptores têm sido utilizados para avaliar o papel dos nucleotídeos extracelulares em determinados efeitos biológicos.

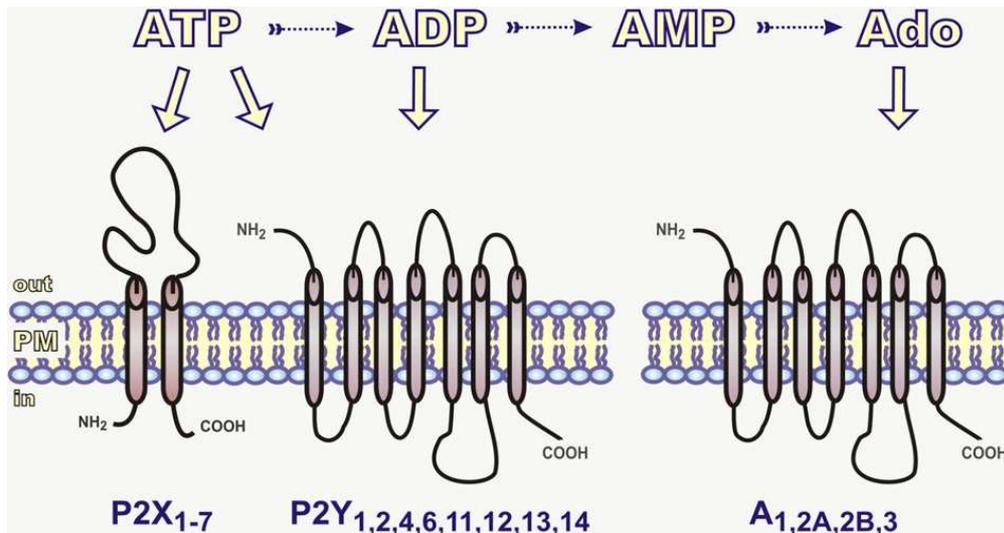


Figura 2 - Diagrama topológico de Purinoreceptores. Nucleotídeos medeiam efeitos biológicos através de uma série de receptores, os quais são classificados por sua afinidade por ATP, ADP e outros nucleotídeos. A Ado gerada age via quatro grupos de receptores seletivos acoplados a proteína G (Yegutkin, 2008).

A importância biológica dos nucleotídeos extracelulares vem sendo demonstrada em diversos [estudos](#). Vários papéis são atribuídos aos nucleotídeos extracelulares, dentre eles, modulação da resposta inflamatória (Kannan *et al*, 2002), ativação da agregação plaquetária e formação de trombos (Atkinson *et al*, 2006), ativação e inibição da secreção de determinadas citocinas (Langston *et al*, 2003;), ativação de linfócitos (Duhant *et al*, 2002), dentre outros.

O ATP e a Ado extracelulares, desempenham um papel fundamental na modulação da imunidade e de mecanismos inflamatórios. A ação destes nucleotídeos irá depender da expressão dos receptores purinérgicos nas células que são essenciais a este tipo de resposta e da concentração dos nucleotídeos no compartimento extracelular, a qual pode variar de acordo com as condições do meio (inflamação, hipoxia e isquemia). A concentração dos nucleotídeos pode ser regulada por enzimas responsáveis por sua conversão: as **ecto-nucleotidases**; as quais também podem ser expressas em células imunes, sugerindo que a função destas células possa ser regulada via sinalização purinérgica (Bours *et al*, 2006).

O ATP_e é uma molécula conhecida por estimular mecanismos inflamatórios, através de sua ligação a receptores do tipo P2, agindo sobre diferentes células do sistema imune (Bours *et al*, 2006). O ATP_e age estimulando a migração de células inflamatórias para o sítio de infecção, aumentando a adesão e permeabilidade ao endotélio e estimulando a secreção de quimiocinas. Além disso, ativa os mecanismos efetores destas células, tais como degranulação de neutrófilos, produção de NO e explosão respiratória nos macrófagos; dentre outros. Já a Ado_e age de forma antagônica ao ATP_e, estimulando mecanismos anti-inflamatórios, via receptores P1, inibindo a ativação de mecanismos efetores nas células imunes (Bours *et al*, 2006).

Os monócitos/macrófagos são as principais componentes da inflamação crônica, quando expostos ao ATP_e exercem atividade citotóxica e inflamatória; com aumento da produção de óxido nítrico e das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-18, INF- γ . Sob ação da Ado_e os macrófagos exercem função imunossupressora e anti-inflamatória, este nucleotídeo estimula a produção de IL-10, citocina que irá inibir a ativação de macrófagos (Bours *et al*, 2006). Além disso, a adenosina extracelular (Ado_e) previne o acúmulo excessivo de monócitos/macrófagos nos tecidos inflamados, reduzindo o dano tecidual.

Os linfócitos são células centrais para a resposta humoral e celular, expressam alguns subtipos de receptores P1 e P2, portanto, sua função pode ser regulada pelos nucleotídeos extracelulares. O ATP_e tem sido relacionado à ativação e proliferação de linfócitos T e B, bem como sua migração e permeabilização para o sítio de infecção. Além disso, é capaz de induzir a morte celular programada destas células após a eliminação do patógeno. A Ado_e além de inibir a migração das células T para o sítio de infecção, atenua a resposta proliferativa dos linfócitos T e B (Bours *et al*, 2006).

Barradas *et al*, 2003, analisando camundongos na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, demonstraram que o ATP_e induz morte celular de timócitos, através da permeabilização da membrana plasmática. Este trabalho também demonstrou que a infecção pelo *T. cruzi* aumenta a sensibilidade dos timócitos ao ATP_e, conseqüentemente aumentando a permeabilidade e a diminuição da viabilidade celular; e sugere que este fato seja responsável pela atrofia do timo verificada na fase aguda da infecção.

Portanto, a regulação da resposta imunológica e inflamação, via sinalização purinérgica, é bastante complexa; dependente de diversos fatores, sendo os principais: a expressão dos receptores na superfície das células imunes e a regulação da concentração destes nucleotídeos no compartimento extracelular, através de sua hidrólise realizada pelas ecto-nucleotidases. Logo, estas enzimas também exercem um papel importante na modulação da resposta imune e podem ser utilizadas por parasitos como mecanismo de infecção/virulência e sobrevivência dos mesmos; como vem sendo demonstrado em diversos trabalhos (Nakaar *et al*, 1998; Barros *et al*, 2000; Berredo-Pinho *et al*, 2001; Matos *et al*, 2001; Asai *et al*, 2002; Meyer-Fernandes *et al*, 2003; Fietto *et al*, 2004; Sissons *et al*, 2004; Pinheiro *et al*, 2006).

1.6 – Inibidores de E-NTPDases

Diante da importância biológica das ecto-nucleotidases na regulação da concentração dos nucleotídeos no meio extracelular; alguns grupos têm utilizados inibidores para as diferentes famílias destas enzimas; com a finalidade de determinar o papel das mesmas na modulação de respostas biológicas dependentes de nucleotídeos extracelulares.

Inibidores da família das E-NTPDases vem sendo utilizados em trabalhos prévios do nosso grupo, visando avaliar o papel desta família de ecto-nucleotidases na infecção *in vitro* pelo *T. cruzi* (Santos *et al*, 2008). Para a realização deste estudo três inibidores foram utilizados, a Suramina, o Cloreto de Gadolínio ($GdCl_3$) e o 6-N, N-dietil-D- β , γ -dibromometileno ATP (ARL 67156).

A suramina já tem sido usada na prática médica para o tratamento de algumas doenças. Alguns trabalhos têm demonstrado um efeito promissor da suramina no controle da filariose (Korten *et al*, 2008), no tratamento do câncer, já que possui atividade anti-neoplásica (Rebolo, 1994; Bhargava *et al*, 2007); e no tratamento da tripanossomíase americana. Neste último, a suramina tem sido utilizada em associação com outros fármacos, permitindo a diminuição da dose utilizada em monoterapias (Jennings *et al*, 2002; Amin *et al*, 2008).

O $GdCl_3$ é utilizado na prática médica em líquidos de produção de contraste para exames de tomografia computadorizada; entretanto neste contexto, o composto não é utilizado de forma livre (íon) como foi usado neste projeto.

Já o inibidor ARL 67156 é um análogo sintético do ATP e tem mostrado resultados interessantes no que diz respeito à inibição da atividade ATPase/ADPase na superfície do *T. cruzi*, bem como no bloqueio da infecção *in vitro* por este parasito (Santos *et al*, 2008).

1.7 - As Ecto-nucleotidases e parasitos

As ecto-nucleotidases vêm sendo descritas em vários parasitos, dentre eles, *Toxoplasma gondii* (Nakaar *et al*, 1998; Asai *et al*, 2002), *Leishmania amazonensis* (Berredo-Pinho *et al*, 2001; Pinheiro *et al*, 2006), *T. cruzi* (Fietto *et al*, 2004; Meyer-Fernandes *et al*, 2003), *Acanthamoeba* (Sissons *et al*, 2004), *Trichomonas vaginalis* (Matos *et al*, 2001), *Tritrichomonas foetus* (Jesus *et al*, 2002), *Entamoeba histolytica* (Barros *et al*, 2000) e *Schistosoma mansoni* (Vasconcelos *et al*, 1996). Estes [estudos](#) vêm demonstrando uma correlação entre capacidade de hidrólise de nucleotídeos extracelulares por parasitos e mecanismos de virulência, sobrevivência e adesão celular.

A primeira E-NTPDase descrita em um endoparasito foi a de *T. gondii* (Asai *et al*, 1983). Neste parasito, a apirase é secretada na forma de grânulos densos dentro do vacúolo parasitóforo. Nakkar *et al*, 1998 demonstraram a presença de isoformas da NTPDase em diferentes cepas do *T. gondii*, correlacionando a presença das isoformas NTPDase I e III à cepas virulentas e a presença somente da NTPDase I nas cepas avirulentas; verificando que nestas últimas, faltava o gene codificante da isoforma III. Em 2002, Asai *et al* verificaram uma correlação entre a inibição da atividade enzimática da NTPDase de *T. gondii* e a inibição da replicação, sugerindo então o papel desta enzima nos mecanismos de sobrevivência deste parasito.

Duas isoformas desta enzima foram identificadas também em *S. mansoni* (Vasconcelos *et al*, 1996). Estas isoformas apresentam atividade catalítica distinta e podem estar relacionadas à evasão do sistema imune pelo parasito, através da inibição de mecanismos citolíticos do hospedeiro (DeMarco *et al*, 2003; Levano-Garcia *et al*, 2007).

A presença de uma atividade ATPásica diferenciada foi descrita para espécies de *Entamoeba*. Barros *et al*, 2000 demonstraram que espécies de *Entamoeba* patogênicas são mais eficientes na hidrólise de ATP_e, quando comparada a espécies não invasivas ou de vida livre. Neste trabalho, foi demonstrado que na presença de galactose, molécula esta importante nos mecanismos de invasão das espécies patogênicas, a atividade ATPásica dependente de Mg²⁺ foi aumentada, sugerindo então, a participação desta enzima nos mecanismos de virulência deste parasito.

Sisons *et al*, 2004 também verificaram que isolados patogênicos de *Acanthamoeba* apresentavam atividades ATPásicas distintas quando comparados a isolados não infectivos, verificando também que na presença de um açúcar essencial nos mecanismos de interação parasito-hospederio, a manose, ocorria um aumento da atividade enzimática.

A presença de ecto-nucleotidases também vem sendo descrita para algumas espécies de *Leishmania*. Berredo-Pinho *et al*, 2001 caracterizaram a presença de uma ecto-ATPase, dependente de Mg²⁺, na superfície externa de *L. amazonensis*. Neste trabalho foi verificada uma atividade cerca de duas vezes maior em promastigotas virulentas de *L. amazonensis* quando comparado a promastigotas avirulentas; sugerindo a presença de uma atividade ecto-ATPásica como marcador de virulência deste parasito.

Mais tarde, Pinheiro *et al*, 2006, analisando a cepa Josefa da *L. amazonensis*, verificaram que a enzima encontrava-se distribuída irregularmente na superfície do parasito. Este mesmo grupo demonstrou um aumento na atividade NTPDase durante a fase de crescimento logarítmico do parasito, sugerindo que esta atividade aumentada esteja associada ao requerimento do parasito de nutrientes para os eventos sintéticos do ciclo celular. Além disso, foi observado que as formas amastigotas possuem uma atividade exacerbadamente maior que as formas promastigotas, evidenciando a possível participação das E-NTPDases nos mecanismos de escape do parasito, bem como na proliferação celular, já que provê requerimento nutricional para as formas amastigotas localizadas no interior dos macrófagos.

Fietto *et al*, 2004, demonstraram a presença de NTPDases na superfície externa das diferentes formas evolutivas do *T. cruzi* (cepa Y) e verificaram a hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados, sugerindo a possível participação destas enzimas na via de salvação de purinas, bem como em mecanismos de virulência do parasito e escape do sistema imune relacionados a hidrólise de ATP extracelular. Neste trabalho foi isolado e caracterizado um gene da família da E-NTPDases, que foi denominado NTPDase-I. Por

similaridade de sequência foi encontrada a presença de duas isoformas destes genes no genoma de *L. major* e *Trypanosoma brucei*, porém para *T. cruzi*, somente um gene foi encontrado até o momento.

Bissagio *et al*, 2003 demonstraram que a atividade ATPase é cerca de 20 vezes maior nas formas tripomastigotas infectivas do *T. cruzi*, quando comparado com as epimastigotas. Este grupo verificou também que a inibição da atividade ecto-ATPase pela Suramina ou 4,4'-diisothiocyanatetilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) resultou na inibição da adesão e internalização dos parasitos, bem como na inibição do crescimento das formas epimastigotas em meio LIT; sugerindo desta forma, o papel das ecto-nucleotidases do *T. cruzi* nos mecanismos de infecção (adesão/internalização), virulência e crescimento celular.

Estes trabalhos nos apresentam dados que fortemente sugerem uma correlação entre a presença [do gene específico](#), expressão e/ou atividade ecto-nucleotidásica com mecanismos de virulência e sobrevivência do parasito. Portanto, uma vez descrita a presença de uma atividade NTPDase dependente de Mg^{2+} em *T. cruzi* (Fietto *et al*, 2004; Meyer-Fernandes *et al*, 2004), estudos mais aprofundados evidenciando a participação desta enzima nos processos de infectividade, virulência e sobrevivência do parasito se fazem necessários.

Em trabalho recente de nosso grupo foi demonstrado que a atividade E-NTPDásica é importante para a infecção em sistema de cultivo em células de mamífero, evidenciada tanto pela perda da capacidade infectiva do parasito, quanto pela diminuição de sua atividade ecto-nucleotidásica em diferentes passagens celulares. Santos e colaboradores (2008) verificaram que a ação dos inibidores de E-NTPDases Suramina, Gadolínio ($GdCl_3$) e 6-N, N-dietil-D- β , γ -dibromometileno ATP (ARL67156) sobre o parasito levou a uma diminuição dose dependente das atividades ecto-ATPásica e ADPásica. Além disto, quando parasitos pré-tratados com os inibidores foram usados na infecção *in vitro* houve significativa diminuição da capacidade infectiva dos mesmos.

Baseado nestes dados prévios, que indicam a participação das E-NTPDases na infecção *in vitro*, este trabalho visa elucidar a participação destas enzimas do *T. cruzi* no processo de infecção em modelo animal, bem como sua ligação à modulação do sistema imune do hospedeiro, via hidrólise de nucleotídeos extracelulares. Visando a utilização destas enzimas como novos alvos para o desenvolvimento de quimioterapia racional para a doença de Chagas.

2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a importância da doença de Chagas no continente Americano, a dificuldade de se obter fármacos mais específicos, com altas taxas de cura na fase crônica e a necessidade de conhecermos mais sobre os processos de interação parasito-hospedeiro; este trabalho se justifica pela necessidade de descobrirmos novas vias metabólicas importantes para a sobrevivência do *T. cruzi* e sua interação com o hospedeiro, levando a descoberta de possíveis alvos para intervenção através de uma quimioterapia mais específica para a Doença de Chagas.

Uma vez descrita e caracterizada a atividade ecto-nucleotidásica na superfície do *T. cruzi* (Fietto *et al*, 2004), nos propomos a avaliar o papel destas enzimas, nos processos de infecção e virulência do parasito.

Dados obtidos por Santos, 2008; em nosso laboratório, demonstram que cepas do *T. cruzi* com diferentes graus de virulência apresentam atividade NTPDásica diferenciada. Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que passagens sucessivas por cultura celular resultam em uma perda da capacidade infectiva do parasito, bem como de sua atividade ecto-nucleotidásica; evidenciando uma correlação entre a hidrólise de nucleotídeos extracelulares e a infectividade/virulência do parasito.

Desta forma, o presente estudo visa aprofundar o conhecimento do papel das ecto-nucleotidases, mais especificamente da NTPDase do *T. cruzi*, nestes processos; utilizando a infecção experimental de camundongos Swiss com parasitos pré-tratados com inibidores de E-NTPDases, para elucidar possíveis interferências na resposta do hospedeiro; visando a utilização futura desta via como alvo para o desenvolvimento de uma quimioterapia mais racional para a doença de Chagas.

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral:

Avaliar o papel de E-NTPDases do *T. cruzi*, através da utilização de inibidores específicos, na infecção de camundongos Swiss.

3.2 - Objetivos Específicos:

1. Avaliar a influência de diferentes concentrações dos inibidores (Suramina, Gadolínio e ARL 67156) no curso da infecção pelo *T. cruzi*, em camundongos Swiss, com relação aos seguintes parâmetros:
 - Infectividade
 - Curva de parasitemia
 - Mortalidade

2. Determinar a expressão do mRNA para as citocinas INF- γ e IL-10 no coração dos camundongos;

3. Determinar os níveis séricos das citocinas INF- γ e IL-10;

4. Quantificar o processo inflamatório no coração de camundongos, durante o curso da infecção.

4. ANIMAL, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Cepa do *Trypanosoma cruzi*

A cepa do *T. cruzi* utilizada neste trabalho foi a cepa Y, isolada de um indivíduo na fase aguda da infecção, por Pereira de Freitas em 1950, Marília, SP (Freitas *et al.*, 1953) e, posteriormente estudada e descrita por Silva & Nussenzweig (1953). Trata-se de uma cepa pertencente à linhagem genética *T. cruzi* II, encontrada normalmente no ciclo doméstico da doença de Chagas.

4.2 – Animais

Foram utilizados neste estudo 120 camundongos Swiss machos com 30 dias de idade e peso variando de 18 a 20 g. Estes animais foram criados e mantidos no Biotério Central da Universidade Federal de Ouro Preto.

Na primeira parte do trabalho, os animais foram alocados em grupos de 10 camundongos, para a avaliação da curva de parasitemia e mortalidade. Posteriormente, para a realização das necropsias, os camundongos foram agrupados em número de 12 e divididos em 2 caixas para melhor acomodação dos animais.

4.3 – Obtenção das formas tripomastigotas de cultura celular *in vitro*

A linhagem de células VERO foi cultivada em garrafas de 75cm² em uma densidade de 5×10^4 células e mantidas em meio RPMI 1640 (Gibco BRL) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB, da CULTILAB, Campinas, SP, Brasil) e 1mM de L-glutamina (Sigma Aldrich). Após cultivo por 48 horas, as culturas foram infectadas com tripomastigotas sanguíneos coletados de camundongos Swiss infectados pela cepa Y do *T. cruzi*, no dia do pico de parasitemia; empregando uma taxa de 10 parasitos para cada célula. Após infecção, as culturas foram mantidas a 37° C em atmosfera de 5% CO₂ durante 24 horas, para a internalização dos parasitos. Posteriormente, o meio suplementado com 5% de SFB foi removido e as células lavadas com salina tamponada (PBS) por três vezes; sendo então adicionado novo meio RPMI 1% SFB; precedido com incubação à 33° C, 5% CO₂, para completa diferenciação dos parasitos. Os tripomastigotas derivados de cultura de células VERO foram isolados do

sobrenadante por centrifugação a 2500g por 5 minutos; para posterior realização dos experimentos.

4.4 - Infecção experimental em camundongos

Camundongos Swiss com aproximadamente 30 dias de idade foram infectados via intraperitoneal com 5×10^3 formas tripomastigotas da cepa Y do *T.cruzi*, derivadas de cultura celular, pré-tratados ou não com inibidores da apirase (Suramina, Gadolínio e ARL 67156).

O pré-tratamento foi realizado da seguinte forma: parasitos derivados de 1º passagem em cultura celular foram coletados do sobrenadante, centrifugados, ressuspensos em meio MEM 1% SFB. Os parasitos foram então, incubados com os inibidores de ecto-nucleotidases em concentrações variadas, por 10 minutos, em uma concentração de 2×10^5 parasitos/ml; posteriormente, foram centrifugados à 1540g por 15 minutos; o sobrenadante foi descartado para a retirada do meio contendo o inibidor e os parasitos ressuspensos em meio MEM 1% SFB sem inibidores. A concentração dos parasitos foi acertada para 1×10^5 parasitos/ml de forma que 50 µl (correspondente a 5×10^3 parasitos/ml) foram inoculados em camundongos Swiss, via intraperitoneal.

É importante ressaltar que a viabilidade dos parasitos foi avaliada, através da observação da movimentação dos parasitos, bem como da contagem em Câmara de Neubauer, após a incubação com os diferentes inibidores.

Foram analisados parâmetros relacionados à infectividade, curva de parasitemia, mortalidade, parasitismo tecidual e resposta imune.

4.4.1 - Infectividade

A infectividade foi avaliada através da observação de parasitos no exame a fresco do sangue periférico dos camundongos; determinando-se os períodos pré-patentes e patentes da infecção, em cada grupo experimental.

4.4.2 - Parasitemia

Excluído: ¶

A avaliação das curvas de parasitemia foi realizada através do exame a fresco do sangue periférico dos camundongos. Para isto, foram coletados 5 µl de sangue da veia caudal do camundongo, este sangue foi colocado entre lâmina e lamínula, e os parasitos quantificados segundo a técnica de Brener, 1962.

A contagem dos parasitos teve início no 4^o dia após a inoculação e foi avaliada diariamente, até que não se observasse mais parasitos no exame de sangue a fresco, durante cinco dias consecutivos ou até a morte dos camundongos.

As curvas de parasitemia representam as médias diárias dos parasitos observados no sangue periférico dos camundongos de cada grupo experimental.

4.4.3 - Mortalidade

A mortalidade foi detectada através da observação do número de camundongos mortos por grupo experimental, durante um período de 40 dias de infecção.

Formatados: Marcadores e numeração

4.5 – Necropsias

Grupos de três camundongos foram eutanaziados no 8^o, 15^o e 30^o dia após infecção, sendo coletados coração, baço e fígado. Estes fragmentos foram lavados em tampão fosfato (PBS pH 7,2), secos em papel de filtro e congelados a -70°C, na presença de solução desnaturante do *kit RNAgentes® Total RNA Isolation System* (Catalog: Z5110, Promega, USA) para posterior extração de RNAt (RNA total) ou fixados em formol 10% tamponado pH 7,2; para posterior processamento histológico.

4.6 - **Expressão** do mRNA para citocinas in situ por RT-PCR

A análise semi-quantitativa da expressão do mRNA (RNA mensageiro) para as citocinas INF- γ e IL-10 foi realizada pela técnica de RT-PCR *in situ*, usando fragmentos do tecido do coração dos animais controle não infectados, controle infectados (cepa Y) e dos animais inoculados com parasitos da cepa Y pré-tratados com os inibidores Suramina, Gadolínio e ARL.

Para a realização desta técnica foram coletados fragmentos de aproximadamente 50mg do coração, colocados em tubo *ependorf* de 1,5ml contendo 300 μ l de solução desnaturante do kit *RNAgentes® Total RNA Isolation System (Catalog: Z5110, Promega, USA)* e mantidos a -70°C até o momento da extração do RNAt.

Excluído: de

Excluído: e baço

Excluído: e baço

4.6.1 - Extração de RNA

O RNA foi extraído dos tecidos usando o *kit RNAgentes® Total RNA Isolation System (Catalog: Z5110, Promega, USA)*.

Os tecidos foram macerados com auxílio de maceradores de teflon, posteriormente foram adicionados 30 μ l de acetato de sódio 2M (pH 4,0) e 300 μ l de fenol/clorofórmio, os tubos foram homogeneizados em vórtex durante 10 segundos e mantidos em gelo por 15 min. Posteriormente, centrifugados a $10.000 \times g$ por 20 min a 4°C e a fase aquosa na qual o RNAt estava contido foi removida cuidadosamente, com auxílio de pipeta, para que não houvesse contaminação com o DNA genômico e as proteínas presentes na fase orgânica inferior e na interface. O volume de RNAt foi medido e transferido para outro tubo *ependorf* de 1,5ml.

Para a precipitação do RNAt foi adicionado o mesmo volume de isopropanol, homogeneizados em vórtex, incubados em gelo por 30 min e posteriormente centrifugados a $10.000 \times g$ por 10 min a 4°C . A seguir, o sobrenadante foi descartado e o RNAt contido no sedimento foi lavado com 200 μ l de etanol 75%, homogeneizado com o auxílio de uma pipeta e centrifugado a $7.500 \times g$ por 5 min a 4°C . Após a lavagem do RNAt, o sobrenadante foi descartado e o sedimento submetido à secagem ao ar durante aproximadamente 30 min. Após a secagem, o precipitado foi então dissolvido em 20 μ l de água livre de RNase e os tubos incubados a $55-60^{\circ}\text{C}$ para dissolução do RNAt.

Para a dosagem do RNAt, 2µl da amostra foram diluídos em 58µl de água livre de RNase e realizadas leituras de absorbância em espectrofotômetro com luz UV utilizando filtros de 260nm e 280nm. As amostras foram consideradas com um bom grau de pureza e utilizadas quando a relação das leituras de absorbância a 260/280nm foram superiores a 1,8. O RNAt foi quantificado utilizando a seguinte fórmula:

$$[\text{RNA}] (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{\text{absorbância } 260\text{nm} \times 40 \times \text{diluição da amostra de RNA}}{1000}$$

As amostras foram diluídas em água livre de RNase e suas concentrações ajustadas para 1µg/µL, acondicionadas a -70°C até a realização da transcrição reversa.

4.6.2 - Síntese de cDNA

Antes da realização da síntese de cDNA as amostras foram tratadas com DNase (*Catalog M6101, Promega, USA*). Para isto, foram adicionados aos microtubos plásticos *ependorf* 3µl de água livre de RNase; 0,5µl do tampão da reação 10X; 0,5µl/0,5U DNase; 0,5µl/0,5µg de RNA e incubados a 37°C durante 15 min. Em seguida, a DNase foi inativada acrescentando-se 0,5µl de solução de bloqueio da DNase e as amostras incubadas a 75°C durante 10 min. Posteriormente, as amostras foram resfriadas em gelo durante 5 min; a síntese de cDNA foi iniciada acrescentando-se 0,5µl oligo dT (*Catalog 18418-012, Invitrogen, USA*); 0,5µl mix dNTP 10mM (*Catalog 55082, 55083, 55084, 55085, Invitrogen, USA*). As amostras foram incubadas a 65°C por 5 min, resfriadas em gelo durante 5 min e realizada uma centrifugação rápida. Posteriormente foram adicionados 2µl do tampão primeira fita 5X; 1µl DTT 0,1M e 0,5µl de RNase OUT (*Catalog 10777-019, Invitrogen, USA*), homogeneizados em vórtex por 10 segundos e incubado a 42°C durante 2min. Foram colocados 0,5µl de transcriptase reversa (*Catalog 18064-014, Invitrogen, USA*) e os tubos incubados a 42°C durante 1h para a síntese do cDNA. Em seguida, a transcriptase reversa foi inativada com incubação a 70°C durante 15 min. O cDNA foi estocado a -20°C.

4.6.3 - Realização da PCR e quantificação de citocinas

A PCR de HPRT (Hipoxantina Ribosil Transferase) foi realizada utilizando-se 2µl da solução de cDNA de cada amostra; 0,3µl de MgCl₂ 50mM (Catálogo 11615-010, Invitrogen, Brasil); 1µl tampão 10X (Catálogo 11615-010, Invitrogen, Brasil); 1µl dNTPs 2,5mM (Promega, USA); 0,2µl de Taq DNA polimerase 5 U/µl (Catálogo 11615-010, Invitrogen, Brasil); 1µl de cada iniciador (senso e anti-senso) na concentração de 20µM e 3,5µl de água livre de RNase perfazendo um volume final de 10µl de reação.

Excluído:

A PCR das citocinas INF-γ e IL-10 foi realizada utilizando-se 2µl da solução de cDNA de cada amostra; 0,3µl de MgCl₂ 50mM (Catálogo 11615-010, Invitrogen, Brasil); 1µl tampão 10X (Catálogo 11615-010, Invitrogen, Brasil); 1µl dNTPs 2,5mM (Promega, USA); 0,1µl de Taq DNA polimerase 5 U/µl (Catálogo 11615-010, Invitrogen, Brasil); 0,5µl de cada iniciador (direto e reverso) na concentração de 20µM e 4,6µl de água livre de RNase perfazendo um volume final de 10µl de reação.

Os iniciadores utilizados foram: para HPRT (direto: 5' GTTGGATACAGGCCAAGACTTTGTTG3'), (reverso: 5' GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC 3') gerando um produto de 162pb; INF-γ (direto: 5' AACTGCATCTTGGCTTTGC 3'), (reverso: 5' CTTGCTGTTGCTGAAGAAGG 3') gerando um produto de 309pb; IL-10 (direto: 5' ACCAGCTGGACAACATACTGCT 3'), (reverso: 5' CTTGTAGACACCTTGGTCTTGG 3') gerando um produto de 293pb (Dialab, Brasil). Estes iniciadores anelam-se as regiões específicas do gene da HPRT (controle constitutivo) e das citocinas estudadas (INF-γ e IL-10).

As condições da reação para HPRT foram: desnaturação do DNA a 94° C por 3 min (com etapa inicial mais longa 2 min), anelamento dos iniciadores a 58° por 1 min, extensão a 72°C por 2 min (com etapa final de 7 min). A amplificação foi realizada com 30 ciclos em um termociclador automático (Eppendorf, Master Cycler 5330, USA).

As condições da reação para INF- γ e IL10 foram: desnaturação do DNA a 94° C por 3 min (com etapa inicial mais longa 1 min), anelamento dos iniciadores a 54° por 1 min, extensão a 72°C por 1 min (com etapa final de 7 min). A amplificação foi realizada com 30 ciclos em um termociclador automático (Eppendorf, Master Cycler 5330, USA). Na etapa de mistura da reação da PCR foi utilizado como controle negativo água livre de RNase.

Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e revelados pela prata (Santos *et al.*, 1993). O fragmento amplificado foi monitorado pela utilização de marcador de massa molecular (100pb DNA Ladder, Catálogo: 15628-019, Gibco, Brasil). Após a eletroforese, o gel foi fixado em solução de etanol a 10% e ácido acético a 0,5% por 5 min, sob agitação. A seguir, esta solução foi descartada e o gel corado pelo nitrato de prata a 0,2% por 10 min, sob agitação; posteriormente o gel foi lavado por 30 segundos em água deionizada e revelado em solução de NaOH 0,75M e formaldeído 0,1M, sob agitação até nítido aparecimento das bandas. Novamente o gel foi transferido para a solução fixadora, fotografado e posteriormente seco entre folhas de papel celofane permeável.

A quantificação das citocinas presentes foi determinada baseada na densidade obtida pela análise das bandas de DNA das amostras pelo *Software Quantity-one* (The Discovery series 1998, Biorad laboratories, USA). Foi obtido para cada amostra um índice de expressão de citocinas, onde: Expressão do mRNA para as citocinas = densidade óptica do produto de PCR da citocina ÷ densidade óptica do produto de PCR de HPRT.

4.7 – Análise dos níveis séricos de INF- γ e IL-10

Para a dosagem de INF- γ , foi utilizado o Kit ELISA para INF- γ murino (BIOSOURCE – Invitrogen cytokines & signaling), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante.

Para a dosagem de IL-10, foi utilizado o Kit ELISA para IL-10 murino (BIOSOURCE – Invitrogen cytokines & signaling), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante.

4.8 - Avaliação morfológica

4.8.1 – Preparação dos cortes histológicos

Fragmentos do coração coletados e fixados em formol 10% tamponado pH 7,2 foram desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol, embebidos e incluídos em parafina e posteriormente foram submetidos à microtomia para a obtenção de 3 cortes seriados na espessura de 4µm. Em seguida, foram desparafinizados em dois banhos de xilol, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes de álcool (100, 90, 80 e 70%) e lavados em água corrente por 5 minutos.

4.8.2 – Técnica de Hematoxilina-Eosina (HE)

As preparações acima foram coradas pela hematoxilina, lavadas em água corrente e diferenciadas rapidamente em álcool acidulado; novamente lavadas em água corrente e coradas pela eosina. Após o último processo de lavagem em água corrente, as lâminas foram levadas até a estufa a 56°C para secagem, posteriormente foram imersas em xilol e montadas com Entellan e lamínula.

4.8.3 – Avaliação quantitativa da área ocupada por inflamação

As células inflamatórias presentes no coração foram quantificadas em 20 imagens aleatórias (área total percorrida igual a $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$). As imagens foram visualizadas pela objetiva de 40x e digitalizadas através da microcâmera Leica DM5000B e do programa Leica Application Suite (Versão 2.4.0 R1 Leica Microsystems-Switzerland Ltd). Para a análise das imagens obtidas foi utilizado o programa Leica QWin V3 (Leica Microsystems-Switzerland Ltd) (**Figura1**).

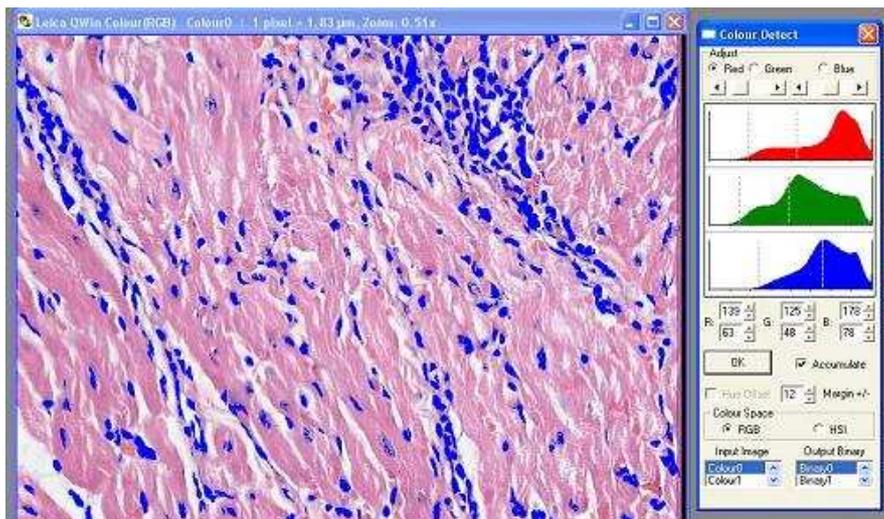


Figura 3 – Imagem visualizada pela objetiva de 40× e capturada através de microcâmara Leica DM 5000 B sendo processada por meio do programa analisador de imagens Leica Qwin V3, onde a inflamação foi determinada por meio da quantificação do número de núcleos celulares, marcados em azul, presentes no campo de área correspondente a 74966,8 μm^2 .

4.9 – Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o *software* Prism for Windows, versão 4.0. O intervalo de confiança foi de 95% em todos os testes realizados e a diferença estatística foi considerada em $p < 0,05$. Os dados histopatológicos, perfil de expressão e produção de citocinas foram analisados através do teste de *Kruskal-Wallis*.

5. RESULTADOS

A avaliação do papel das ecto-nucleotidases do *Trypanosoma cruzi* nos processos de infecção e virulência *in vivo*, foi realizada através da avaliação da infecção em modelo murino utilizando-se formas tripomastigotas da Cepa Y do *T. cruzi* pré-incubados com inibidores de ecto-nucleotidases da família E-NTPDases (Suramina, Gadolínio e ARL 67156). Foram utilizadas três concentrações de cada inibidor: 100µm, 300µm e 1mM. Após pré-incubação de 10 minutos, os parasitos foram lavados para retirada do meio com inibidores, suspensos em novo meio livre de inibidores e inoculados em camundongos Swiss, por via intraperitoneal. A parasitemia dos animais foi avaliada diariamente e as curvas representam as médias diárias dos parasitos observados no sangue periférico dos camundongos de cada grupo experimental.

Para cada inibidor foram apresentados, separadamente, gráficos de parasitemia e mortalidade, comparando-se com o grupo controle (cepa Y), na ausência de tratamento com inibidores. É importante ressaltar que os efeitos observados devem ser provavelmente relativos à ação dos inibidores somente nos parasitos, visto que os mesmo foram lavados com meio na ausência de inibidor antes de serem inoculados nos animais.

5.1 – Avaliação da parasitemia e sobrevivência - Suramina

As curvas de parasitemia dos animais inoculados com parasitos pré-tratados com diferentes concentrações do inibidor Suramina estão representadas no **Gráfico 1**. A taxa de infectividade foi de 100% (10/10) para todas as concentrações utilizadas. O período pré-patente foi de 3 dias tanto para o grupo controle quanto para os grupos inoculados com parasitos pré-tratados com as diferentes concentrações do inibidor. O período patente foi de 26, 21 e 24 dias para as concentrações de 100µm, 300µm e 1mM, respectivamente e 24 dias para o grupo controle.

O pico máximo de parasitemia do grupo controle (cepa Y) ocorreu no 8^o dia de infecção, com uma média de 541×10^3 parasitos/0,1 ml de sangue. Para os grupos tratados com as concentrações de 100µm, 300µm e 1mM da Suramina, o pico foi de 656×10^3 ; 302×10^3 e 228×10^3 parasitos/0,1 ml de sangue, respectivamente; ocorrendo em dias distintos da infecção (**Tabela 1**). Desta forma observa-se uma redução de 44,18% e 57,86% no pico de parasitemia em relação ao grupo controle, para as

concentrações de 300 μ m e 1mM de Suramina, respectivamente. Foi observado também um atraso no dia do pico máximo de parasitemia dos animais tratados com 300 μ m (23^o dia) e 1mM (17^o dia) de Suramina quando comparado ao grupo controle e ao grupo pré-tratado com 100 μ m do mesmo inibidor, nos quais ocorreu no 8^o dia de infecção (**Tabela 1**).

O **Gráfico 2** apresenta as curva de sobrevivência dos animais inoculados com parasitos pré-tratados com diferentes concentrações da Suramina. Estes dados evidenciam que somente a concentração de 1mM foi capaz de aumentar a sobrevida dos animais (30%) quando comparado ao grupo controle (20%). Além disto, observa-se que mesmo a mortalidade tendo sido diminuída em somente 10% os animais sobreviveram por mais tempo, indicando uma alteração no curso da infecção.

Os dados citados anteriormente estão resumidos na **tabela 1**, para melhor visualização dos mesmos.

Tabela 1 – Resumo das características biológicas dos grupos inoculados com parasitos pré-tratados com diferentes concentrações do inibidor Suramina. Parâmetros analisados: Períodos pré-patente (PPP), Período patente (PP) e Pico de Parasitemia.

Grupos	PPP(dias)	PP(dias)	Pico de Parasitemia	
			Parasitas/0,1ml de sangue	Dia
Controle	3	24	541 x 10 ³	8 ^o
Suramina 100 μ m	3	26	656 x 10 ³	8 ^o
Suramina 300 μ m	3	21	302 x 10 ³	23 ^o
Suramina 1mM	3	24	228 x 10 ³	17 ^o

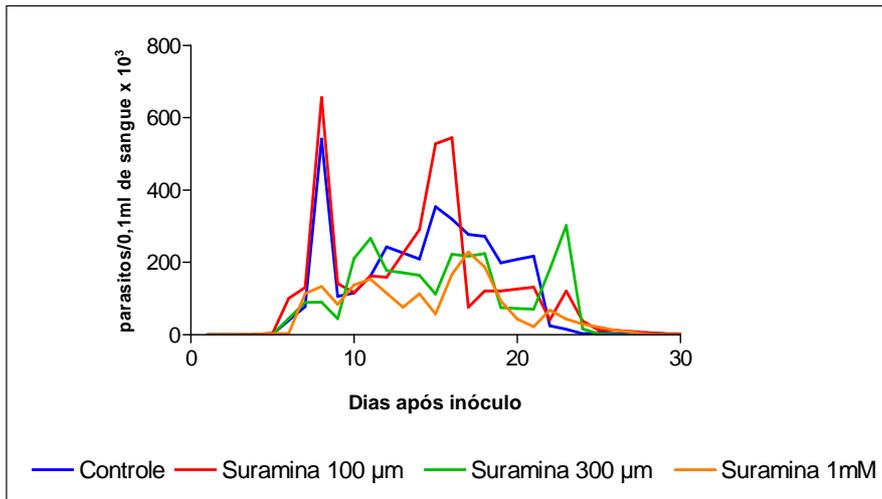


Gráfico 1 - Curva de parasitemia utilizando 10 camundongos Swiss infectados com 5×10^3 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, derivados de primeira passagem em cultura celular, pré-tratados ou não com diferentes concentrações de Suramina por 10 minutos, por via intraperitoneal.

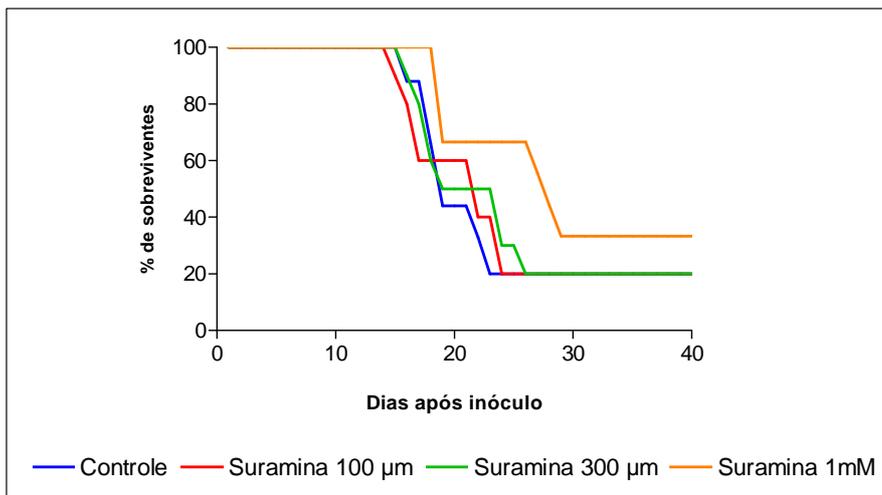


Gráfico 2 – Curva de sobrevivência utilizando 10 camundongos Swiss infectados com 5×10^3 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, derivados de primeira passagem em cultura celular, pré-tratados ou não com diferentes concentrações de Suramina por 10 minutos, por via intraperitoneal.

5.2 – Avaliação da parasitemia e sobrevivência - Cloreto de Gadolínio (GdCl₃)

As curvas de parasitemia e sobrevivência dos animais inoculados com parasitos pré-tratados com diferentes concentrações do inibidor GdCl₃ estão apresentadas nos **Gráficos 3 e 4**. É importante ressaltar que para este inibidor, a concentração de 1mM apresentou toxicidade para os parasitos, de forma que, após incubação, os mesmos não apresentaram viabilidade para o inóculo em camundongos.

A taxa de infectividade foi de 100% (10/10) para todas as concentrações utilizadas. O período pré-patente foi de 3 dias para o grupo controle e 5 dias para os grupos inoculados com parasitos pré-tratados com as diferentes concentrações do inibidor. O período patente foi de 18 e 22 dias para as concentrações de 100µm e 300µm, respectivamente; enquanto para o grupo controle foi de 24 dias.

Observou-se que a concentração de 100µm não foi capaz de reduzir significativamente os níveis parasitêmicos, entretanto, houve um atraso no pico de parasitemia, que ocorreu somente no 19^o dia de infecção, correspondendo a 722×10^3 parasitos/0,1 ml de sangue. Quando os parasitos foram pré-tratados com a concentração de 300µm, foi observada uma redução de 80,41% no pico de parasitemia; correspondendo a 106×10^3 parasitos/0,1 ml de sangue. Este evento foi acompanhado pelo aumento da sobrevida dos animais para 50% quando comparado ao grupo controle (20%) (**Gráfico 4**).

A **tabela 2** resume as características biológicas observadas nos grupos inoculados com parasitos pré-tratados com diferentes concentrações do inibidor GdCl₃ em comparação ao grupo controle.

Tabela 2 – Resumo das características biológicas dos grupos inoculados com parasitos pré-tratados com diferentes concentrações do inibidor GdCl₃. Parâmetros analisados: Períodos Pré-Patente (PPP), Período Patente (PP) e Pico de Parasitemia.

Grupos	PPP(dias)	PP(dias)	Pico de Parasitemia	
			Parasitos/0,1ml de sangue	Dia
Controle	3	24	541 x 10 ³	8 ^o
GdCl ₃ 100µm	5	18	722 x 10 ³	19 ^o
GdCl ₃ 300µm	5	22	106 x 10 ³	9 ^o

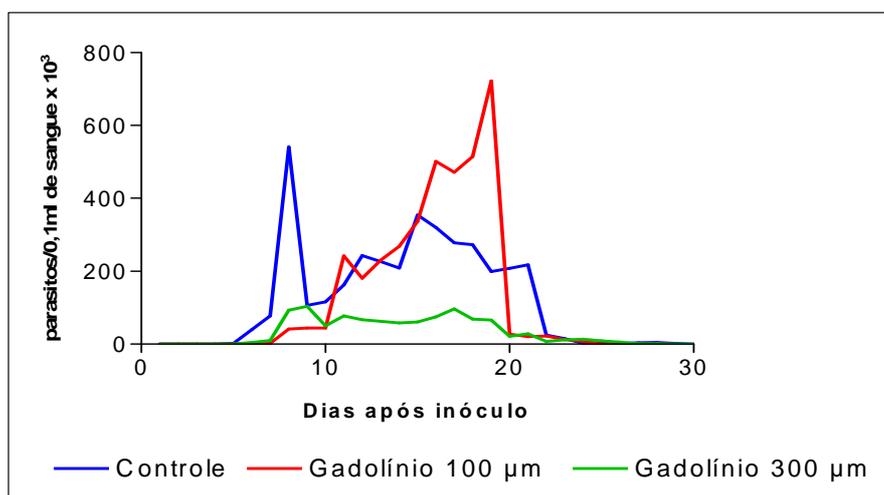


Gráfico 3 - Curva de parasitemia utilizando 10 camundongos Swiss infectados com 5 x 10³ tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, derivados de primeira passagem em cultura celular, pré-tratados ou não com diferentes concentrações de GdCl₃ por 10 minutos, por via intraperitoneal.

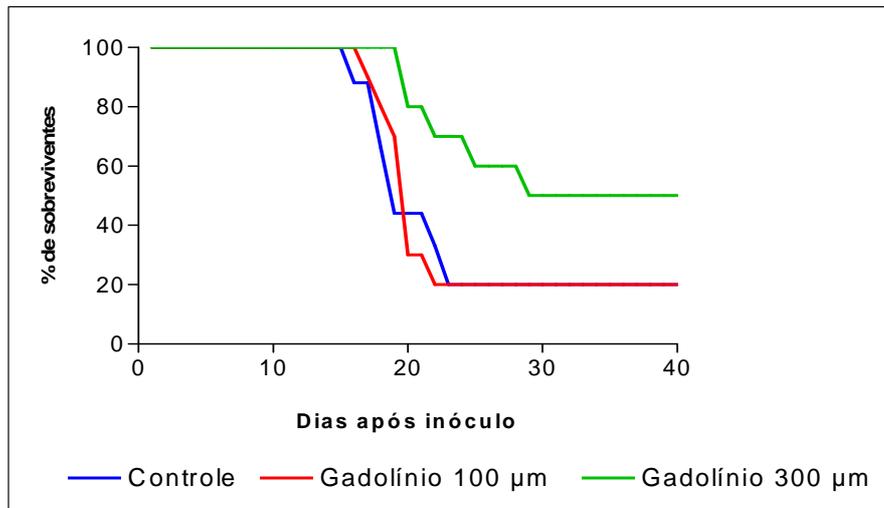


Gráfico 4 – Curva de sobrevivência utilizando 10 camundongos Swiss infectados com 5×10^3 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, derivados de primeira passagem em cultura celular, pré-tratados ou não com diferentes concentrações de $GdCl_3$ por 10 minutos, por via intraperitoneal.

5.3 – Avaliação da parasitemia e sobrevivência - ARL 67156

O efeito de diferentes concentrações do inibidor ARL 67156 também foi avaliado, utilizando-se os mesmos parâmetros descritos anteriormente. Os **Gráficos 5 e 6** apresentam as curvas de parasitemia e sobrevida dos animais inoculados com parasitos pré-tratados com diferentes concentrações do inibidor. A taxa de infectividade foi de 100% (10/10) para todas as concentrações utilizadas. O período pré-patente foi de 3 dias para o grupo controle, 4 dias para os grupos inoculados com as concentrações de 100µm e 1mM e de 5 dias para o grupo inoculado com a concentração de 300µm do inibidor. O período patente foi de 26, 24 e 20 dias para os grupos inoculados com parasitos pré-tratados com as concentrações de 100µm, 300µm e 1mM, respectivamente.

No **Gráfico 5**, observa-se que as concentrações de 100 μ m e 1mM não induziram redução significativa do pico de parasitemia; entretanto, quando a concentração de 1mM foi utilizada, ocorreu uma diminuição geral dos níveis parasitêmicos durante o curso da infecção. O mesmo efeito foi observado para a concentração de 300 μ m. Este evento pode estar relacionado à maior sobrevida observada nestes grupos.

O pico de parasitemia detectado nos camundongos inoculados com parasitos pré-tratados com a concentração de 100 μ m foi de 456 x 10³ parasitos/0,1ml de sangue e naqueles pré-tratados com a concentração de 1mM foi de 426 x 10³ parasitos/0,1ml de sangue, similar ao grupo controle na ausência de inibidores. Entretanto, quando a concentração de 1mM foi utilizada houve um aumento da sobrevida dos animais para 50% quando comparado ao grupo controle (**Gráfico 6**).

Quando os parasitos foram pré-tratados com a concentração de 300 μ m do inibidor houve uma redução de cerca de 64,88% do pico de parasitemia em relação ao grupo controle; correspondendo a 190 x 10³ parasitos/0,1ml de sangue; o qual foi acompanhado pelo aumento da sobrevida dos animais para 60% quando comparado ao grupo controle (20%).

Tabela 3 – Resumo das características biológicas dos grupos inoculados com parasitos pré-tratados com diferentes concentrações do inibidor ARL 67156. Parâmetros analisados: Períodos Pré-Patente (PPP), Período Patente (PP) e Pico de Parasitemia.

Grupos	PPP(dias)	PP(dias)	Pico de Parasitemia	
			Parasitas/0,1ml de sangue	Dia
Controle	3	24	541 x 10 ³	8 ^o
ARL 100 μ m	4	26	456 x 10 ³	9 ^o
ARL 300 μ m	5	24	190 x 10 ³	19 ^o
ARL 1mM	4	20	426 x 10 ³	8 ^o

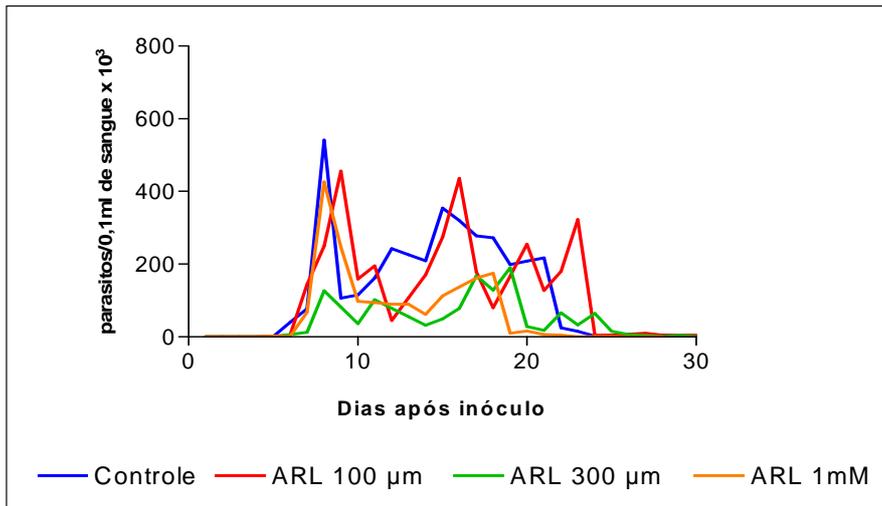


Gráfico 5 - Curva de parasitemia utilizando 10 camundongos Swiss infectados com 5×10^3 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, derivados de primeira passagem em cultura celular, pré-tratados ou não com diferentes concentrações de ARL 67156 por 10 minutos, por via intraperitoneal.

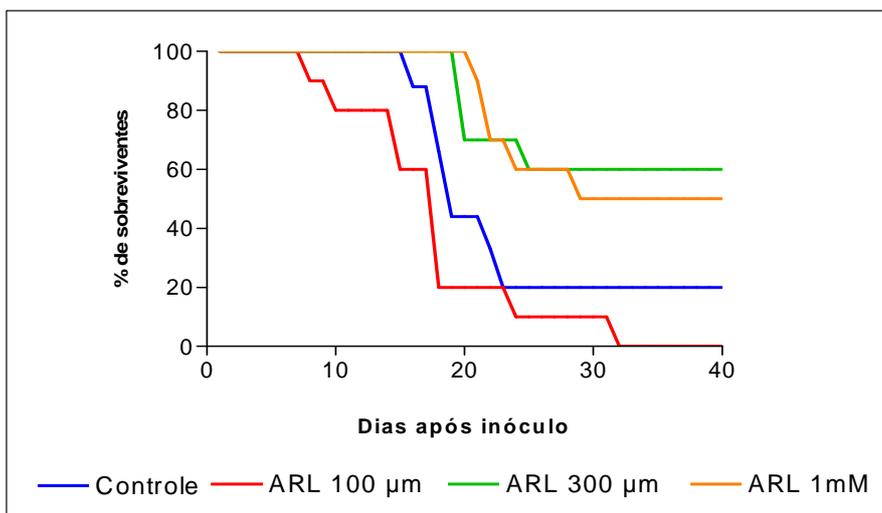


Gráfico 6 - Curva de sobrevivência utilizando 10 camundongos Swiss infectados com 5×10^3 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, derivados de primeira passagem em cultura celular, pré-tratados ou não com diferentes concentrações de ARL 67156 por 10 minutos, por via intraperitoneal.

Após a avaliação da influência de diferentes concentrações dos inibidores da apirase (Suramina, $GdCl_3$ e ARL 67156) no curso da infecção pelo *T. cruzi* em camundongos Swiss, a concentração de cada inibidor, que induziu a maior redução dos níveis parasitêmicos e da mortalidade, foi escolhida para a realização de experimentos adicionais para avaliação do efeito dos tratamentos na resposta imunológica do hospedeiro e análise histopatológica. Desta forma, grupos de 12 camundongos foram inoculados com parasitos pré-tratados com as seguintes concentrações: Suramina 1mM, $GdCl_3$ 300 μ m e ARL 300 μ m. As curvas de parasitemia foram acompanhadas, e os resultados demonstram que houve reprodutibilidade dos dados obtidos anteriormente.

5.4 – Análise da expressão do mRNA para citocinas *in situ*

5.4.1 – Expressão do mRNA para INF- γ no coração

A análise semi-quantitativa da expressão do mRNA para a citocina INF- γ no coração dos animais foi feita por RT-PCR. Os camundongos foram inoculados com parasitos pré-tratados ou não com os inibidores de E-NTPDases descritos anteriormente, sendo necropsiados no 8^o e 15^o de infecção para a retirada do coração.

Os resultados estão representados no **Gráfico 7** e na **Figura 2**. A análise dos dados demonstrou uma maior expressão de INF- γ no 8^o dia de infecção nos grupos de animais inoculados com parasitos pré-tratados com os inibidores $GdCl_3$ ($0,4327 \pm 0,2188$) e ARL ($1,077 \pm 0,0973$; $P < 0,001$) em relação ao grupo controle infectado ($0,380 \pm 0,030$). No grupo pré-tratado com o inibidor Suramina ($0,258 \pm 0,1323$) houve uma redução na expressão de INF- γ .

O padrão de expressão desta citocina no coração dos animais foi alterado no 15^o dia de infecção, podendo-se observar um aumento significativo da expressão de INF- γ no grupo controle infectado ($0,6263 \pm 0,0973$) e no grupo de camundongos inoculados com parasitos pré-tratados com o inibidor Suramina ($0,7697 \pm 0,0366$) em relação ao 8^o dia. No entanto, os grupos pré-tratados com o $GdCl_3$ ($0,2713 \pm 0,1591$) e o ARL ($0,3475 \pm 0,0555$) apresentaram uma redução na expressão de INF- γ no coração, em

relação ao 8º dia de infecção. No 15º dia, houve diferença estatística somente entre os grupos Suramina e ARL ($P < 0,05$), $GdCl_3$ ($P < 0,05$).

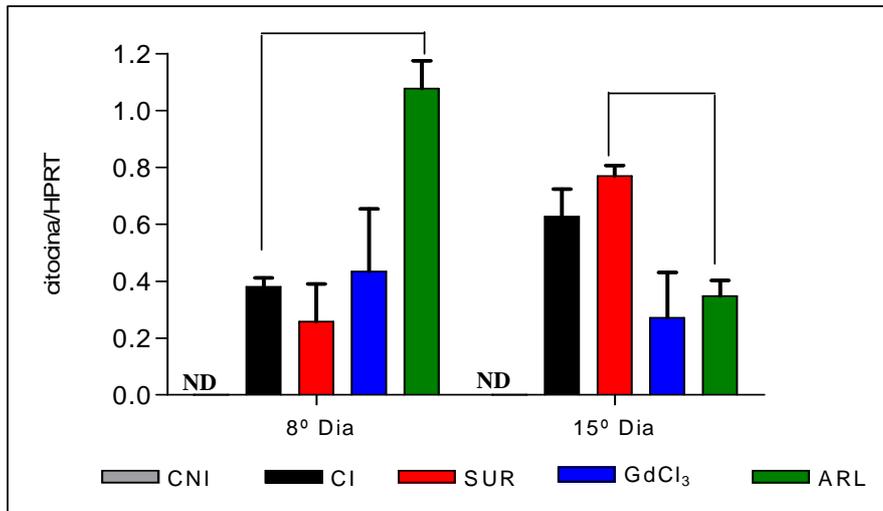


Gráfico 7 – Análise semi-quantitativa da expressão do mRNA da citocina IFN- γ no coração de camundongos Swiss inoculados com 5×10^3 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, derivados de primeira passagem em cultura celular, pré-tratados ou não com inibidores de E-NTPDases, por 10 minutos (Suramina 1mM – SUR, Gadolínio 300µm – GdCl₃ e ARL 67156 300µm - ARL). O índice de expressão de citocinas foi obtido através da relação entre a média da expressão da citocina do grupo sobre a média da expressão do controle endógeno HPRT. (ND – Não Detectado)

5.4.1 – Expressão do mRNA para IL-10 no coração

A análise semi-quantitativa da expressão do mRNA para a citocina IL-10 no coração dos animais inoculados com parasitos pré-tratados ou não com inibidores, determinada pela RT-PCR, está representada no **Gráfico 8** e na **Figura 2**. A análise dos dados demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos, tanto no 8º dia quanto no 15º dia de infecção, com relação à expressão de IL-10 no coração.

No 8º dia de infecção, a expressão desta citocina foi detectada em todos os grupos, entretanto em níveis mais baixos quando comparado à expressão de INF- γ . Os grupos Suramina ($0,351 \pm 0,0594$) e GdCl₃ ($0,3403 \pm 0,178$) apresentaram níveis similares ao grupo controle infectado ($0,2713 \pm 0,1038$), enquanto o grupo inoculado

com parasitos pré-tratados com o ARL ($0,1603 \pm 0,0813$) apresentou níveis mais baixos de IL-10.

No 15^o dia de infecção, ocorreu uma diminuição da expressão de IL-10 tanto no grupo controle infectado ($0,2088 + 0,0832$) quanto no grupo pré-tratado com o $GdCl_3$ ($0,2707 \pm 0,0943$) em relação ao 8^o dia de infecção. No grupo ARL ($0,3555 \pm 0,017$) ocorreu um aumento da expressão desta citocina em relação ao 8^o dia. Enquanto que para o grupo pré-tratado com o inibidor Suramina os níveis de expressão de IL-10 se mantiveram similares aos observados no 8^o dia de infecção. Comparando-se com o grupo controle infectado, no 15^o dia de infecção, os grupos tratados com os inibidores apresentaram uma maior expressão de IL-10.

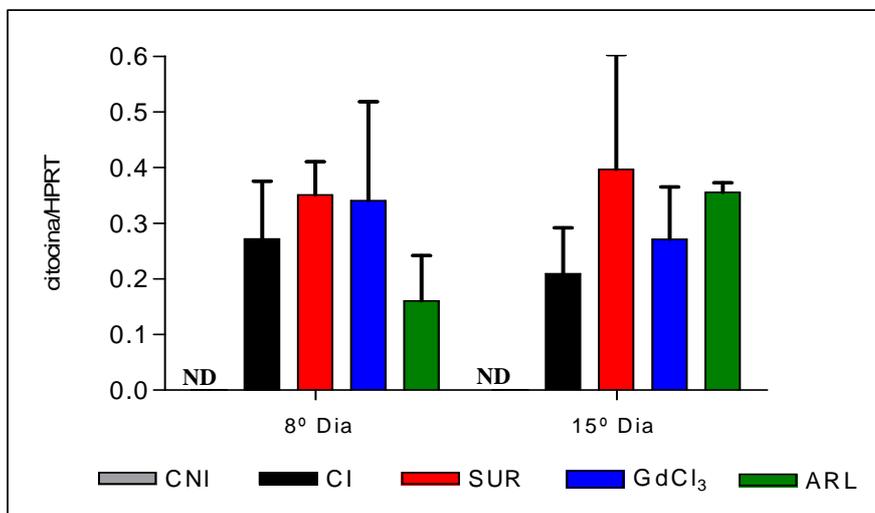


Gráfico 8 – Análise semi-quantitativa da expressão de mRNA da citocina IL-10 no coração de camundongos Swiss inoculados com 5×10^3 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, derivados de primeira passagem em cultura celular, pré-tratados ou não com inibidores de E-NTPDases por 10 minutos (Suramina 1mM – SUR, Gadolínio 300µm – $GdCl_3$ e ARL 67156 300µm - ARL). O índice de expressão de citocinas foi obtido através da relação entre a média da expressão da citocina do grupo sobre a média da expressão do controle endógeno HPRT. (ND – Não Detectado)

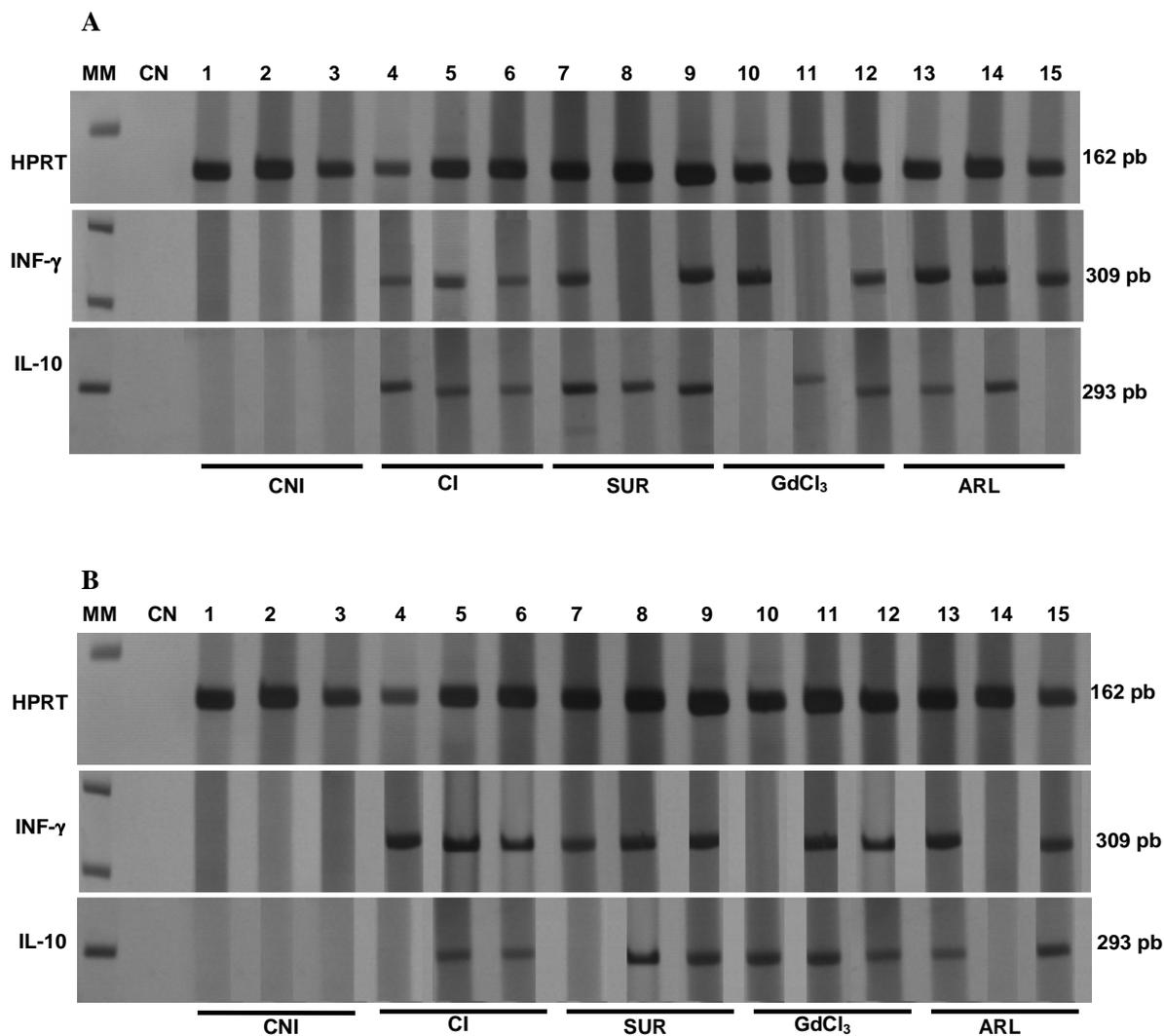


Figura 4 – Expressão das citocinas INF- γ e IL-10 no coração de camundongos Swiss inoculados com 5×10^3 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, derivados de primeira passagem em cultura celular, pré-tratados com inibidores de E-NTPDases por 10 minutos (Suramina – SUR, Gadolínio – GdCl₃ e ARL 67156) ou não (CNI – Controle Não-Infectado; CI – Controle Infectado) determinado por RT-PCR. Amostras de 5 μ l das reações de RT-PCR semi-quantitativo foram corridas em eletroforese em gel de acrilamida 6% e corados pelo método da prata. (A) 8^o dia de infecção e (B) 15^a dia de infecção. Canaleta 1: MM, padrão de massa molecular 100pb; Canaleta 2: CN, controle negativo; Canaletas: 3-17: produto de RT-PCR obtidos de cada animal. HPRT, gene constitutivo utilizado como controle positivo da reação.

5.5 – Níveis séricos de INF- γ e IL-10

Os camundongos inoculados com parasitos pré-tratados ou não com inibidores de E-NTPDases foram submetidos a coleta de sangue do plexo ocular no dia da infecção (ponto 0) e no 8^o e 15^o dia; o soro foi separado e utilizado para a dosagem das citocinas.

5.5.1 – Níveis séricos de INF- γ

A análise dos dados demonstra que houve uma tendência ao aumento da produção de INF- γ no sangue periférico dos animais inoculados com parasitos pré-tratados com os inibidores da apirase em relação ao grupo controle infectado.

Podemos observar que no grupo pré-tratado com o inibidor ARL o nível sérico de INF- γ foi maior tanto no 8^o dia ($1.238 \pm 433,1$; $p < 0,05$) quanto no 15^o dia de infecção ($1.202 \pm 252,5$; $p < 0,05$) quando comparado aos outros grupos analisados. Nos grupos pré-tratados com os inibidores GdCl₃ e Suramina a produção de INF- γ ocorreu em níveis intermediários, semelhantes ao grupo controle infectado.

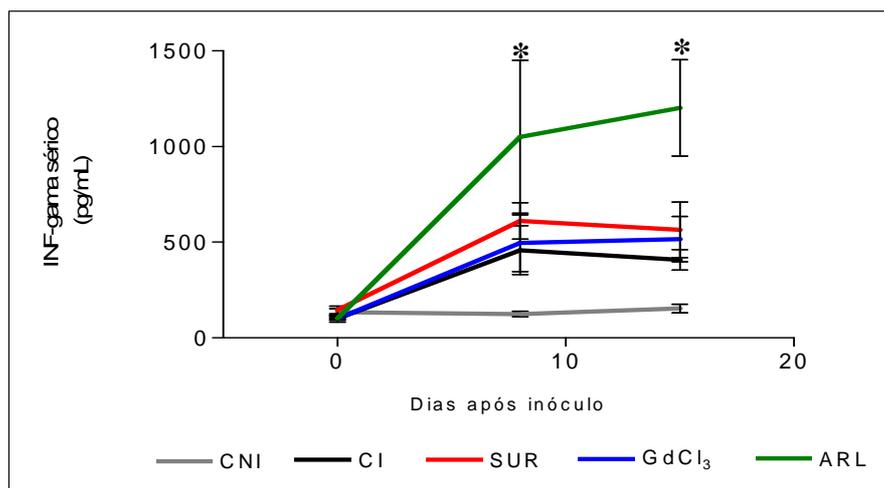


Gráfico 9 – Análise dos níveis séricos de INF- γ de camundongos Swiss inoculados com 5×10^3 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, derivados de primeira passagem em cultura celular, pré-tratados com inibidores da apirase por 10 minutos (Suramina 1mM – SUR, Gadolínio 300 μ m – GdCl₃ e ARL 67156 300 μ m - ARL) ou não (CNI – Controle Não-Infectado; CI – Controle Infectado).

5.5.1 – Níveis Séricos de IL-10

Com relação aos níveis séricos de IL-10 dos camundongos dos diferentes grupos experimentais observou-se que, no 8º dia de infecção, os grupos pré-tratados com os inibidores da apirase apresentaram níveis basais de produção desta citocina; Suramina ($14,45 \pm 0,968$), $GdCl_3$ ($15,45 \pm 1,18$) e ARL ($15,98 \pm 1,208$). Níveis mais elevados de IL-10 foram detectados no grupo controle infectado ($28,81 \pm 11,41$) em relação aos demais grupos avaliados, neste ponto da infecção.

No 15º dia de infecção, foi observado um aumento na produção de IL-10 no grupo tratado com o ARL ($23,39 \pm 3,08$) em relação ao grupo controle infectado ($20,87 \pm 5,561$). Nos grupos tratados com a Suramina e o $GdCl_3$ a citocina IL-10 permaneceu em níveis basais.

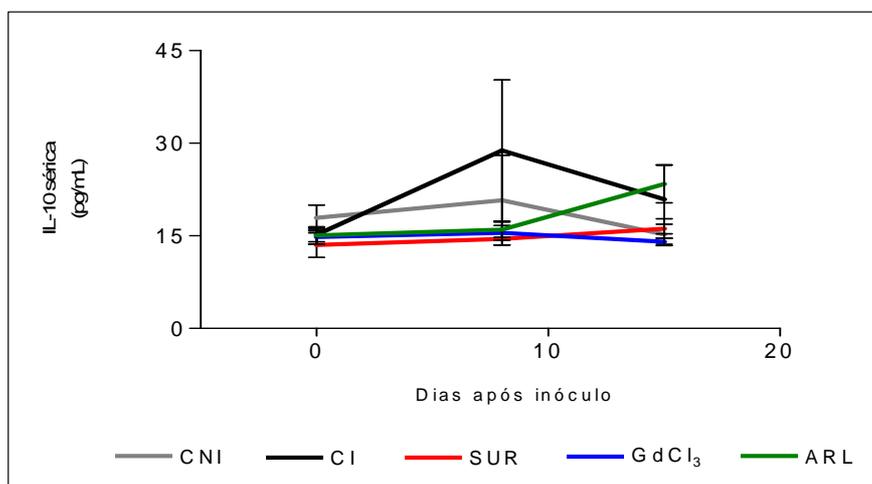


Gráfico 10 – Análise da produção de IL-10 no sangue periférico de camundongos Swiss inoculados com 5×10^3 tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, derivados de primeira passagem em cultura celular, pré-tratados com inibidores por 10 minutos (Suramina 1mM – SUR, Gadolínio 300 μ m – $GdCl_3$ e ARL 67156 300 μ m - ARL) ou não (CNI – Controle Não-Infectado; CI – Controle Infectado).

5.6 - Avaliação morfométrica

Os camundongos foram inoculados com parasitos pré-tratados ou não com os inibidores de E-NTPDases descritos anteriormente, sendo necropsiados no 8^o e 15^o de infecção para a retirada do coração e utilizados para a realização da análise histopatológica.

No **Gráfico 9** e nas **Figuras 5 e 6** estão representadas a quantificação de células inflamatórias no coração dos camundongos dos diferentes grupos experimentais no 8^o e 15^o dia após a inoculação.

A análise dos dados mostrou que no 8^o dia os grupos de animais inoculados com parasitos pré-tratados com os inibidores Suramina ($308,9 \pm 8,142$; $P < 0,001$), $GdCl_3$ ($328,9 \pm 6,146$, $P < 0,01$) e ARL ($376,4 \pm 9,646$) apresentaram uma redução no número de células inflamatórias em relação ao grupo controle infectado ($422 \pm 8,153$).

No 15^o dia, houve um aumento da intensidade da inflamação no coração, em todos os grupos avaliados em relação ao 8^o dia. Comparando-se com o grupo controle infectado ($578,7 \pm 17,45$), os grupos Suramina ($729,8 \pm 23,42$; $P < 0,05$) e ARL ($646,6 \pm 18,99$) apresentaram um aumento no número de células inflamatórias no coração. O grupo tratado com o inibidor $GdCl_3$ ($489,7 \pm 6,326$) apresentou uma redução da inflamação em relação ao grupo controle infectado.

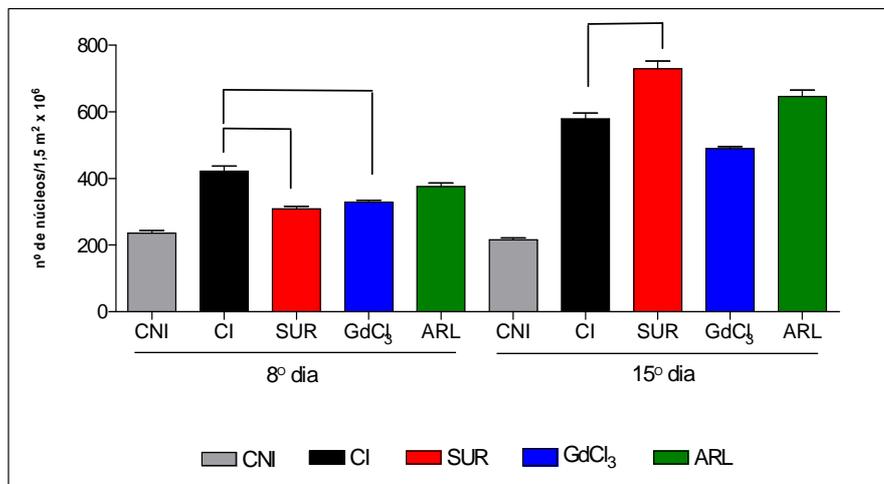


Gráfico 11 – Análise morfométrica do infiltrado inflamatório no coração dos camundongos inoculados com parasitos da cepa Y do *T. cruzi*, derivados de primeira passagem em cultura celular, pré-tratados com os diferentes inibidores por 10 minutos (Suramina 1mM – SUR, Gadolínio 300 μ m – $GdCl_3$ e ARL 67156 300 μ m - ARL) ou não (CNI – Controle Não-Infectado; CI – Controle Infectado).

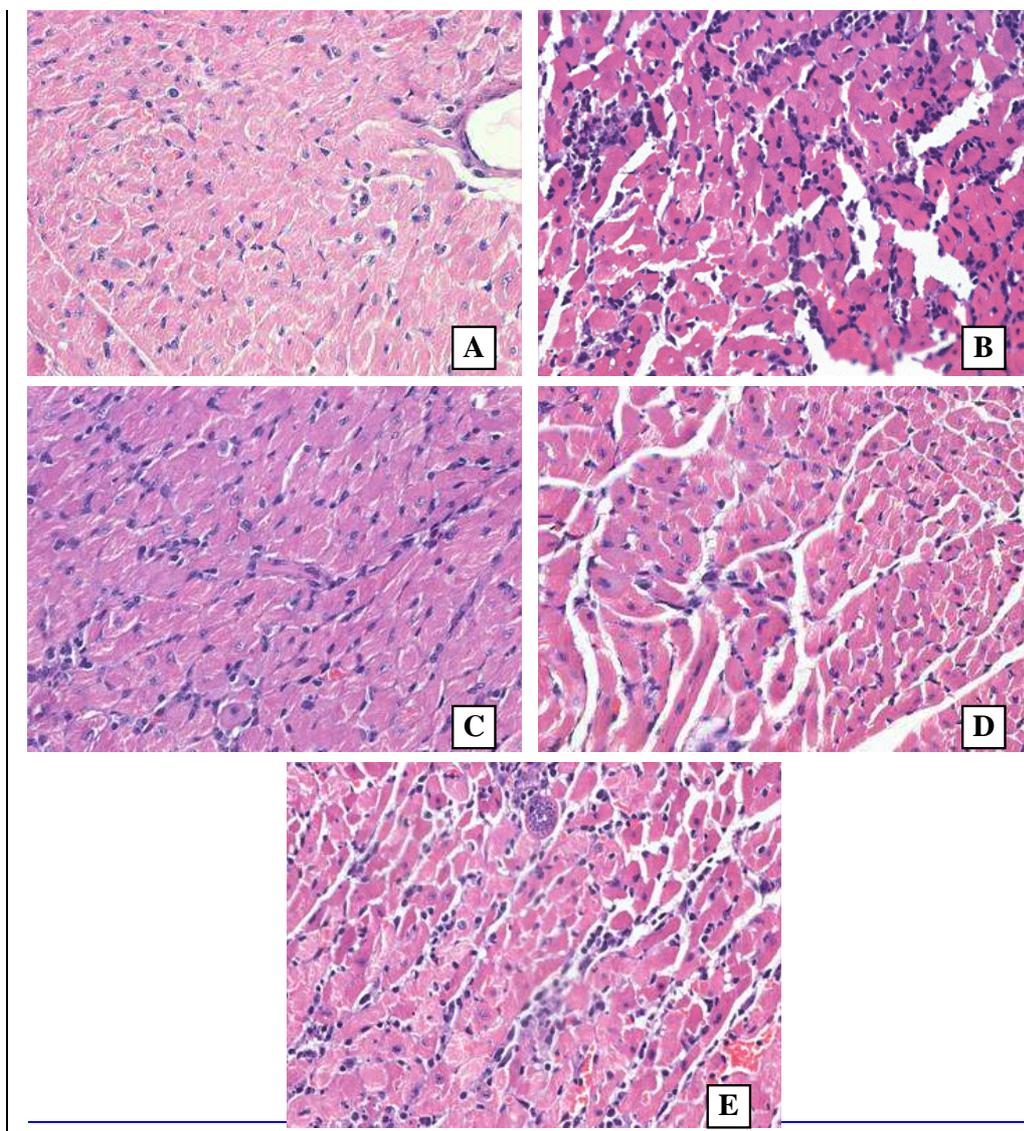
8º dia

Figura 5 – Fotomicrografias do infiltrado inflamatório no coração dos camundongos inoculados com parasitos da Cepa Y do *T. cruzi* derivados de primeira passagem em cultura celular, pré-tratados ou não com inibidores de E-NTPDases por 10 minutos. A – Controle não-infectado, B - Controle Infectado, C – Suramina, D – GdCl₃, E – ARL 67156.

15^o dia

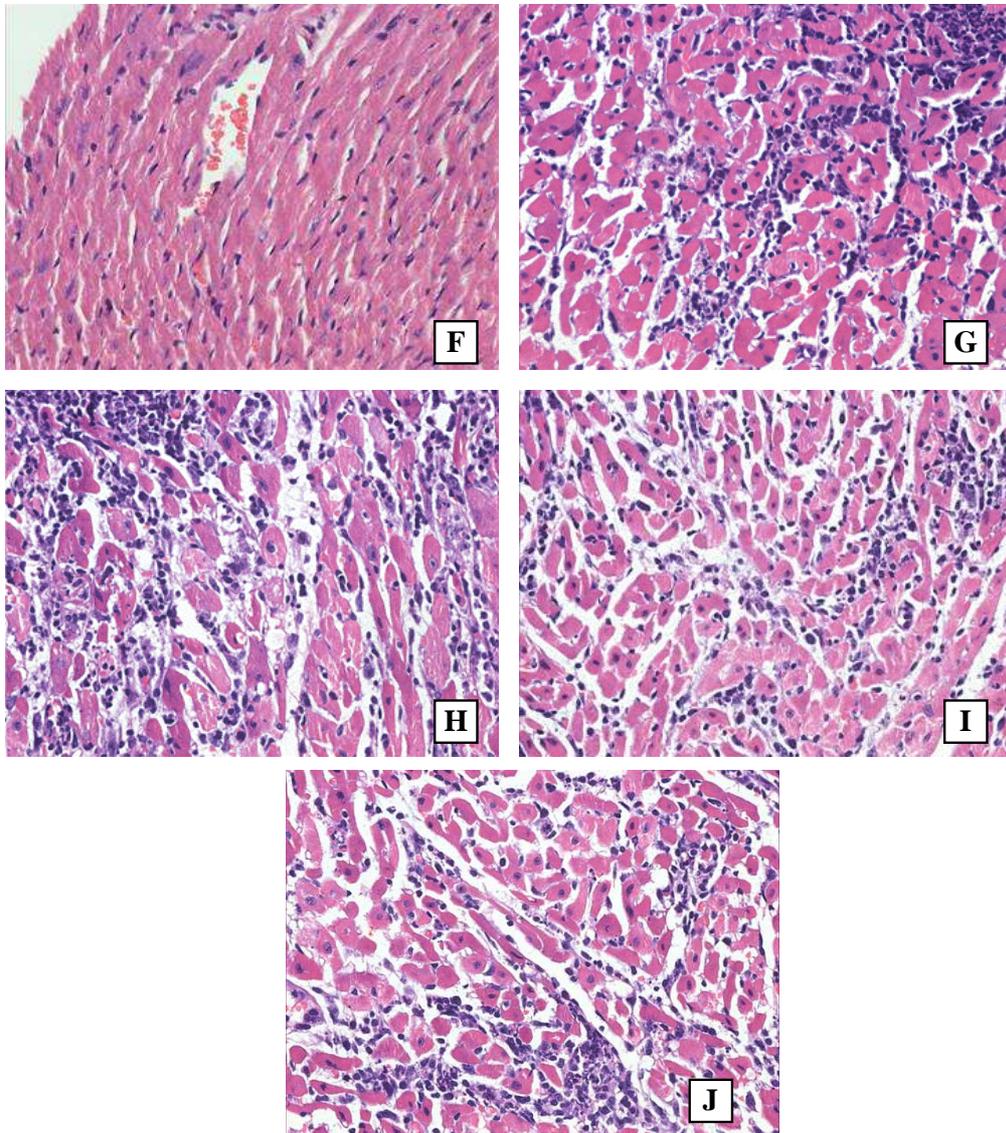


Figura 6 – Fotomicrografias do infiltrado inflamatório no coração dos camundongos inoculados com parasitos da Cepa Y do *T. cruzi* derivados de cultura celular, pré-tratados ou não com inibidores de E-NTPDases, por 10 minutos. F – Controle não-infectado, G - Controle Infectado, H – Suramina, I – GdCl₃, J – ARL 67156.

Na tabela 4 estão resumidos todos os parâmetros avaliados neste trabalho, nos grupos pré-tratados com os inibidores Suramina, GdCl₃ e ARL 67156, comparando-se com o grupo controle infectado.

Tabela 4 – Resumo dos parâmetros avaliados, nos grupos tratados com os inibidores Suramina, GdCl₃ e ARL 67156 em relação ao grupo controle infectado.

PARÂMETROS AVALIADOS		GRUPOS			
		Suramina 1mM	GdCl ₃ 300µm	ARL 67.156 300µm	
Parasitemia (pico de parasitemia)		Redução de 57,8 %	Redução de 80,4 %	Redução de 64,8%	
Mortalidade		Redução de 10%	Redução de 30%	Redução de 40%	
Expressão de citocinas		8º dia			
		INF-γ	Diminuição	Aumento	Aumento (P<0,001)
		IL-10	Aumento	Aumento	Diminuição
		15º dia			
		INF-γ	Aumento	Diminuição	Diminuição
		IL-10	Aumento	Aumento	Aumento
Citocinas no soro		8º dia			
		INF-γ	Aumento	Aumento	Aumento (P<0,05)
		IL-10	Produção basal	Produção basal	Produção basal
		15º dia			
		INF-γ	Aumento	Aumento	Aumento (P<0,05)
		IL-10	Produção basal	Produção basal	Aumento
Patologia (coração)		8º dia	Redução do nº de células (P<0,001)	Redução do nº de células (P<0,01)	Redução
		15º dia	Aumento do nº de células (P<0,05)	Redução	Aumento

6. DISCUSSÃO

A Doença de Chagas é uma das doenças parasitárias com maior impacto social e econômico na América Latina; acometendo, ainda hoje, milhares de pessoas. É caracterizada por alta morbidade e mortalidade, consequência dos danos irreversíveis ao coração e ao trato intestinal (WHO, 2005). Desta forma, muitos esforços têm sido realizados para o desenvolvimento de fármacos mais específicos, já que os atualmente utilizados para o tratamento da doença de Chagas apresentam baixos índices de cura na fase crônica, alta toxicidade e muitos efeitos colaterais; os quais, muitas vezes, fazem com que o paciente abandone o tratamento. Portanto, alvos mais específicos têm sido estudados visando uma abordagem mais racional para a quimioterapia da doença de Chagas (Brener *et al*, 1984; Coura *et al*, 2002; Jannin *et al*, 2007; Guedes *et al*, 2006). Neste contexto, vias bioquímicas essenciais à sobrevivência do parasito e ligadas à sua infectividade têm sido estudadas e resultados promissores estão sendo obtidos (Oliveira *et al*, 2000; Opperdoes *et al*, 2001; Verlinde *et al*, 2001; Du *et al*, 2002; Fujji *et al*, 2005).

As ecto-nucleotidases têm sido associadas à sobrevivência e a capacidade infectiva de alguns parasitos, tais como, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania amazonensis*, *Schistosoma mansoni* e *T. cruzi*; sendo evidenciado em alguns trabalhos, o seu papel como fator de virulência utilizado por estes patógenos (Vasconcelos *et al*, 1996; Nakaar *et al*, 1998; Berredo-Pinho *et al*, 2001; Asai *et al*, 2002; Meyer-Fernandes *et al*, 2003; Fietto *et al*, 2004; Pinheiro *et al*, 2006).

Considerando-se que o papel das ecto-nucleotidases é ainda alvo de muitas especulações, torna-se fundamental a busca por novos conhecimentos no que diz respeito à sua participação em processos de infecção, sobrevivência e virulência de parasitos. Portanto, no presente trabalho, foram avaliadas as alterações no curso da infecção pelo *T. cruzi*, induzidas pelo pré-tratamento dos parasitos com inibidores de ecto-nucleotidases da família E-NTPDase; focando principalmente o papel desta enzima na modulação da resposta imune do hospedeiro.

Em uma primeira abordagem foi avaliado o impacto de diferentes concentrações dos inibidores Suramina, GdCl₃ e ARL 67156 no curso da infecção pelo *T. cruzi*. O uso destes inibidores foi baseado em dados prévios de nosso grupo de pesquisa, onde mostramos sua ação sobre os tripomastigotas de primeira passagem celular e evidenciamos que o pré-tratamento dos parasitos com estes inibidores inibe a infecção em células VERO (Santos, 2008).

Os resultados obtidos nesta dissertação, relativos às curvas de parasitemia e sobrevivência demonstram que para os três inibidores utilizados a influência no curso da infecção foi dose-dependente.

Quando diferentes concentrações de Suramina foram utilizadas observou-se que a concentração que exerceu maior efeito na infecção foi a concentração de 1mM, reduzindo o pico de parasitemia e aumentando a sobrevida dos animais. Quando a concentração de 300µm foi utilizada, o pico de parasitemia foi reduzido em relação ao grupo controle, entretanto não houve aumento na sobrevida dos animais. Na concentração mínima utilizada de 100µm não foi observado nenhum efeito diferente do grupo controle.

Santos, 2008 avaliando a inibição da atividade ecto-nucleotidásica em parasitos vivos e na NTPDase-I purificada, utilizando diferentes concentrações dos mesmos inibidores, verificou que a concentração da suramina mais efetiva neste caso foi a de 100µm. Desta forma, é possível verificar que a concentração efetiva do inibidor suramina necessária para produzir efeito observável no curso da infecção de camundongos pelo *T. cruzi* foi maior (1mM) do que aquela observada *in vitro* (0,1mM). A necessidade de concentrações maiores de suramina nos experimentos em camundongos sugere que a sua interação com os parasitos possa ser fraca e ter sido em parte perdida após o inóculo nos animais. Outra possibilidade é que a incubação com 100µm deste inibidor possa ter induzido um aumento da expressão ou atividade ecto-nucleotidásica no parasito, como mecanismo compensatório; de forma que no momento da infecção este aumento da atividade proporcionaria um decréscimo da concentração de ATP_e, conseqüentemente menor ativação dos mecanismos inflamatórios do hospedeiro, favorecendo desta forma a infecção pelo parasito. Esta hipótese explicaria o fato de que esta concentração da Suramina foi incapaz de reduzir os níveis parasitêmicos e a mortalidade em relação ao grupo controle. Esta hipótese é corroborada pelos resultados de Bissaggio *et al*, 2003, que verificaram um aumento na atividade ecto-ATPásica dependente de Mg²⁺ quando formas epimastigotas do *T. cruzi* foram crescidas em meio LIT, na presença de suramina. Entretanto, para conclusões definitivas sobre o efeito da suramina na atividade ecto-ATPásica do *T. cruzi* maiores investigações devem ser realizadas, no sentido de verificar se a atividade ecto-nucleotidásica, bem como a expressão desta enzima se encontram aumentadas após a incubação com este inibidor.

A suramina já tem sido usada na prática médica para o tratamento de algumas doenças. Alguns trabalhos têm demonstrado um efeito promissor da suramina no controle da filariose (Korten *et al*, 2008), no tratamento do câncer, já que possui atividade anti-neoplásica (Rebolo, 1994; Bhargava *et al*, 2007); e no tratamento da tripanossomíase americana. Neste último, a suramina tem sido utilizada em associação com outros fármacos, permitindo a diminuição da dose utilizada em monoterapias (Jennings *et al*, 2002; Amin *et al*, 2008). Desta forma, a Suramina poderia ser utilizada em experimentos, em associação com outros fármacos já utilizados para o tratamento da doença de Chagas; visando principalmente a diminuição das doses e dos efeitos colaterais causados por eles.

Em relação aos ensaios utilizando diferentes concentrações do inibidor GdCl₃, foi observado que a concentração de 100µm não foi capaz de reduzir o pico de parasitemia, entretanto, este foi retardado, ocorrendo somente no 19º dia de infecção. O aumento da concentração do inibidor para 300µm provocou uma redução significativa do pico de parasitemia e o aumento na sobrevivência dos animais para 50%. Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos por Santos, 2008; o qual verificou que a concentração de 100µm não atinge o efeito inibitório máximo da atividade ectonucleotídica em parasitos vivos e na NTPDase-I recombinante purificada; sendo o efeito inibitório máximo obtido quando a concentração de 300µm é utilizada diretamente nos parasitos. Por outro lado esta droga não foi capaz de inibir significativamente a atividade nucleotídica da NTPDase-I recombinante. Sugerindo, desta forma que o GdCl₃ tenha efetivamente um efeito sobre alguma ecto-nucleotidase do parasito que pode ser provavelmente diferente da NTPDase-I, que diretamente afetaria o curso da infecção.

Neste sentido é importante salientar que tanto *Trypanosoma brucei* quanto diferentes espécies de *Leishmania* têm descritos em seus genomas duas isoformas de E-NTPDases e que *T. cruzi* até o momento apresenta somente um gene desta família de enzimas (Fietto *et al*. 2004). Porém ainda é possível que a segunda isoforma de *T. cruzi* não tenha sido ainda descrita porque seu genoma não foi sequenciado completamente (El-Sayed *et al*. 2005). Pode ser que a ação do inibidor GdCl₃ observada nos parasitos vivos e não observada na proteína recombinante seja relacionada com esta outra isoforma de E-NTPDase ainda não descrita. Outra possibilidade é que exista outra ectonucleotidase de *T. cruzi* de outra família gênica que possa ser alvo deste inibidor, ou ainda que a NTPDase-I recombinante expressa em sistema bacteriano não esteja em

uma conformação nativa susceptível ao inibidor ou que esta ação dependa de algo inerente ao parasito que no sistema purificado possa ter sido descartado.

Sendo o efeito do $GdCl_3$ mais pronunciado que o da suramina, podemos sugerir que, apesar do bloqueio da NTPDase-I não ser maior para o $GdCl_3$ do que para a Suramina (Freitas, 2008), o primeiro possa ser um inibidor com maior afinidade pela enzima, permanecendo ligado por mais tempo mesmo após a inoculação. Uma hipótese alternativa é que o $GdCl_3$ possa induzir modificações na proteína que a afete estruturalmente, bloqueando também algum outro papel que a mesma possa exercer durante a infecção (como a participação na adesão celular, visto que este gene tem predito um sinal de ligação à fibronectina ainda não estudado). Uma terceira explicação para o maior efeito do $GdCl_3$ pode ser que, além da NTPDase-I, este inibidor possa afetar algum outro alvo no parasito, gerando um efeito sinérgico e potencializando o efeito do mesmo sob a infecção pelo *T. cruzi*.

Outro ponto importante é que o $GdCl_3$ tem sido descrito como bloqueador de canais de cálcio em células humanas (Babich et al, 2005) e diversos trabalhos têm demonstrado que no momento da infecção pelo *T. cruzi*, vias de sinalização são disparadas tanto no parasito quanto no hospedeiro, culminando em um aumento dos níveis intracelulares de cálcio em ambos (Docampo & Moreno, 1996; Burleigh et al, 2002; Yoshida, 2006). Este fato seria imprescindível para a invasão das células do hospedeiro pelo *T. cruzi*. Desta forma o $GdCl_3$ poderia estar bloqueando canais de cálcio na superfície do parasito, impedindo o aumento das concentrações intracelulares de cálcio, inibindo assim a penetração dos mesmos nas células hospedeiras. Esta hipótese explicaria o fato da perda de viabilidade do parasito quando este foi incubado com a concentração de 1mM do inibidor.

Sendo o $GdCl_3$ utilizado na prática médica em líquidos de produção de contraste para exames de tomografia computadorizada pode-se imaginar que o mesmo possa ser utilizado em humanos como um possível tratamento para a Doença de Chagas, porém isto tem que ser ainda criteriosamente estudado, pois este composto na clínica médica não é utilizado de forma livre (íon) como foi usado neste projeto, sendo nesta condição considerado tóxico e os compostos derivados de Gd usados na medicina não foram avaliados neste estudo.

Diferentes concentrações do inibidor ARL 67156 também foram avaliadas e os resultados demonstram que a concentração mais efetiva na alteração do curso da infecção pelo *T. cruzi* foi a de 300 μ m, a qual foi capaz de reduzir significativamente o

pico de parasitemia e aumentar a sobrevivência dos animais. Os resultados obtidos para o inibidor ARL também corroboram os dados de Santos, 2008; o qual verificou que a concentração de 300µm foi a mais efetiva na inibição da atividade NTPDásica nos parasitos vivos. Porém na NTPDase-I purificada o mesmo efeito não foi observado e outras concentrações de inibidor não foram usadas. Desta forma, o efeito biológico deste inibidor observado na infecção de camundongos pode estar relacionado ao efeito direto sobre alguma ecto-nucleotidase do parasito que pode ser diferente da NTPDase-I como discutido anteriormente para o inibidor GdCl₃.

Levando-se em consideração que todos estes experimentos foram feitos tratando-se os parasitos derivados de cultura celular, com cada inibidor separadamente nas concentrações mencionadas; e que somente após centrifugação, lavagem e ressuspensão em meio sem inibidores é que eles foram utilizados para o inóculo em camundongos, pode-se pressupor que qualquer efeito observado seja preponderantemente relativo ao efeito dos inibidores sobre o parasito e não sobre o hospedeiro. Portanto, podemos inferir, com certa segurança, que a inibição do metabolismo extracelular de nucleotídeos de adenina surge agora efetivamente como um novo alvo para o bloqueio da infecção pelo *T. cruzi*.

Em um segundo momento do nosso trabalho, foi utilizada a concentração dos inibidores que teve maior efeito sob o curso da infecção pelo *T. cruzi*, a fim de se avaliar se esta inibição foi capaz de promover alterações no perfil de resposta imune do hospedeiro; já que na literatura, diversos trabalhos têm sugerido a participação das ecto-nucleotidasas na modulação da resposta inflamatória, via hidrólise de nucleotídeos extracelulares (Kannan *et al*, 2002; Langston *et al*, 2003; Leal *et al*, 2005; Atkinson *et al*, 2006; Bours *et al*, 2006).

Inicialmente, foi avaliada a expressão das citocinas INF-γ e IL-10 no coração dos camundongos dos diferentes grupos experimentais, no 8^o e 15^o dias de infecção (Gráficos 7 e 8). Os resultados demonstram que no 8^o dia de infecção ocorreu uma tendência ao aumento da expressão de INF-γ no coração dos animais dos grupos tratados com os inibidores GdCl₃ e ARL em relação ao grupo controle infectado. Neste mesmo ponto da infecção, os grupos tratados com a Suramina e GdCl₃ apresentaram níveis similares de expressão de IL-10 no coração em relação ao controle infectado. No grupo tratado com o inibidor ARL esta expressão se apresentou diminuída. Estes dados nos permitem sugerir que possivelmente a inibição de ecto-nucleotidasas induziu, nos momentos iniciais da infecção, uma estimulação dos mecanismos inflamatórios do

hospedeiro, controlando o parasitismo de forma mais efetiva e, portanto reduzindo o pico de parasitemia em relação ao grupo controle.

Estudos com diferentes parasitos têm sugerido o papel das ecto-nucleotidases como fator de virulência, evidenciado principalmente à maior atividade ecto-nucleotidásica em isolados virulentos de diferentes espécies de parasitos (Nakkar *et al*, 1998 ; Barros *et al*, 2000 ; Berredo-Pinho *et al*, 2001; Sisons *et al*, 2004; Maioli *et al*, 2004).

Marques da Silva (2008) verificou que a adição de adenosina no momento do inóculo de promastigotas metacíclicas de *L. brasiliensis* em camundongos C57BL/6 resultou em um aumento do tamanho da lesão na pata dos camundongos, bem como no aumento do parasitismo; evidenciando, desta forma que a redução nos níveis de ATP_e pela ação das ecto-nucleotidases na superfície do parasito e a conseqüente elevação dos níveis de ADO_e são importantes para o estabelecimento da infecção.

O ATP_e é uma molécula conhecida por estimular mecanismos inflamatórios, atuando como um “sinal de perigo” para a célula. Sua ação é dependente da expressão de receptores específicos na superfície das células-alvo. Células do sistema imune expressam diferentes tipos de receptores purinérgicos e, portanto sua função pode ser regulada pela alteração da concentração dos nucleotídeos no compartimento extracelular. O ATP_e age estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, aumentando a migração de células para o sítio de infecção; além disso ativa mecanismos efetores, tais como, produção de NO por macrófagos (Kannan, 2002; Bours *et al*, 2006).

Desta forma, as ecto-nucleotidases, incluindo a NTPDase-I, presentes na superfície do *T. cruzi*, poderiam estar contribuindo para a modulação da resposta do hospedeiro contra o parasito, através da diminuição da concentração do ATP_e e portanto reduzindo a ativação dos mecanismos inflamatórios; favorecendo desta forma o estabelecimento da infecção.

Os dados da expressão de citocinas são fortalecidos pelos resultados obtidos na dosagem sérica de INF- γ , a qual demonstrou uma tendência à maior produção desta citocina nos grupos tratados com os inibidores, tanto no 8^o quanto no 15^o dia após infecção. Ao mesmo tempo, nossos dados mostram uma diminuição na produção de IL-10 nestes grupos em relação ao grupo controle infectado. Desta forma, fica evidenciado que o pré-tratamento dos parasitos foi capaz de alterar a resposta imune do hospedeiro, através do bloqueio da hidrólise de ATP_e pela apirase, de forma que mecanismos

inflamatórios foram estimulados pelo aumento da concentração extracelular de ATP; contribuindo para o controle do parasitismo.

Uma vez avaliada a influência dos inibidores na resposta imune do hospedeiro, em uma última abordagem deste trabalho, foi verificado se este efeito se estendia à inflamação no coração dos camundongos inoculados com parasitos pré-tratados com os inibidores da apirase; para isto quantificamos as células inflamatórias em diferentes dias da infecção (8^o e 15^o dia). Os resultados estão apresentados no Gráfico 11. Nossos dados demonstram que, no 8^o dia de infecção, houve uma tendência à uma redução no número de células inflamatórias no coração nos grupos pré-tratados com os inibidores em relação ao controle infectado. No 15^o dia, os grupos pré-tratado com o inibidor Suramina e com o ARL apresentaram um aumento no número de células inflamatórias.

No grupo tratado com o GdCl₃, houve uma correlação entre a expressão de INF- γ no coração e a quantificação da inflamação, de forma que neste grupo, tanto no 8^o quanto no 15^o dia de infecção, a expressão de INF- γ se mostrou em menor nível e houve uma redução no número de células inflamatórias em relação ao controle. Sugerindo, desta forma que este inibidor possa realmente estar agindo também de outra forma que não somente pela inibição de ecto-nucleotidases, como discutido anteriormente.

Diante do exposto até o momento, observou-se que o pré-tratamento dos parasitos com inibidores de ecto-nucleotidases da família das E-NTPDases teve um efeito mais nítido nos momentos iniciais da infecção, evidenciados pelos resultados obtidos no 8^o dia. Este fenômeno já era esperado, já que o tratamento dos parasitos com os inibidores foi realizado anteriormente ao inóculo e, portanto pode-se sugerir que com os ciclos de replicação intracelular do parasito no hospedeiro vertebrado ocorra uma perda do efeito destes inibidores. Esta conclusão é reforçada pelos dados de Santos e colaboradores (2008) que mostram a ação destes mesmos inibidores como bloqueadores da capacidade infectiva dos parasitos em células de mamíferos.

Neste ponto da infecção, os três inibidores utilizados provocaram uma redução do pico de parasitemia, aumento da expressão de INF- γ (exceto o grupo Suramina), aumento dos níveis séricos de INF- γ , nível basal de IL-10 e redução na intensidade da inflamação no coração dos animais. Estes eventos, de certa forma contribuíram para o aumento da sobrevida dos animais inoculados com parasitos pré-tratados com os inibidores.

No 15^o dia de infecção, os efeitos foram menos pronunciados, entretanto resultantes dos eventos ocorridos nos momentos iniciais da infecção. Os grupos pré-tratados com os inibidores continuaram a produzir níveis mais elevados de INF- γ em relação ao grupo controle infectado, entretanto, somente no grupo pré-tratado com o ARL foi detectado maior nível de IL-10; esta produção poderia estar associada ao aumento da sobrevivência dos animais deste grupo. Neste ponto da infecção a expressão de INF- γ e IL-10 nos grupos GdCl₃ e ARL foi reduzida em relação ao controle; enquanto para o grupo Suramina houve um aumento da expressão de ambas as citocinas.

Portanto, os resultados obtidos neste trabalho nos permitem um melhor entendimento da participação das ecto-nucleotidasas nos eventos iniciais da infecção pelo *T. cruzi*; bem como o seu papel como fator de virulência usado por este parasito para determinar o estabelecimento da infecção; através da modulação da resposta do hospedeiro via hidrólise de nucleotídeos de adenina; evidenciando desta forma que a inibição do metabolismo extracelular de nucleotídeos de adenina surge agora efetivamente como um novo alvo para o bloqueio da infecção pelo *T. cruzi*.

É importante ressaltar o caráter inovador deste estudo, já que trata-se do primeiro trabalho a avaliar a interferência no metabolismo extracelular de nucleotídeos pelo *T. cruzi*, através do uso de inibidores específicos, no estabelecimento da infecção experimental; fornecendo evidências importantes de que a via metabólica estudada surge como alvo para novos estudos em busca ferramentas terapêuticas mais racionais para o tratamento da Doença de Chagas.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que as ecto-nucleotidases do *T. cruzi* têm grande importância no estabelecimento da infecção por este parasito, possivelmente devido a ação de enzimas da família das E-NTPDases na diminuição da concentração de ATP_e, ocasionando uma diminuição da ação imunoestimuladora deste nucleotídeo no organismo do hospedeiro. Portanto, a inibição do metabolismo extracelular de nucleotídeos de adenina surge agora como um novo alvo para o bloqueio da infecção por este parasito; através de uma quimioterapia mais específica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahamsohn IA and Coffman RL. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN- γ , and IL-12 Regulate Innate and Acquired Immunity to Infection. *Experimental Parasitology*. 1996. 84: 231–244.
- Amin DN, Masocha W, Ngan'dwe K, Rottenberg M, Kristensson K. Suramin and minocycline treatment of experimental African trypanosomiasis at an early stage of parasite brain invasion. *Acta Tropica*. 2008. 106: 72–74.
- Asai T, Takeuchi T, Diffenderfer J and Sibley LD. Identification of small-molecule inhibitors of nucleoside triphosphate hydrolase in *T. gondii*. *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*. 46 (8): 2393-2399.
- Atayde, VD, Neira I, Cortez M, Ferreira D, Freymuller E and Yoshida N. Molecular basis of non-virulence of *Trypanosoma cruzi* clone CL-14. *International Journal for Parasitology* 31(2004):851-860.
- Atkinson B, Dwyer K, Enjoji K and Robson SC. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. *Blood Cells, Molecules & Diseases* 36 (2006): 217-222.
- Babich O, Isaev D and Shirokov R. Role of extracellular Ca²⁺ in gating of CaV1.2 channels. *J Physiol*. 2005. 565.3: 709–715.
- Bahia-Oliveira LMG, Gomes JAS, Cancado JR, Ferrari TC, Lemos EM, Luz ZMP, Moreira MC, Gazzinelli G and Correa-Oliveira R. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. *The Journal of Infections Diseases*. 2000.182: 634-638.
- Bhargava S, Hotz B, Hines OJ, Reber HA, Buhr HJ, Hotz HG. Suramin Inhibits Not Only Tumor Growth and Metastasis but Also Angiogenesis in Experimental Pancreatic Cancer. *J Gastrointest Surg* (2007) 11:171–178.

- 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 March 15; 375(2):304-14.
- Berrêdo-Pinho M, Peres-Sampaio CE, Chrispim CCM, Belmont-Firpo R, Lemos AP, Martiny A, Vannier-Santos MA and Meyer-Fernandes JR.(2001) A Mg-dependent ecto-atpase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. Arch. Biochem. Biophys. 391:16-24.
- Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renault H, Bartholomeu DC, Lennard NJ, Caler E, Hamlin NE, Haas B, Böhme U, Hannick L, Aslett MA, Shallom J, Marcello L, Hou L, Wickstead B, Alsmark UC, Arrowsmith C, Atkin RJ, Barron AJ, Bringaud F, Brooks K, Carrington M, Cherevach I, Chillingworth TJ, Churcher C, Clark LN, Corton CH, Cronin A, Davies RM, Doggett J, Djikeng A, Feldblyum T, Field MC, Fraser A, Goodhead I, Hance Z, Harper D, Harris BR, Hauser H, Hostetler J, Ivens A, Jagels K, Johnson D, Johnson J, Jones K, Kerhornou AX, Koo H, Larke N, Landfear S, Larkin C, Leech V, Line A, Lord A, Macleod A, Mooney PJ, Moule S, Martin DM, Morgan GW, Mungall K, Norbertczak H, Ormond D, Pai G, Peacock CS, Peterson J, Quail MA, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Reitter C, Salzberg SL, Sanders M, Schobel S, Sharp S, Simmonds M, Simpson AJ, Tallon L, Turner CM, Tait A, Tivey AR, Van Aken S, Walker D, Wanless D, Wang S, White B, White O, Whitehead S, Woodward J, Wortman J, Adams MD, Embley TM, Gull K, Ullu E, Barry JD, Fairlamb AH, Opperdoes F, Barrell BG, Donelson JE, Hall N, Fraser CM, Melville SE, El-Sayed NM. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. Science. 2005. 309(5733):416-422.
- Bissagio DFR, Peres-Sampaio CE, Meyer-Fernandes JR and Souto-Padron T. (2003). Ecto-ATPase activity on the surface of *T. cruzi* and its possible role in the parasite-host cell interaction. Parasitol. Res. 91:273-282.
- Bours MJL, Swennen ELR, Di Virgilio F, Cronstein BN and Dagnelie PC. Adenosina 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. Pharmacology & Therapeutics. 2006. 112: 358-404.

- Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 1962. 4: 389-396.
- Brener Z. (1984) Recent advances in the chemotherapy of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 79: 149-155.
- Burnstock G. Purinergic signaling. British Journal of Pharmacology. 2006. 147: 172-181.
- Coura JR, Castro SL. (2002) A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 97(1): 3-24.
- Dias JCP. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2006, 39(4): 370-375.
- DeMarco R, Kowaltowski AT, Mortara RA and Verjovski-Almeida S. Molecular characterization and immunolocalization of *Schistosoma mansoni* ATP-diphosphohydrolase. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2003. (307): 831-838.
- DosReis GA. Cell-mediated Immunity in Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. Parasitology Today. 1997. 13(9): 335-342.
- Du X, Guo C, Hansell E, Doyle PS, Caffrey CR, Holler TP, Mckerrow JH and Cohen FE. Synthesis and Structure – Activity Relationship Study of Potent Trypanocidal Thio Semicarbazone Inhibitors of the Trypanosomal Cysteine Protease Cruzain. J. Med. Chem. 2002. 45: 2695-2707.
- Duhant X, Schandené L, Bruyns C, Gonzales NS, Goldman M, Jean-Marie B and Communi D. Extracellular Adenine Nucleotides Inhibit the Activation of Human CD4⁺ T Lymphocytes. Journal of Immunology. 2002:15-21.

- Dutra WO, Rocha MOC and Teixeira MM. The clinical immunology of human Chagas disease. *TRENDS in Parasitology*. 2005: 1-7.

- El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 2005. 309 (5733): 409-415.

- Fietto JLR, De Marco R, Nascimento IM, Carvalho TMU, Souza W, Bahia MT, Alves MJM and Verjovski-Almeida S. Characterization and Immunolocalization of a NTP-Diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004. 316 (2): 454-460.

- Freitas JLP, Lion MF and Tartari JTA. Resultados de uma investigação sobre moléstia de Chagas realizada no município de Marília e outros, com estudo clínico de dois casos agudos da doença. *Rev. Hosp. Clin. São Paulo*. v.8, p.81-92, 1953.

- Fujji N, Mallari JP, Hansel EJ, Mackey Z, Doyle P, Zhou YM, Gut J, Rosenthal PJ, Mckerrow JH and Guy RK. Discovery of potent thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain end cruzain. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2005. 15: 121-123.

Formatado: Inglês (EUA)

- Guedes, PMM, Fietto, JLR, De Lana, M and Bahia, MT. Advances in Chagas Disease Chemotherapy. CMCAIA, 2006, in press.
- Jannin J, Villa L. (2007) An overview of Chagas disease treatment. Mem Inst Oswaldo Cruz. 102(1): 95-97.
- Jennings FW, Rodgers J, Bradley B, Gettinby G, Kennedy PGE, Murray M. Human African trypanosomiasis: Potential therapeutic benefits of an alternative suramin and melarsoprol regimen. Parasitology International. 2002. 51: 381–388.
- Jesus JB, Lopes AHC and Meyer-Fernandes JR. Characterization of an ecto-ATPase of *Tritrichomonas foetus*. Venerinary Parasitology 103 (2002):29-42.
- Kannan S. E-NTPase/NTPDase: potential role as a regulatory element in inflammation. Medical Hypotheses (2002). 58(2): 527-528.
- Korten S, Badusche M, Buttner DW, Hoerauf A, Brattig N, Fleischer. Natural death of adult *Onchocerca volvulus* and filaricidal effects of doxycycline induce local FOXP3 β /CD4 β regulatory T cells and granzyme expression. Microbes and Infection 10 (2008): 313-324.
- Langston HP, Ke Y, Gewirts AT, Dombrowski KE and Kapp JA. Secretion of IL-2 and INF- γ , But Not IL-4, By Antigen-Specific T cells Requires Extracellular ATP. Journal of Immunology. 2003:2962-2970.
- Levano-Garcia J, Mortara RA, Verjovski-Almeida S, DeMarco R. Characterization of *Schistosoma mansoni* ATPDase2 gene, a novel apyrase family member. Biochemical and Biophysical Research Communications 352 (2007): 384–389.
- Mantuano-Barradas M, Henrique-Pons A, Araújo-Jorge TC, Di Virgilio F, Coutinho-Silva R and Persechini PM. Extracellular ATP induces cell death in CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ double-positive thymocytes in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Microbes and Infection 5(2003): 1363-1371.

- Marques da Silva EA. Influência do metabolismo extracelular de ATP em infecções por parasitos do gênero *Leishmania*. 2008. Tese (Doutorado em Imunobiologia de Protozoários). Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG.

- Matos JA, Borges FP, Tasca T, Bogo MR, De carli GA, Fauth MG, Dias RD and Bonan CD. Characterization of na ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. International Journal of Parasitology 31 (2001):770-775.

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

- Nakkar V, Beckers CJ, Polotsky V, Joiner KA. Basis for substrate specificity of the *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. Mol Biochem Parasitol. 1998 Nov 30; 97(1-2): 209-220.

- Oliveira MM; Einicker-Lamas M. Inositol Metabolism in *Trypanosoma cruzi*: Potent Target for Chemotherapy Against Chagas'Disease. Na. Acad. Brás. Ci. 2000.72(3): 413-419.

- Opperdoes FR and Michells PAM. Enzymes of carbohydrate metabolism as potential drug targets. International Journal for Parasitology. 2001. 31: 482-490.

- Pinheiro CM, Martins-Duarte ES, Ferraro RB, Fonseca de Souza AL, Gomes MT, Lopes AH, Vannier-Santos MA, Santos AL, Meyer-Fernandes JR. *Leishmania amazonensis*: Biological and Biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. Exp Parasitol. 2006 Apr 5, in press, on line.

- Rebolo J. Suramina: farmacología y eficacia antitumoral de un antiguo parasiticida. *Medicina Clínica*. 1994. 102(8): 301-305.
- Sansom FM, Newton HJ, Crikis S, Cianciotto NP, Cowan PJ, d'Apice AJF and Hartland EL. A bacterial ecto-triphosphate diphosphohydrolase similar to human CD39 is essential for intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Cellular Microbiology*. 2007: 1-14.
- Santos RF. Caracterização e avaliação da atividade Ecto-nucleotidásica do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com a infectividade in vitro. 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular). Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, MG.
- Silva LHP, Nussenzweig, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.*, v.20, p.191-203, 1953.
- Sissons J, Alsam S, Jayasekera S and Khan NA. Ecto-ATPases of clinical and non-clinical isolates of *Acanthamoeba*. *Microbial Pathogenesis* 37 (2004): 231-239.
- Soares MBP, Pontes-de-Carvalho L and Ribeiro-dos-Santos R. The pathogenesis of Chagas` disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An.Acad.Bras.Cienc.* 2001. 73(4): 547-557.
- Tarleton RL. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curren Opinion in Immunology*. 2007. 19: 430-434.
- Teixeira MM, Gazzinelli RT and Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *TRENDS in Parasitology*. 2002. 18: 262-265.
- Thomas C, Rajagopal A, Windsor B, Dudler R, Lloyd Aand Roux SJ. A role for Ectophosphatase in Xenobiotic Resistance. *The plant cell*. 2000 Apri. 12: 519-533.

- Urbina JA; Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. Trends in Parasitology. 2003. 19 (11): 495-501.
- Vasconcelos EG, Ferreira ST, Carvalho TM, De Souza W, Kettlun AM, Mancilla M, Valenzuela MA and Verjovski-Almeida S. 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(36):22139-45.
- Verlinde CLMJ, Hannaert V, Blonski C, Willson M, Périé JJ, Foyhergill-GilmoreLA, Opperdoes FR, Gelb MH, Hol WGJ and Michells PAM. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. Drug Resistance Updates. 2001. 4: 50–65.
- Zimmermann H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. TIPS. 1999; 20:231-236.
- Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2000. 362: 299-309.