UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – CBIOL

Laboratório de Imunobiologia da Inflamação - LABIIN

Atividade reguladora da via de degradação extracelular de nucleotídeos de adenina na virulência de diferentes cepas e formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi in vitro* e *in vivo*

ANA LUÍSA JUNQUEIRA LEITE

OURO PRETO- MG

ABRIL, 2020

ANA LUÍSA JUNQUEIRA LEITE

Atividade reguladora da via de degradação extracelular de nucleotídeos de adenina na virulência de diferentes cepas e formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi in vitro* e *in vivo*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do grau de doutora em Ciências Biológicas, área de concentração Imunobiologia de Protozoários.

Orientador: Prof. Dr. André Talvani

OURO PRETO- MG

ABRIL, 2020

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

L533a Leite, Ana Luisa Junqueira.
Atividade reguladora da via de degradação extracelular de nucleotídeos de adenina na virulência de diferentes cepas e formas evolutivas de Trypanosoma cruzi in vitro e in vivo. [manuscrito] / Ana Luisa Junqueira Leite. - 2020.
69 f.

Orientador: Prof. Dr. André Talvani Pedrosa da Silva.
Tese (Doutorado). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. Trypanosoma cruzi. 2. Enzimas - Ectonucleotidase. 3. Inflamação. I. Silva, André Talvani Pedrosa da. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 616.937

Bibliotecário(a) Responsável: Sione Galvão Rodrigues - CRB / 2526

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
INSTITUTO DE CIENCIAS EXATAS E BIOLOGICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Luísa Junqueira Leite

Doutorado defendido no CBIOL: "Atividade reguladora da via de degradação extracelular de nucleotídeos de adenina na virulência de diferentes cepas e formas evolutivas de Trypanosoma cruzi in vitro e in vivo"

Membros da banca:

Prof. Bruno Mendes Roatt - Doutor - UFOP

Prof. Eduardo de Almeida Marques da Silva - Doutor - UFV

Prof. Gustavo Costa Bressan - Doutor - UFV

Prof. William de Castro Borges - Doutor - UFOP

Prof. André Talvani - Doutor - UFOP (orientador)

Defesa ocorrida de forma remota em 16 de abril de 2020 e, versão final da tese corrigida e aprovado pelo orientador em 07 de setembro de 2020.

De acordo

Prof. Andre Talvani Pedrosa da Silva

Orientador (SIAPE 15.444.88)

De acordo

Professor (a) Orientador (a)

Documento assinado eletronicamente por **Andre Talvani Pedrosa da Silva**, **PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 07/09/2020, às 16:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0 , informando o código verificador **0080445** e o código CRC **3F288C57**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.006313/2020-11 SEI nº 0080445

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000
Telefone: - www.ufop.br

COLABORADORES:

Laboratório de Imunobiologia da Inflamação- NUPEB/UFOP

Msc. Ludmilla Walter dos Reis Mota

Msc. Daniela Silva de Oliveira

Laboratório de Doença de Chagas- NUPEB/UFOP

Dra. Marta de Lana

Laboratório de Imunoparasitologia- NUPEB/UFOP

Dr. Luís Carlos Crocco Afonso

Msc. Luana Cristina Faria Carvalho

Dra. Fernanda Francine Zimmermann

Laboratório de Morfopatologia- NUPEB/UFOP

Dra. Paula Melo de Abreu Vieira

Laboratório Multiusuários de Microscopia - NUPEB/UFOP

Dra. Nívia Carolina Nogueira

“Never forget who you are. You are more than what you have become!

You must take your place in the circle of life”

The Lion King

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida, inteligência e saúde. Por me conceder sabedoria, garra e persistência em todos momentos dessa trajetória.

Aos meus pais por todo carinho, amor incondicional e paciência. Obrigada por sempre estarem ao meu lado, me apoiando para que eu pudesse ir atrás dos meus sonhos.

Ao meu esposo Júlio pela cumplicidade, amor, compreensão, paciência (sei que houveram dias que não foram fáceis), por sempre me incentivar e fazer meus dias mais felizes. Amo você!

Ao professor André Talvani meu agradecimento pela orientação, oportunidade, amizade, confiança depositada em mim e pelos 10 anos de convivência.

À professora Marta de Lana pela atenção, disponibilidade e por todos ensinamentos. Por pegar na minha mão e não me deixar cair no momento em que pensei em desistir. A senhora é um exemplo para mim. Obrigada de coração!

Ao professor Luís Carlos Crocco Afonso, obrigada pela sua atenção, por sanar as minhas dúvidas sempre solícito e disposto a contribuir de maneira efetiva para a realização deste trabalho. Agradeço também pelos ensinamentos de sinalização purinérgica e pela oportunidade de aprender/realizar as técnicas enzimáticas em seu laboratório, além de gentilmente nos ceder alguns insumos essenciais para o estudo.

À professora Paula pelo aprendizado, pelas motivações e gentileza de estar sempre disposta a ajudar. Obrigada por colaborar conosco.

À Carolzinha pela disponibilidade em colaborar com as análises histológicas, sempre solícita e carinhosa com todos.

À Luana e à Fernanda pela ajuda nas atividades enzimáticas e por todas sugestões, incentivos e amizade.

À minha amiga Ludmilla por ser luz na minha vida, me ajudando a seguir a caminhada com mais leveza. Obrigada pelo seu carinho e essa amizade tão linda que construímos.

À amiga Laís, que vivenciou e compartilhou de todos os momentos comigo tornando a minha jornada mais suave. Sua força e seu companheirismo tornou-me uma pessoa mais consciente.

A todos os colegas do LABIIN por tornarem o trabalho mais prazeroso e pela agradável convivência. Agradecimento especial para Dani, Marcos Beiral e Tamiles por todo auxílio nos experimentos, pela companhia e conversas deixando a rotina mais harmoniosa.

À UFOP minha gratidão por me acolher e proporcionar um grande aprendizado. E ao CBIOL/NUPEB pela oportunidade de cursar uma pós-graduação de qualidade.

Às agências financiadoras: CNPq, CAPES e FAPEMIG.

Foi um caminho árduo mas sei que nada disso seria possível sem algumas pessoas especiais. Gratidão a todas as pessoas que me transmitiram força e confiança.

RESUMO

Populações distintas de *Trypanosoma cruzi* interagem com células musculares cardíacas de mamíferos, causando diferentes padrões de inflamação e baixa funcionalidade do coração. Durante a infecção pelo *T. cruzi*, o ATP extracelular é hidrolisado em seu componente monofosfatado (AMP), com base na infectividade, virulência e regulação da resposta inflamatória. *T. cruzi* realiza essa hidrólise através da ectonucleotidase, TcNTPDase-1. Este estudo teve como objetivo avaliar o papel da via de degradação extracelular de nucleotídeos de adenina em culturas ricas em formas tripomastigotas metacíclicas (CTM) e formas tripomastigotas derivadas de cultura celular (TC) das cepas Colombiana (unidade de tipagem discreta - DTU I), VL-10 (DTU II) e CL (DTU VI) de *T. cruzi*. Para isso, medimos a atividade da ectonucleotidase no parasito e realizamos a infecção em células J774 infectadas e em camundongos C57BL/6 infectados com parasitos pré-tratados ou não com suramina para avaliar o perfil cardíaco parasitário e inflamatório na fase aguda da infecção. Nossos dados indicaram uma atividade mais alta para hidrólise de ATP no CTM da cepa Colombiana em comparação com as das cepas VL-10 e CL. A TC da cepa CL apresentou maior capacidade de hidrolisar o ATP do que as cepas Colombiana e VL-10. A suramina inibiu a hidrólise de ATP em todas as formas e cepas do parasito estudadas. A infecção em células J774 com parasitos pré-tratados com suramina foi reduzida e aumentou a produção de nitrito *in vitro*. Estudos *in vivo* mostraram uma redução do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco de animais infectados com TC da cepa Colombiana pré-tratado com suramina. Em conclusão, a atividade dessa ectonucleotidase nas formas tripomastigotas direciona parte das características biológicas observadas em DTUs distintas e pode induzir patogênese cardíaca durante a infecção por *T. cruzi*.

ABSTRACT

Distinct populations of *Trypanosoma cruzi* interact with mammalian cardiac muscle cells causing different inflammation patterns and low heart functionality. During *T. cruzi* infection, the extracellular ATP is hydrolyzed to tri- and/or diphosphate nucleotides, based on the infectivity, virulence, and regulation of the inflammatory response. *T. cruzi* carries out this hydrolysis through the *T. cruzi* ectonucleotidase, NTPDase-1 (TcNTPDase-1). This study aimed to evaluate the role of ectonucleotidase in culture rich in metacyclic trypomastigote forms (CMT) and cell culture-derived trypomastigote forms (CT) from Colombiana (*discrete typing unit* - DTU I), VL-10 (DTU II), and CL (DTU VI) strains of *T. cruzi*. For this, we measured ectonucleotide activity in suramin-treated and untreated parasites and infected J774 cells and C57BL/6 mice with suramin pre-treated parasites to assess parasitic and inflammatory cardiac profile in the acute phase of infection. Our data indicated a higher ectonucleotide activity for ATP in CMT from Colombiana strain in comparison to those from VL-10 and CL strains. The CT from CL strain presented higher capacity to hydrolyze ATP than those from Colombiana and VL-10 strains. Suramin inhibited ATP hydrolysis in all studied parasite forms and strains. Suramin pre-treated parasites reduced J774 cell infection and increased nitrite production *in vitro*. *In vivo* studies showed a reduction of inflammatory infiltrate in the cardiac tissues of animals infected with CT from suramin pre-treated Colombiana strain. In conclusion, ectonucleotide activity in trypomastigotes forms drives part of the biological characteristics observed in distinct DTUs and may induce cardiac pathogenesis during *T. cruzi* infection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos de interação das formas tripomastigotas metacíclicas e tripomastigotas de cultivo celular em células de mamíferos. 19

Figura 2: Componentes do sistema de sinalização purinérgica.. 21

Figura 3: Atividade ectonucleotidásica e efeito do inibidor das E-NTPDases, suramina, na hidrólise de ATP e ADP da cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas de diferentes cepas do *T. cruzi*. 36

Figura 4: Atividade ectonucleotidásica e efeito do inibidor da E-NTPDases, suramina, na hidrólise de ATP e ADP de formas tripomastigotas derivadas de cultura de células de diferentes cepas do *T. cruzi*. 37

Figura 5: Atividade da Adenosina Deaminase (ADA) da cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas e de formas tripomastigotas derivadas de cultura de células de diferentes cepas do *T. cruzi*..... 38

Figura 6: Infecção de células J774 por cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas de diferentes cepas do *T. cruzi* e produção de óxido nítrico..... 40

Figura 7: Infecção de células J774 por formas tripomastigotas derivadas de cultura de células de diferentes cepas do *T. cruzi* e produção de óxido nítrico. 41

Figura 8: Curvas de parasitemia de camundongos C57BL/6 infectados com 1.000 formas da cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas das cepas Colombiana, VL-10 e CL do *T. cruzi*. 43

Figura 9: Curvas de parasitemia de camundongos C57BL/6 infectados com 1.000 formas tripomastigotas derivadas de cultura de células das cepas Colombiana, VL-10 e CL do *T. cruzi*..... 44

Figura 10: Fotomicrografias representativas do coração e quantificação do processo inflamatório no músculo cardíaco de camundongos infectados com 1.000 formas da cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas das cepas Colombiana, VL-10 e CL do *T. cruzi*..... 46

Figura 11: Fotomicrografias representativas do coração e quantificação do processo inflamatório no músculo cardíaco de camundongos infectados com 1.000 formas tripomastigotas derivadas de cultura de células das cepas Colombiana, VL-10 e CL do *T. cruzi*..... 47

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA – Adenosina deaminase

ADO – Adenosina

ADP – Difosfato de adenosina

AMP – Monofosfato de adenosina

ATP – Trifosfato de adenosina

ATPe – Trifosfato de adenosina extracelular

Ca^{2+} - Forma iônica do cálcio

CD 39 – Grupamento/Cluster de diferenciação 39

CD 73 – Grupamento/Cluster de diferenciação 73

CTM – Cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas

DAG – Diacilglicerol

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DTU – Unidades Discretas de Tipagem

E-NPP – Ecto-nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterase

E-NTPDase – Ecto-nucleotídeo Trifosfato Difosfohidrolase

GP – Glicoproteína

IFN-y – Interferon Gama

IL-12 – Interleucina 12

IP3 – Fosfatidil Inositol Trifosfato

kDNA – DNA do Cinetoplasto

M – Concentração molar (molaridade)

Mg^{2+} - Forma iônica do magnésio

$MgCl_2$ – Cloreto de magnésio

mL – Mililitro

mM – Concentração milimolar

mmol/l – Concentração milimol por litro (molaridade)

µg – Micrograma

µl – Microlitro

µM – Concentração micromolar

µm – Micrômetro

mTOR – Alvo de rapamicina de mamíferos

NaCl – Cloreto de sódio

NH_3 – Amônia

NO – Óxido nítrico

PBS – Salina tamponada com fosfato

Pi – Fosfato inorgânico

PI3K – Proteína fosfatidilinositol 3 quinase

PKC – Proteína quinase C

PTK – Proteína tirosina quinase

SFB – Soro fetal bovino

TC – Tripomastigota derivada de cultura de células

TNF – Fator de necrose tumoral

TSSA – Antígeno de superfície de tripomastigota

U/ml – Unidade por mililitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14

1.1 Trypanosoma cruzi 14

1.2 Interação parasito- célula hospedeira 16

1.3 Sinalização purinérgica 20

1.4 Ectonucleotidases 21

1.5 Resposta imune frente à infecção pelo T. cruzi 24

1.6 Ectonucleotidases versus o processo inflamatório na infecção pelo T. cruzi 26

3. OBJETIVOS 28

3.1 Objetivo Geral 28

3.2 Objetivos específicos 28

4. MATERIAIS E MÉTODOS 29

4.1 Cepas do Trypanosoma cruzi 29

4.2 Experimentos in vitro 29

4.2.1. Obtenção do parasito 29

(i) Cultivo das formas epimastigotas 29

(ii) Obtenção da cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas 30

(iii) Obtenção de formas tripomastigotas de cultura celular 30

4.2.2 Ensaio de atividade ectonucleotidásica dos parasitos 31

4.2.3 Atividade da Adenosina Desaminase (ADA) dos parasitos 31

4.2.4 Ensaios de infectividade celular e avaliação da produção de óxido nítrico (NO) 32

4.3 Experimentos in vivo 33

4.3.1 Animais, parasitos e infecção 33

4.3.2 Processamento do tecido muscular cardíaco para microscopia óptica 33

4.3.3 Avaliação histopatológica 34

4.4 Análise estatística 34

5. RESULTADOS 35

5.1 Atividade da TcNTPDase- 1 é dependente da cepa de *T. cruzi* 35

5.2 Atividade de ADA é distinta nas diferentes cepas de *T. cruzi* 38

5.3 O pré-tratamento com suramina e o tratamento com IFN-gama interferem na infecção de células J774A.1 pelo *T. cruzi* e na produção de óxido nítrico 39

5.4 O pré-tratamento com suramina reduziu a parasitemia 42

5.5 O pré-tratamento com suramina reduziu o infiltrado inflamatório cardíaco na infecção com formas tripomastigotas derivadas de cultura de células da cepa Colombiana de *T. cruzi* 45

6. DISCUSSÃO 48

7. CONCLUSÃO 53

8. REFERÊNCIAS 54

1. INTRODUÇÃO

1.1 Trypanosoma cruzi

Trypanosoma cruzi é um protozoário hemoflagelado, pertencente à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae, que apresenta ciclo de vida heteroxênico (Chagas, 1909). A forma de transmissão natural deste agente etiológico ocorre através de insetos hematófagos (triatomíneos) pertencentes à família Reduviidae, popularmente conhecidos como barbeiros.

T. cruzi possui ampla variabilidade intra-específica tanto ao nível biológico quanto genético. Estudos envolvendo diferentes populações deste parasito demonstraram haver características variáveis entre as cepas relativas à morfologia da forma evolutiva tripomastigota sanguínea (Brener, 1965; Andrade & Andrade, 1966; Andrade, 1985); à taxa de crescimento e multiplicação em cultivo celular e acelular (Brener, 1977); ao tropismo tecidual (Melo & Brener, 1978); à virulência e patogenicidade (Andrade, 1974, 1985), à suscetibilidade aos fármacos (Filardi & Brener, 1987) e à composição antigênica (Krettli & Brener, 1982).

Com relação à variabilidade na morfologia do parasito, Carlos Chagas demonstrou o dimorfismo na espécie ao encontrar formas delgadas e largas no sangue periférico de humanos e de animais experimentalmente infectados (Chagas, 1909). Nas décadas seguintes, outros pesquisadores também estudaram este dimorfismo intraespecífico e associaram estes padrões morfológicos do parasito a características imunopatológicas da infecção (Brener 1965; Andrade, 1970), comprovando assim, que formas largas se encontravam relacionadas às cepas de baixa virulência, apresentando parasitemia baixa e de caráter miotrópico, enquanto formas delgadas estavam associadas às cepas de alta virulência, apresentando parasitemia precoce e de caráter macrofagotrópico (Brener, 1969).

A compatibilidade entre grupos geneticamente distintos deste parasito sugeriu um agrupamento, para fins de estudo e investigação científica, denominado de biodema (Andrade & Magalhães, 1997). Do mesmo modo, anteriormente, o estudo de isoenzimas presentes em populações de *T. cruzi* permitiu um novo agrupamento das diferentes cepas isoladas de vetores, animais silvestres e animais domésticos em zimodemas (Toyé 1974; Miles *et al.*, 1977; Romanha *et al.*, 1979 e 1982). *T. cruzi* exibe, portanto, um elevado grau de polimorfismo genético, tanto em seu DNA nuclear

quanto em seu cinetoplasto (kDNA) e os avanços das técnicas moleculares para o estudo da diversidade genética de *T. cruzi* permitiram, nos últimos 40 anos, gerar marcadores genotípicos polimórficos eficazes para a confirmação da homogeneidade e/ou heterogeneidade deste protozoário (Morel *et al.* 1980; Tibayrenc, 1995; Anonymous, 1999; Freitas *et al*., 2006). E, exatamente em decorrência deste progresso científico relativo à diversidade genética do *T. cruzi*, foi proposta uma nova classificação na qual um conjunto de cepas, caraterizadas por marcadores moleculares comuns, e por padrões genéticos idênticos e relacionados seria denominada de *Discrete Typing Unit* (DTU). De acordo com Brisse *et al*., 2000, a subdivisão da espécie *T. cruzi* foi proposta em seis DTUs. Após esta nova classificação, houve uma intensa investigação para se correlacionar a genética do parasito e os aspectos biológicos, clínicos e epidemiológicos da doença e, em 2009, outro consenso taxonômico para a população de *T. cruzi* foi realizado e uma nova classificação proposta. De acordo com esta classificação foi definido que a espécie *T. cruzi* seria subdividida em seis grupos denominados TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI de acordo com as análises moleculares e biológicas (Zingales *et al*., 2009).

Em relação aos isolados de parasitos pertencentes à DTU TcI, a exemplo da cepa Colombiana, apresentam elevada capacidade de infectar animais de experimentação, com um padrão parasitêmico alto, uma infecção tecidual severa (Andrade, 1985; Andrade & Magalhães, 1997; Toledo *et al.*, 2002); uma elevada eficiência para infectar e completar seu ciclo de vida no vetor (Lana *et al*., 1998); grande capacidade de multiplicação e sobrevivência em cultura acelular e celular (Andrade & Magalhães, 1997; Toledo *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2011) e uma maior resistência aos quimioterápicos tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Filardi e Brener, 1987; Revollo *et al.*, 1998). A distribuição geográfica desta DTU TcI está associada tanto ao ciclo silvestre quanto ao doméstico da infecção, onde, relatos de infecções em seres humanos são prevalentes na América Central e no norte da América do Sul, abrangendo a bacia Amazônica (Zingales *et al*., 2012). Todavia, em relação a essas variáveis, os isolados pertencentes à DTU Tc II, filogeneticamente polar ou mais distante de TcI, a exemplo das cepas VL-10 e Be-78, apresentam valores menores de parasitemia e estão relacionados com ao ciclo doméstico da infecção, sendo predominante no sul da América Latina, particularmente, nas regiões central, sul e sudeste do Brasil (Zingales *et al*., 2012).

Portanto, a variabilidade genética de *T. cruzi* é um fator determinante para o desenvolvimento e a manutenção da infecção. Da mesma forma, a invasão de distintas células de mamíferos também se constitui um fator crítico para o sucesso de sua infecção, replicação e sobrevivência no hospedeiro vertebrado.

1.2 Interação parasito- célula hospedeira

T. cruzi é um parasito intracelular obrigatório que apresenta diferentes mecanismos fisiológicos/moleculares ao invadir células de mamíferos. A internalização do parasito é feita pela forma evolutiva infectante denominada tripomastigota (metacíclica, de cultura de células/sanguínea). E este processo de invasão/internalização envolve três etapas importantes sendo conhecidas experimentalmente, apenas para as formas tripomastigotas metacíclicas de cultivo acelular e celular: (i) a adesão do parasito à célula hospedeira, (ii) o reconhecimento das proteínas de membrana do parasito pelos receptores celulares, e (iii) a sinalização intracelular promotora da instalação do parasito no ambiente intracelular (Andrade & Andrews,2004; Fernandes & Andrews, 2012).

O mecanismo de invasão da célula hospedeira pelo *T. cruzi* é acompanhado pela elevação do influxo de cálcio intracelular levando à despolimerização do citoesqueleto de actina (Rodriguez *et al*, 1995) e promovendo exocitose dos lisossomos. O modelo original de invasão das formas tripomastigotas de cultivo celular propõe que o recrutamento e fusão dos lisossomos no sítio de ligação do parasito formaria o vacúolo parasitóforo (Dvorak & Hyde, 1973; Tardieux *et al.*, 1992). No entanto, estudos anteriores demonstraram que a maioria dos parasitos adentram as células via invaginação da membrana para formar vacúolos que, posteriormente, se fundiriam aos endossomos e lisossomos (Woolsey *et al*., 2003). Esta relação entre a exocitose de lisossomos, dependente do aumento de cálcio intracelular, e a entrada de *T. cruzi* através da invaginação da membrana demonstra que a liberação da enzima lisossomal esfingomielinase pela fusão dos lisossomos com a membrana plasmática levaria a conversão da esfingomielina em ceramida, facilitando a invaginação da membrana durante a invasão do patógeno (Fernandes *et al*., 2011).

Todavia, *T. cruzi* apresenta um outro mecanismo de invasão independente de lissosomos, o qual ocorre através da fosforilação de proteínas presentes na membrana do parasito e da célula-alvo com a participação de PI3K (proteína fosfatidilinositol 3

quinase) e a geração de IP3 (fosfatidil inositol trifosfato), promotores da liberação de cálcio intracelular (Souza *et al*., 2010). Contudo, as formas infectantes do parasito utilizam mecanismos distintos para invadir as células hospedeiras, uma vez que a invasão da forma tripomastigota metacíclica é principalmente dependente de lisossomos enquanto a internalização da forma tripomastigota derivada de cultura de células apresenta-se predominantemente independente de lisossomos (Cortez *et al.*, 2016).

A complexidade dos eventos de invasão celular mostra-se acentuada de acordo com as diferenças particulares conduzidas pela genética populacional dos parasitos e, também, por características intrínsecas relativas às formas evolutivas infectivas deste protozoário, uma vez que as formas tripomastigota metacíclica e tripomastigota de cultura celular utilizam distintos grupos de moléculas de superfície na interação com componentes das células hospedeiras (Yoshida, 2006).

Dentre as glicoproteínas de superfície com propriedade de adesão celular expressas na forma tripomastigota metacíclica citam-se a glicoproteína (gp)90, a gp82, a gp30 e a gp35/50. Estas moléculas com propriedades imunogênicas são identificadas diferentemente, em distintas cepas do parasito e se ligam às células-alvo ativando vias de sinalização para o favorecimento de uma internalização eficiente por este parasito. A glicoproteína gp82, por exemplo, se liga à mucina gástrica das células epiteliais durante a infecção da mucosa gástrica (**Figura 1A**) (Cortez *et al*., 2014). Já a gp30, também envolvida na internalização do parasito, é expressa em cepas de *T. cruzi* que são deficientes em gp82, ligando-se às células-alvo do mesmo modo que a gp82 (Cortez *et al*., 2003, 2012a). A ligação da gp82 ao receptor leva à ativação da proteína fosfolipase C gerando diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3), tanto na membrana plasmática do parasito quanto da célula hospedeira. A ativação da proteína quinase C (PKC) pelo DAG leva à produção de IP3, o qual promove a liberação de cálcio intracelular dos compartimentos sensíveis a esta molécula (Ferreira *et al*., 2006; Maeda *et al*., 2012). A sinalização gerada pela gp82 no parasito leva também à ativação de fosfatidilinostiol 3 quinase (PI3K) e da proteína tirosina quinase (PTK), que, por sua vez, culmina na fosforilação da p175 na membrana plasmática do mesmo (Favoreto *et al.*, 1998). Ao mesmo tempo, na célula hospedeira a gp82 induz a ativação do alvo de rapamicina de mamíferos (mTOR) favorecendo a infecção das formas tripomastigotas metacíclicas (Martins *et al.*, 2011). Em contrapartida, a gp90 modula negativamente a

invasão celular onde níveis elevados de expressão da mesma são inversamente proporcionais à capacidade de invasão celular do parasito (Yoshida, 2006). Outras moléculas também recebem destaque nestas formas evolutivas, como a gp 35/50 que, ao atuar na remoção do ácido siálico, aumenta a capacidade de células-alvo responderem ao aumento de cálcio citosólico, potencializando a invasão de formas tripomastigotas metacíclicas (Yoshida *et al*., 1997).

Por outro lado, em relação às moléculas envolvidas no processo de internalização da forma tripomastigota de cultura celular (**Figura 1B**), as mais reconhecidas por sua capacidade sinalizadora são a cruzipaína, a trans-sialidase e o antígeno de superfície de tripomastigota (TSSA), que se ligam a componentes da matriz extracelular da célula hospedeira. A cruzipaína (ou gp 57/51) é uma cisteína protease expressa em todas as formas de desenvolvimento de diferentes cepas do parasito, sendo responsável por danos teciduais possivelmente por facilitar a ruptura das células hospedeiras (Murta *et al*., 1990). Esta protease se liga a cininogênios presentes na superfície da célula hospedeira degradando-os e levando a produção de bradicinina. Esta, por sua vez, liga-se aos seus receptores B2R estimulando assim a fosfolipase C a produzir IP3 que mobilizará o influxo de cálcio das reservas citosólicas (Scharfstein *et al*., 2000). Já a enzima trans-sialidase transfere especificamente o ácido siálico derivado de macromoléculas do hospedeiro para as moléculas de superfície do parasito, facilitando sua internalização (Schenkman *et al*., 1991) e o TSSAS se liga às células de mamíferos estimulando a sinalização associado ao cálcio intracelular.

Portanto, diferentes moléculas do parasito, bem como de seus respectivos hospedeiros, encontram-se envolvidas nesse processo de internalização celular e, consequentemente, na resposta inflamatória gerada. A expressão diferenciada dessas moléculas nas diferentes formas evolutivas e populações genéticas do parasito tem se mostrado associada ao sucesso da infecção e ao desenvolvimento de quadros patológicos. Nos últimos anos, porém, novas moléculas vêm recebendo destaque pelas suas atividades no papel de invasão de tripanosomatídeos: as ectonucleotidases (E-NTPDases).

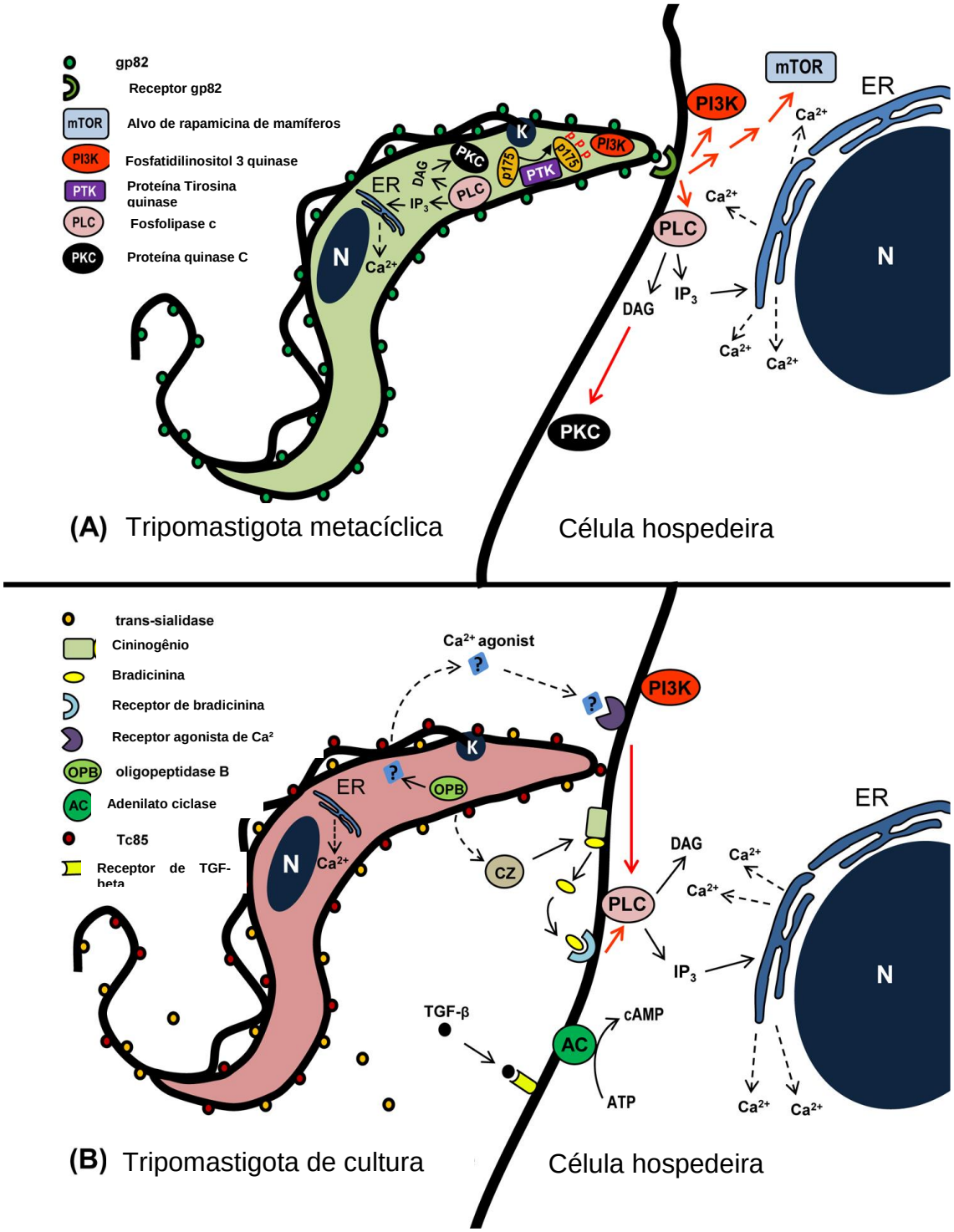

Figura 1: Mecanismos de interação das formas tripomastigotas metacíclicas e tripomastigotas de cultivo celular em células de mamíferos. Representação esquemática de moléculas sinalizadoras e vias que podem ser ativadas durante a entrada de *T. cruzi* em células fagocíticas de mamíferos, (A) em formas metacíclicas e (B) em formas tripomastigotas derivadas de cultura de células. Adaptado de Maeda *et al.*,2012.

1.3 **Sinalização purinérgica**

A sinalização purinérgica consiste em um meio de comunicação célula-célula realizada por um conjunto de moléculas que atuam em muitos mecanismos como modulação da resposta imune, inflamação, agregação plaquetária, proliferação e morte celular, dentre outros (Burnstock, 2003; Burnstock e Knight, 2004).

O ATP e outros nucleotídeos e nucleosídeos de adenina são componentes encontrados no organismo de mamíferos que desempenham papéis como moduladores enzimáticos, fornecedores de energia para as células, além de serem essenciais na composição dos ácidos nucléicos (Burnstock et al., 1972; Burnstock et al.,2006; Wright et al.,2016; Desdín-Micó et al., 2017).

É sabido que o ATP intracelular é principalmente voltado para processos energéticos (Yegutkin, 2008), no entanto o acúmulo de nucleotídeos e nucleosídeos também pode ocorrer extracelularmente, onde são transportados, hidrolisados ou mesmo sintetizados por enzimas expressas no lado externo da membrana plasmática (Gao et al.,2017). Vários tipos de estresse como estímulos mecânicos, hipóxia ou invasão de patógenos são capazes de induzir a liberação de ATP por células eucarióticas (Homolya et al., 2000; McNamara et al.,2001; Seror et al.,2011). Uma vez que o ATP se encontra no meio extracelular em concentrações elevadas, ele atua como um “alerta” para o sistema imune amplificar as respostas de defesa (Zimmermann,2000). O ATP extracelular (ATPe) estimula respostas inflamatórias contra os micróbios e permite que os fagócitos localizem e fagocitem as células mortas (Ferrari et al.,2000; Coutinho-Silva et al.,2007; Junger, 2011; Jacob et al.,2013; Ding & Tan,2016; Pandolfi et al.,2016).

Através da atividade de enzimas expressas na membrana celular, o ATP e ADP são hidrolisados a AMP pela ação da CD39, uma ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase, e posteriormente em adenosina (ADO) pela ecto 5’- nucleotidase, também conhecida como CD73 (Yegutkin, 2008; Zimmermann et al.,2012). A adenosina, por sua vez, pode ser transportada pelos transportadores de nucleosídeos ou sofrer desaminação em inosina na membrana plasmática pela ação da adenosina deaminase (ADA) (**Figura 2**) (Ferrari et al.,2018).

Os nucleotídeos de adenina e adenosina desenvolvem suas atividades pela ligação aos seus receptores purinérgicos expressos em células imunes e não-imunes

(Bours *et al.*, 2006). Os receptores purinérgicos são divididos em P1 e P2, de acordo com a sua ligação à adenosina e aos nucleotídeos, respectivamente (Ralevic & Burnstock, 1998). Os receptores P1 são divididos, ainda, em quatro grupos A1, A2A, A2B, A3 e se ligam à adenosina com diferentes afinidades (Yegutkin, 2014), enquanto os receptores P2 são divididos em P2X e P2Y e se ligam a diferentes nucleotídeos (Burnstock, 2006). Tanto o ATP quanto a adenosina desenvolvem papel essencial na resposta imune e nos mecanismos inflamatórios. O ATP estimula mecanismos inflamatórios ligando-se às células imunes pelos receptores P2 (Trautmann, 2009). Em contrapartida, a adenosina, produto da hidrólise de ATP, está relacionada à modulação do sistema imune estimulando mecanismos anti-inflamatórios via receptores P1 e impedindo a ativação de mecanismos efetores nas células imunes (Antonioli *et al.*, 2014).

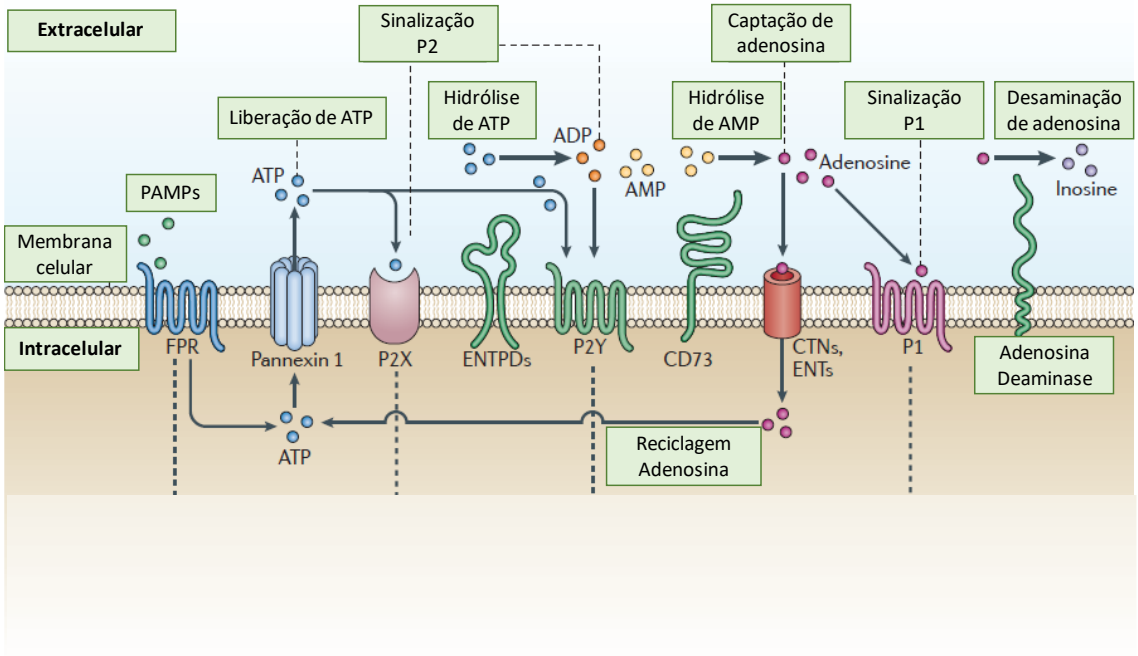

Figura 2: Componentes do sistema de sinalização purinérgica. Esquema representativo dos elementos-chave pertencentes à sinalização purinérgica. Adaptado de Junger, 2011.

1.4 Ectonucleotidases

As ectonucleotidases são enzimas responsáveis por hidrolisar nucleotídeos extracelulares em seus respectivos nucleosídeos. Essas ecto-enzimas pertencem a várias famílias entre as quais estão incluídas as E-NTPDases (ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase) e, as E-NPP (ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase) que

possuem atividade fosfodiesterase. Outras famílias de ecto-enzimas incluem a nucleotídeo pirofosfatase, fosfatase alcalina que libera fosfato inorgânico a partir de uma variedade de compostos orgânicos, além da ecto-5´-nucleotidase que converte nucleotídeos monofosfatos em nucleosídeos (Braun *et al*., 2000, Zimmermann, 2000).

As enzimas da família das E-NTPDases, também chamadas CD39 ou apirases, são enzimas responsáveis pelo metabolismo extracelular de nucleotídeos tri e difosfatados em seus componentes monofosfatados na presença de cátions divalentes (Ca^{2+} ou Mg^{2+}). São proteínas, em sua maioria, transmembrânicas ou solúveis que têm capacidade de catalisar a hidrólise de nucleotídeos no espaço extracelular ou intracelular, dependendo de sua localização (Zimmermann, 2001). A família das E-NTPDases abrange um grupo de 8 enzimas descritas até então, das quais NTPDases 1, 2, 3 e 8 encontram-se localizadas na superfície celular com o sítio catalítico voltado para o meio extracelular, as NTPDases 5 e 6 exibem localização intracelular e passam por secreção após expressão heteróloga e as NTPDases 4 e 7 localizadas inteiramente no meio intracelular com sítio catalítico voltado para o lúmen citoplasmático das organelas (Robson *et al.,* 2006). Em particular, as E-NTPDases, embora sejam comumente destacadas por hidrolisar nucleotídeos de adenina (ATPase e ADPase), possuem, também, afinidades por outros nucleotídeos como por exemplo GTP, GDP, UTP e UDP (Zimmermann, 1999).

As ecto-enzimas já foram descritas em diversos patógenos, como *Leishmania amazonensis* (Pinheiro *et al.,* 2006), *Schistosoma mansoni* (Vasconcelos *et al.,* 1993), *Entamoeba histolytica* (Barros *et al.,* 2000), *Toxoplasma gondii* (Asai *et al.,* 1995) e *Trypanosoma cruzi* (Bisaggio *et al.,* 2003; Fietto *et al.,* 2004). Devido a elevada taxa metabólica e de replicação, os parasitos necessitam de uma ativa síntese de ácidos nucléicos e, consequentemente, de uma vasta demanda de nucleotídeos purínicos. Contudo, os tripanossomatídeos do gênero *Trypanosoma* são incapazes de realizar a síntese *de novo* de purinas, utilizando, então, as E-NTPDases para via de salvação de purinas, através da captação de purinas do meio externo, que neste caso é constituído do ambiente do hospedeiro (De Koning *et al.,* 2002).

No contexto da infecção pelo *T. cruzi*, sabe-se que um importante fator de virulência e de modulação da infectividade deste parasito é a *Trypanosoma cruzi* difosfohidrolase-1 (TcNTPDase-1), uma ectonucleotidase da sub-família E-NTPDase presente na

superfície deste protozoário (Fietto *et al.*, 2004). Esta enzima é responsável por hidrolisar e regular a sinalização purinérgica mediada por nucleotídeos extracelulares. Sua participação na infecção pelo *T. cruzi* foi sugerida após demonstração de que as formas tripomastigotas apresentavam maior atividade destas enzimas que as formas epimastigotas (Meyer-Fernandes *et al.*, 2004) que não conseguem replicar e completar a infecção celular.

A influência da atividade das E-NTPDases, a exemplo da TcNTPDase-1, na infecção e virulência da cepa Y de *T. cruzi*, foi estudada por Santos e cols (2009) que demostraram que a inibição desta enzima atenuava o processo de infecção *in vitro*, além de atenuar a virulência da cepa em modelo murino após a inibição das ectonucleotidases destes parasitos. Contudo, Mariotini-Moura e cols (2014) demonstraram que esta enzima possui papel na adesão celular parasito-hospedeiro.

Um estudo utilizando a cepa Tulahuen de *T. cruzi* em infecção de camundongos BALB/C avaliou o perfil de expressão das ectonucleotidases associado à mudança dos macrófagos M1 (perfil pró-inflamatório) para M2 (perfil regulador) presentes no tecido cardíaco dos animais. Após tratamento com inibidores específicos das ectonucleotidases, os autores verificaram aumento de macrófagos M1 com redução de citocinas regulatórias nestes camundongos (Ponce *et al.*, 2016).

Por esta razão, em função das E-NTPDases controlarem as concentrações de nucleotídeos no meio extracelular, seu papel na regulação das respostas biológicas dependentes de nucleotídeos extracelulares tem sido avaliado utilizando inibidores, dentre os quais a suramina recebe destaque. A suramina é um composto derivado de naftiluréia polissulfonado e utilizado para o tratamento profilático da tripanossomíase africana (doença do sono) (Jennings *et al.*, 2002). No entanto, este fármaco já foi investigado na prática médica para o tratamento de doenças como filariose (Korten et al, 2008), câncer (Osswald & Youssef, 1979), bem como na infecção pelo *T. cruzi* (Santos *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2015; Novaes et al.,2018). Dentre os efeitos descritos para esse composto, destaca-se a inibição da atividade das enzimas transcriptase reversa de retrovírus (De Clerq, 1979), proteína quinase C (Mahoney *et al.*, 1990), DNA polimerase (Voogd *et al.*, 1993), proteínas tirosina fosfatases (Zhang et al.,1998) e Mg^{2+} ATPases (Meyer-Fernandes,2002). Além disso, a suramina atua como antagonista dos purinoreceptores, P2X e P2Y e inibe a ligação de alguns fatores de crescimento a seus

receptores, o que estimulou seu uso na quimioterapia contra o câncer (Plesner, 1995). Alterações morfológicas no citoesqueleto relacionadas à ação deste composto também foram descritas (Soldani *et al.,* 1996; Cirillo *et al.,* 2001; Ohmori *et al.,* 2001; Russell *et al.,* 2001).

Em tripanosomatídeos, a suramina inibe a endocitose de algumas moléculas, a ligação da lipoproteína de baixa intensidade (*low density lipoprotein* – LDL) em seus receptores específicos, e interfere na divisão celular (Fairlamb e Bowman, 1980; Voogd *et al.,* 1993) além de influenciar na infectividade e causar alterações na adesão entre o flagelo e o corpo celular destes parasitos, consequentemente influenciando na sua motilidade (Bisaggio *et al.,* 2006, 2008). Neste contexto, a inibição farmacológica da atividade das ectonucleotidases em formas infectantes do parasito surge como um promissor campo de investigação, focando tanto na avaliação da infectividade do parasito quanto na resposta imune e no status patológico cardíaco do hospedeiro.

1.5 Infecção pelo T. cruzi: Imunopatologia

Sabe-se que a presença de *T. cruzi* no organismo de mamíferos induz uma complexa interação entre suas moléculas e as células de defesa. Desta interação, emerge uma resposta inflamatória sistêmica e/ou focal, particularmente em tecidos musculares onde o parasito se aloja para a eliminação do agente etiológico. Um dos sítios mais relevantes para esta interação parasito-hospedeiro é o tecido muscular cardíaco, órgão para o qual *T. cruzi* apresenta especial tropismo. Desta interação resulta o recrutamento e a ativação de diversas células com elevada produção de mediadores inflamatórios de naturezas distintas, além da coexistência de uma resposta imune humoral.

Mesmo assumindo que o objetivo da resposta inflamatória seja a eliminação do protozoário, este cenário inevitavelmente é acompanhado pela destruição de células hospedeiras adjacentes e de plexos simpáticos e parassimpáticos, essenciais para o funcionamento autonômico cardíaco e de todas as vísceras ocas. Esses mecanismos explicam o desenvolvimento dos “megas”, além da ocorrência de deposição de colágeno intermeando as áreas inflamatórias (Gomes et al.,2014). Estas ações, em conjunto, culminam em uma nova reorganização estrutural do órgão afetando negativamente a

funcionalidade do coração e do trato gastrointestinal característica da doença de Chagas (Morris *et al.,* 1990, Prata A., 2001, Marin-Neto *et al.,* 2007).

Constituintes moleculares de *T. cruzi* e das próprias células dos mamíferos já foram descritos como importantes fatores para a gênese e perpetuação do processo inflamatório cardíaco. A resposta inflamatória inicial à infecção por este parasito parece ser coordenada por células do sistema mononuclear fagocitário que respondem aos antígenos do parasito mediante vias dependentes de receptores do tipo *Toll* (TLR)-Myd88 e NOD (Campos & Gazzinelli 2004a, Campos *et al.,* 2004b, Gonçalves *et al.,* 2013; Mendes *et al.,* 2017). Desta ativação originam citocinas pró-inflamatórias como interleucina 12 (IL-12) e fator de necrose tumora (TNF) que, por sua vez, facilitam a polarização das células $TCD4^+$ e $CD8^+$ em células produtoras de interferon gama (IFN-gama) (Bonney et al.,2019). Juntamente com o TNF, o IFN-gama produzido tanto por células da resposta imune inata quanto adquirida, leva à produção de óxido nítrico por macrófagos atuando, assim, no controle e morte direta dos parasitos pelos radicais livres (Silva *et al.,* 2003, Cutrullis et al.,2017). Na fase aguda, a presença de células $TCD8^+$, bem como a ação de imunoglobulinas contra moléculas de *T. cruzi* e de citocinas, torna-se essencial para o controle da parasitemia e definição do prognóstico clínico da cardiopatia chagásica e dos "megas" (Bilate & Cunha-Neto 2008).

As quimiocinas se inserem neste contexto de inflamação cardíaca por atuarem no recrutamento celular (Aliberti *et al.,* 2001). Reforçando a interação direta entre a infecção pelo *T. cruzi* e a produção das quimiocinas, é sabido que sua síntese *in vitro* e *in vivo* é potencializada pela presença de glicofosfatidilinositol ligado à mucina (GPI-mucina) encontrada nas formas tripomastigotas e epimastigotas do parasito (Aliberti *et al.,* 2001, Coelho *et al.,* 2002).

A proposta de participação destes mediadores inflamatórios e/ou regulatórios na imunopatogênese da infecção foi extensivamente relatada tanto em modelos experimentais quanto evidenciadas em estudos com indivíduos chagásicos (Dutra *et al.,* 2005). Baseado no estudo associativo e de correlação com os parâmetros clínicos, acredita-se que a interação entre IFN-gama, TNF, as quimiocinas e seus receptores possa contribuir diretamente para as alterações cardíacas observadas em cardiopatas crônicos (Cunha-Neto *et al.,* 2009).

Alguns autores têm sugerido uma forte relação entre a capacidade de hidrólise de ATPe por parasitos e os processos biológicos como virulência, sobrevivência intracelular, adesão celular e modulação do sistema imune do hospedeiro (Berrêdo-Pinho *et al*., 2001; Maioli et al., 2004; Gomes *et al*.,2015)

1.6 Ectonucleotidases versus o processo inflamatório na infecção pelo T. cruzi

As vias de sinalização purinérgica estão envolvidas no controle das funções das células do hospedeiro, incluindo a resposta imune, como por exemplo: quimiotaxia de macrófagos, neutrófilos; reconhecimento de células danificadas; ativação de células T; fagocitose (Junger, 2011; Cekic & Linden, 2016). Como dito anteriormente, a presença de elevadas concentrações de ATPe atua como sinal de "perigo" para o sistema imune.

No entanto *T. cruzi* apresenta em sua superfície a TcNTPDase-1, que através da hidrólise de ATPe à ADO, auxilia-o a evadir do sistema imune e a permanecer no organismo do hospedeiro. Embora o parasito consiga evadir, uma resposta imune efetora é desencadeada no intuito de controlar sua replicação. Contudo essa resposta não é capaz de eliminar totalmente o parasito do organismo e a sua persistência leva a danos teciduais no hospedeiro.

Acredita-se que a inibição da ectonucleotidase controlaria a infectividade e o *status* patológico proporcionando assim benefícios ao hospedeiro. No caso da infecção pelo *T. cruzi*, este status encontra-se diretamente relacionado com a intensidade do processo inflamatório.

Neste contexto, Santos e cols (2009) demonstraram que camundongos infectados com formas tripomastigotas derivadas de cultura de células da cepa Y de *T. cruzi* pré-tratadas com suramina, apresentaram baixa parasitemia e elevada taxa de sobrevida quando comparado com animais infectados com parasitos normais.

Estudos posteriores realizaram o tratamento de camundongos infectados também com a cepa Y com a combinação de suramina e benznidazol (fármaco utilizado para o tratamento etiológico da DC) (Santos et al., 2015) e com a monoterapia de suramina (Novaes et al., 2018). Ambos trabalhos mostraram aumento da parasitemia e dano no tecido cardíaco dos animais que receberam as terapias.

Considerando que somente quando os parasitos são expostos ao pré-tratamento com suramina haveria a benefícios ao hospedeiro, podemos pressupor que o estudo da

genômica do parasito atrelado ao desenvolvimento de inibidores específicos para ectonucleotidase poderia permitir novas intervenções farmacológicas que auxiliariam no prognóstico do indivíduo chagásico.

Todavia, primariamente é preciso compreender a relação da ectonucleotidase nas diferentes formas evolutivas, incluindo a forma tripomastigota metacíclica, e cepas de *T. cruzi*, bem como o seu papel na infecção *in vitro* e *in vivo* pelo *T. cruzi*. Além do mais, avaliar e compreender a atividade da ADA é também de grande relevância, uma vez que o equilíbrio entre a concentração de ATPe e ADO no meio extracelular contribui para a resolução do processo inflamatório.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a relação existente entre a atividade ectonucleotidásica da cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas e das formas tripomastigotas derivadas de cultura de células das cepas Colombiana, VL-10 e CL de *Trypanosoma cruzi* com a infecção *in vitro* e com os eventos inflamatórios desencadeados na fase aguda da infecção experimental.

3.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar a atividade ectonucleotidásica na cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas e formas tripomastigotas derivadas de cultura de células das três cepas avaliadas;
2. Avaliar a virulência dos parasitos após a inibição da hidrólise de ATP pela suramina*;*
3. Caracterizar a atividade da adenosina deaminase (ADA);
4. Avaliar a infecção de células J774 após a inibição da atividade ectonuleotidásica, com suramina, e o estímulo com IFN-gama, bem como na produção de óxido nítrico;
5. Avaliar a inibição da atividade ectonucleotidásica, com suramina, na infecção de camundongos C57BL/6 relacionando-a aos parâmetros patológicos (infiltrado inflamatório/parasitismo tecidual) nestes animais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cepas do Trypanosoma cruzi

Foram utilizadas as cepas Colombiana (DTU I), VL-10 (DTU II) e CL (DTU VI) do *T. cruzi*. Essas cepas possuem o perfil de resistência à terapia de referência bem caracterizado, sendo as cepas Colombiana e VL-10 resistentes e a cepa CL sensível ao tratamento com benznidazol e nifurtimox (Filardi e Brener, 1987), conforme demonstrado na tabela 1. As cepas Colombiana, VL-10 e CL foram utilizadas nos experimentos *in vitro* e *in vivo.*

Tabela 1: Características das cepas utilizadas no estudo.

Cepa	Origem geográfica	Hospedeiro (fase da doença/vetor)	DTU*	Referência
Colombiana	Colômbia	Homem (crônica)	I	Frederici *et al* (1964)
VL-10	MG/Brasil	Homem (crônica)	II	Schlemper *et al* (1982)
CL	RS/Brasil	*T. infestans* (invertebrado)	VI	Brener & Chiari (1963)

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

4.2 Experimentos in vitro

4.2.1. Obtenção do parasito

(i) Cultivo das formas epimastigotas

As cepas Colombiana, VL-10 e CL foram cultivadas em meio axênico utilizando meio LIT (*Liver Infusion Triptose*), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), mantidas em estufa BOD, a 28ºC. Para o crescimento exponencial das formas

epimastigotas foi adicionado o meio de cultura a cada 2 dias e feito um repique semanal na proporção de 1mL (cultura)/ 2mL de meio LIT. Com objetivo de manter o parasito em criobanco, após cerca de oito semanas, os parasitos foram homogeneizados em meio LIT contendo 10% de glicerina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e criopreservados em nitrogênio líquido.

(ii) Obtenção da cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas

A cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas das cepas Colombiana, VL-10 e CL foi obtida a partir de formas epimastigotas mantidas em meio LIT. Cinco mililitros de cultura, em fase exponencial, foram adicionados a 15 mL de meio Grace (*Grace's Insect medium,* Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em pH 7,0. Essa suspensão de parasitos foi mantida em garrafa de cultura (75 cm^3), a 28º C, por 12 dias. Após esse período, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 3500rpm, por 10 minutos a 4ºC. O número de parasitos foi determinado através de contagem em câmara de Neubauer e a partir dessa contagem foi preparado o inóculo para os experimentos *in vitro* quanto *in vivo,* bem como a quantidade de parasitos para realização dos ensaios da atividade ectonucleotidásica e da atividade da ADA. O rendimento de formas tripomastigotas metacíclicos foi de 62% para a cepa Colombiana, 60% para a cepa VL-10 e 58% para a cepa CL.

(iii) Obtenção de formas tripomastigotas de cultura celular

As formas tripomastigotas derivadas de cultura celular das cepas Colombiana, VL-10 e CL foram obtidas a partir do sobrenadante de cultura de células de mamíferos infectadas. Para isso, células VERO foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Ao atingir cerca de 70% de confluência, a cultura foi infectada com formas tripomastigotas metacíclicas oriundas da cultura axênica das cepas Colombiana, VL-10 e CL após 12 dias de diferenciação em meio Grace (metaciclogênese). Após 24 horas de incubação a 37ºC, 5% CO_2, o meio de cultura foi removido e os parasitos não internalizados retirados através de sucessivas lavagens com PBS. As células foram novamente incubadas com meio DMEM a 37ºC por 8 dias, quando o sobrenadante foi coletado e centrifugado, a 600rpm, 24ºC, por 2 minutos, para remoção dos *debris* celulares. Posteriormente, o sobrenadante rico em parasitos foi centrifugado a 3500rpm, por 10 minutos a 4ºC e o sedimento ressuspenso em meio de cultura para posterior utilização nos experimentos. Apenas parasitos recém-liberados das células e ativos

foram utilizados nos experimentos *in vivo* e *in vitro* bem como nos ensaios da atividade ectonucleotidásica e da atividade da ADA.

4.2.2 Ensaio de atividade ectonucleotidásica dos parasitos

A avaliação da capacidade de hidrólise de nucleotídeos pela cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas e formas tripomastigotas derivadas de cultura celular das cepas Colombiana, VL-10 e CL foi realizada utilizando-se um método colorimétrico de dosagem de fosfato inorgânico liberado pela incubação dos parasitos com ATP, ADP ou AMP. Este método tem como procedimento a incubação dos parasitos intactos durante 1 hora a 30ºC em tampão de reação contendo NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM, 5,5 mM de D-glicose, 5 mM de $MgCl_2$, e 50 mM de tampão Hepes-Tris, na presença de 5 mM de ATP, ADP ou AMP (*Merck/Sigma-Aldrich*) (Bisaggio e cols., 2003). A reação se inicia com a adição da cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas e das formas tripomastigotas derivadas de cultura celular, sendo paralisada com a adição de HCl 0,2 M (Fietto e cols., 2004). Para determinar a hidrólise inespecífica, e assim, obter um grupo controle, os parasitos foram adicionados depois que a reação foi interrompida. Após a interrupção da reação, a suspensão de parasitos foi submetida à centrifugação que possibilitou a sedimentação dos mesmos e permitiu, a partir de alíquotas do sobrenadante, a medição do fosfato inorgânico liberado (Pi) (Ekman e Jager, 1993). As atividades enzimáticas foram expressas como nanomol de Pi liberado por $1x10^8$ parasitos em 1 hora.

Para avaliar a inibição da atividade ectonucleotidásica, da cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas e das formas tripomastigotas de cultura celular, pela suramina (200µM) foi feita a adição deste inibidor ao tampão de reação. Posteriormente, os parasitos foram incubados nesse tampão por 1 hora, conforme metodologia descrita para avaliação da atividade ectonucleotidásica.

4.2.3 Atividade da Adenosina Desaminase (ADA) dos parasitos

A atividade da ADA foi avaliada nos parasitos pelo método descrito por Giusti e Gakis (1971). Primeiramente, os parasitos vivos intactos foram lavados duas vezes em solução salina a 0,9% e depois ressuspensos em solução salina tamponada com fosfato (pH 7,2) ($1x10^7$ parasitos/mL). As amostras foram pré-incubadas por 10 min a 37 °C e a reação foi iniciada pela adição de substrato adenosina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) até uma concentração final de 21 mmol/L. Após incubação por 1 hora, a reação

foi interrompida pela adição de 500µL de reagente fenol-nitroprussiato (10^6/0.16 mmol/L) (Merck, Darmstadt, Alemanha). Posteriormente foi adicionado à reação 500µL de hipoclorito de sódio (125/11 mmol/L) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e homogeneizada. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos e o ensaio colorimétrico foi realizado a 620nm. O sulfato de amônio na concentração de 75µmol/L foi utilizado como padrão de amônia. A atividade específica foi expressa como nanomol de amônia (NH_3) por 10^7 parasitos por hora.

4.2.4 Ensaios de infectividade celular e avaliação da produção de óxido nítrico (NO)

Células da linhagem J774A.1 (*American Type Culture Collection*, ATCC: TIB-67) provenientes de células de sarcoma de camundongos BALB/c foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de glutamina 2mM e 0,2% de gentamicina 200µg/mL. Garrafas de cultura de 75 cm^2 contendo as células (mantidas a 37ºC e 5% de CO_2) foram soltas/raspadas semanalmente utilizando um espalhador de células. Para utilização nos experimentos foram plaqueadas $1x10^4$células/poço, sobre lamínulas de 13mm, em placas de 24 poços. Após 24 horas de incubação, nas mesmas condições descritas, as células foram infectadas com parasitos previamente incubados em temperatura ambiente por 10 minutos em meio DMEM 10% de SFB com ou sem 100µM de suramina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) na proporção 1:1(parasito/célula). Após prévia incubação, os parasitos foram centrifugados (3500 rpm por 10 minutos, à 4ºC), ressuspensos em meio DMEM 10% de SFB e colocados em contato com a monocamada de células J774A.1. Dentro de 24 horas após a infecção as células foram tratadas ou não com 10U/mL de IFN-gama recombinante murino (R&D Systems, Minneapolis, EUA) por 48 horas. A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada pela reação de Griess (Green et al., 1982).

Finalizadas as 24 e 72 horas de infecção, houve a coleta do sobrenadante e as lamínulas foram lavadas com água, fixadas com metanol por 5 minutos e em seguida, coradas pela solução de Giemsa (10% em água destilada). Após secagem das lamínulas e montagem em lâmina com Entellan (Merck), determinou-se o número de células infectadas e o número de parasitos por célula infectada em uma contagem de no mínimo 100 células ao microscópio óptico (aumento de 100x).

4.3 Experimentos in vivo

4.3.1 Animais, parasitos e infecção

Para os ensaios *in vivo*, camundongos C57BL/6 machos com 30 dias de idade foram fornecidos e mantidos no Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Todos os experimentos e protocolos seguiram diretrizes para o uso de animais na pesquisa CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e aprovadas pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UFOP (nº 2016/29). Grupos de 10 camundongos foram inoculados intraperitonealmente com $1x10^3$ da cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas ou formas tripomastigotas derivadas de cultura de células de *T. cruzi* tratadas ou não com 1 mM de suramina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As cepas de *T. cruzi*, citadas anteriormente, foram tratadas com o inibidor suramina conforme detalhado no estudo de Santos et al., 2009. É importante ressaltar que a viabilidade dos parasitos foi avaliada mediante a observação de sua movimentação, sendo estes contados em Câmara de Neubauer. A parasitemia foi determinada diariamente de acordo com Brener (1962) e os animais foram sacrificados no trigésimo dia pós-infecção quando os tecidos cardíacos foram coletados para análise histopatológica.

4.3.2 Processamento do tecido muscular cardíaco para microscopia óptica

Os animais dos grupos experimentais foram eutanasiados no 31º dia após a infecção. Durante esse procedimento os fragmentos do coração foram coletados e imediatamente fixados em solução de DMSO/metanol e, posteriormente processados rotineiramente. Os blocos montados foram submetidos à microtomia em secções de 4µm para confecção das lâminas que foram coradas pelo método de Hematoxilina & Eosina (para quantificação do infiltrado inflamatório).

i. Técnica de Hematoxilina & Eosina (HE)

Para análise quantitativa e qualitativa do processo inflamatório no tecido muscular cardíaco dos animais foi realizada a coloração por HE. Secções com 4µm de espessura foram desparafinizados em dois banhos de xilol, 15 minutos em cada, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes de álcool (100%, 90%, 80% e 70%), 10 minutos em cada, e lavados em água corrente por 10 minutos e em PBS

pH 7,2 por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram corados pela hematoxilina por 10 minutos, lavados em água corrente e diferenciados rapidamente em álcool acidulado e, logo após, lavados novamente em água corrente. Depois foram corados pela eosina durante 1 minuto. Após o último processo de lavagem em água corrente, as lâminas com os cortes, foram acondicionadas em estufa à 56°C para secagem e, posteriormente submetidas a um banho de xilol durante 30 minutos. Ao final, as lâminas foram montadas com lamínulas e *Entellan*.

4.3.3 Avaliação histopatológica

Para as análises dos cortes histológicos, as imagens foram digitalizadas utilizando o microscópio Leica DM5000B com uma microcamêra acoplada, sendo processadas por meio do programa analisador de imagens Leica QWin V3. O processo inflamatório foi avaliado mediante quantificação de todos os núcleos celulares presentes nos fragmentos do coração em 25 imagens aleatórias (34615 μm^2) obtidas em objetiva de 40x. O mesmo foi determinado pelo número de núcleos das células presentes nos animais não-infectados ± desvio padrão (controle). Os animais infectados com o *T. cruzi* que apresentavam valores de quantificação de núcleos celulares acima desta média foram considerados com inflamação cardíaca.

4.4 Análise estatística

Utilizou-se o programa *GraphPad Prism 5* e os dados foram analisados utilizando o teste *Kolmogorov-Smirnov* para confirmar os padrões de normalidade. Os parâmetros avaliados foram representados pela mediana ou média de seus valores e respectivo erro médio padrão. De acordo com a natureza dos dados e para a comparação entre dois grupos foram realizados os testes *Mann Withney* (dados não paramétricos) e teste-t (dados paramétricos). Os testes *Kruskal-Wallis* com pós-teste de Dunn's (dados não paramétricos), *OneWay* ANOVA com pós-teste de *Tukey-Kramer* (dados paramétricos) foram utilizados para múltiplas comparações. Diferenças significativas entre os grupos foram definidas quando $p<0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Atividade da ATPásica é dependente da cepa de *T. cruzi*

A cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas e formas tripomastigotas derivadas de cultura de células exibiram diferentes níveis de hidrólise de ATP os quais foram distintos entre as cepas (Figura 3A; 4A). No entanto, não foram observadas diferenças na hidrólise de ADP e AMP entre as cepas e a origem das formas tripomastigotas.

Na cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas, a cepa Colombiana apresentou maiores níveis de hidrólise de ATP em comparação com as cepas VL-10 e CL (Figura 3A). De outro modo, para as formas tripomastigotas de cultura de células, a cepa CL apresentou níveis mais altos de hidrólise de ATP do que os observados com as cepas Colombiana e VL-10 (Figura 4A). É importante ressaltar que, na cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas, todas as cepas apresentaram níveis mais altos de hidrólise de ATP, quando comparadas às formas epimastigotas (dados não mostrados).

A avaliação da inibição da atividade enzimática por suramina na cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas e formas tripomastigotas derivadas de cultura de células (Figura 3B, C; 4B, C) mostrou que esse composto foi capaz de inibir a hidrólise de ATP em todas as cepas (Figura 3B, 4B). Em relação ao bloqueio da atividade da ADPase, não foram observadas diferenças significativas entre as cepas bem como quanto a origem das formas tripomastigotas (Figura 3C; 4C).

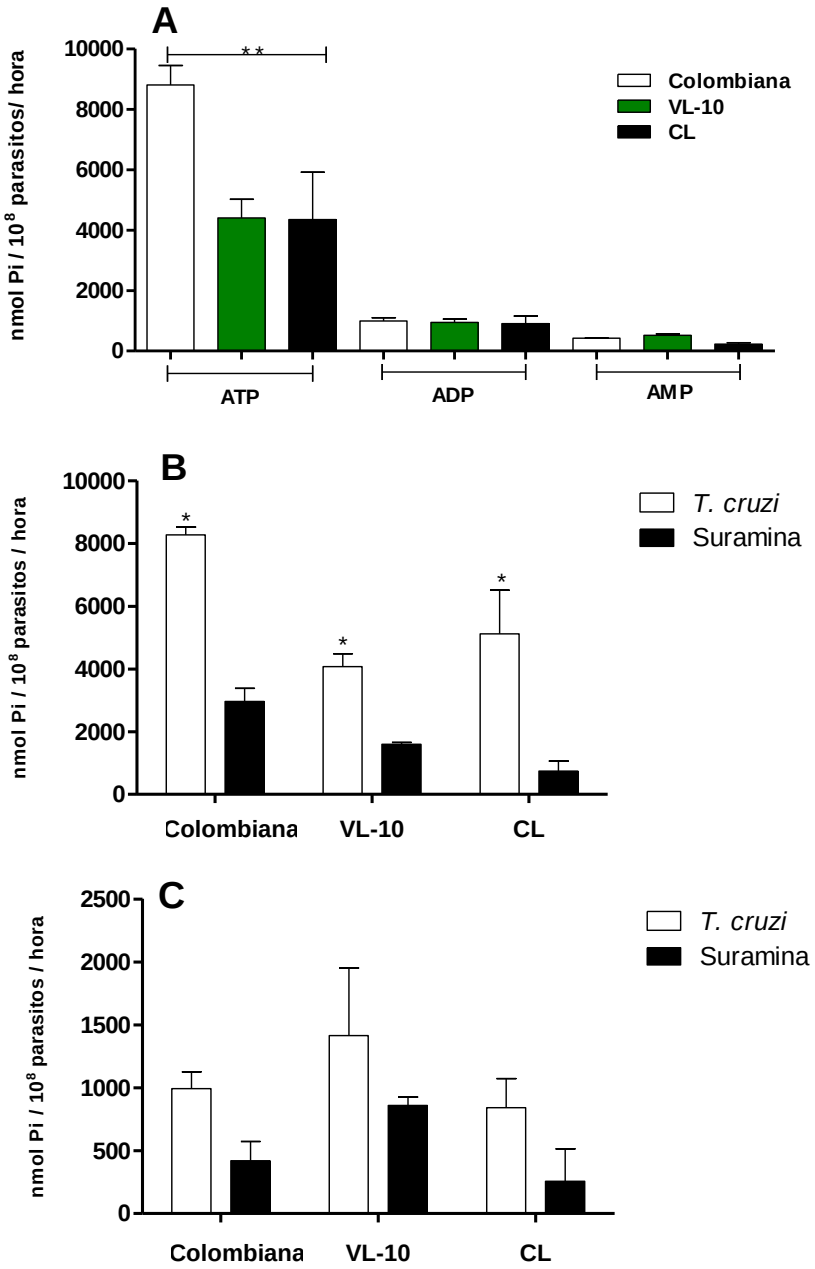

Figura 3: Atividade ectonucleotidásica e efeito do inibidor das E-NTPDases, suramina, na hidrólise de ATP e ADP da cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas de diferentes cepas de *T. cruzi*. (A) Atividade ectonucleotidásica da cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas das cepas Colombiana, VL-10 e CL de *T. cruzi*; (B) Efeito da suramina (200µM) sobre a hidrólise de ATP; (C) Efeito da suramina sobre a hidrólise de ADP. Os parasitos foram centrifugados e incubados com ATP, ADP e AMP, contendo suramina ou não, por 1 hora a 30ºC. A atividade foi avaliada pela quantidade de fosfato inorgânico liberado. Os dados apresentados referem-se a média e desvio-padrão de três repetições independentes. Análise estatística realizada por One-Way ANOVA, seguido de teste Tukey em comparação ao grupo controle. *$p<0,05$.

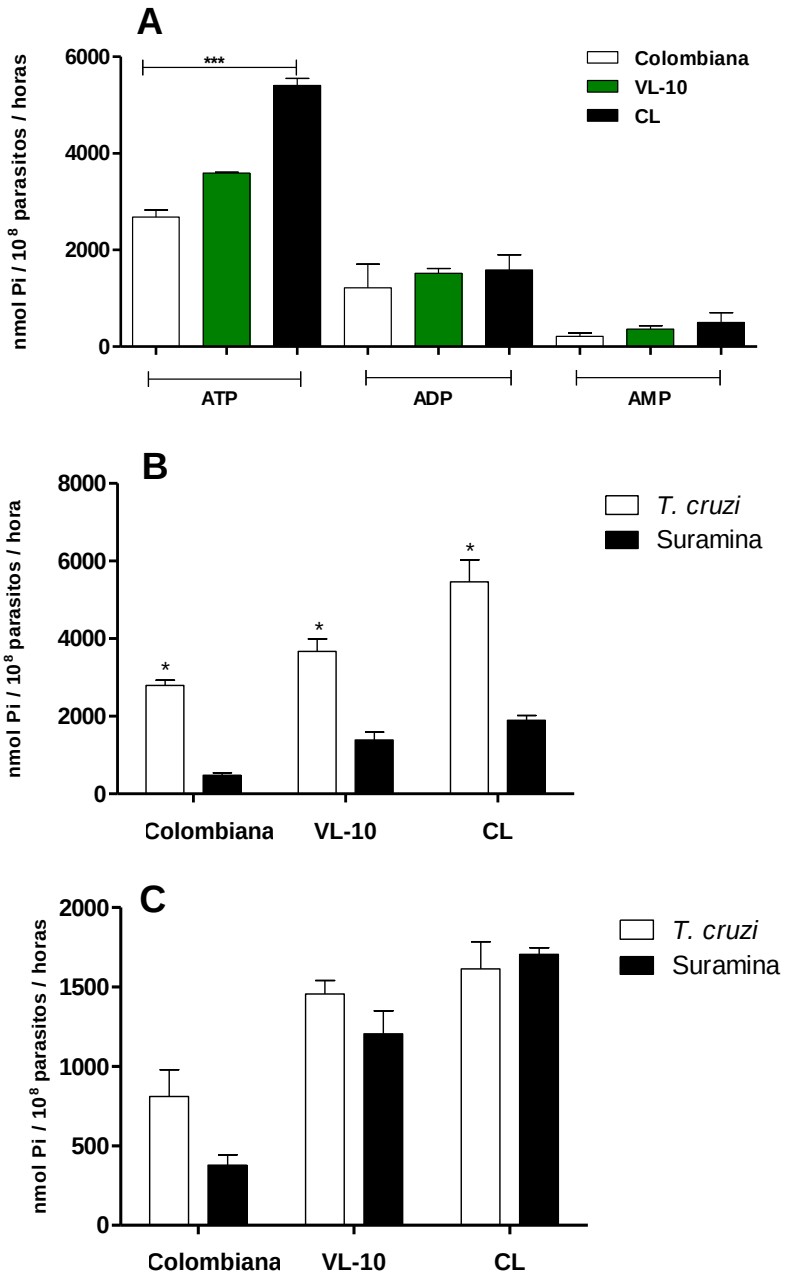

Figura 4: Atividade ectonucleotidásica e efeito do inibidor da E-NTPDases, suramina, na hidrólise de ATP e ADP de formas tripomastigotas derivadas de cultura de células de diferentes cepas de *T. cruzi*. (A) Atividade ectonucleotidásica de formas tripomastigotas derivadas de cultura celular das cepas Colombiana, VL-10 e CL de *T. cruzi*; (B) Efeito da suramina (200µM) sobre a hidrólise de ATP; (C) Efeito da suramina sobre a hidrólise de ADP. Os parasitos foram centrifugados e incubados com ATP, ADP e AMP, contendo suramina ou não, por 1 hora a 30ºC. A atividade foi avaliada pela quantidade de fosfato inorgânico liberado. Os dados apresentados referem-se a média e desvio-padrão de três repetições independentes. Análise estatística realizada por One-Way ANOVA, seguido de teste Tukey em comparação ao grupo controle. *p<0,05.

5.2 Atividade da hidrólise de Adenosina é distinta nas diferentes cepas de *T. cruzi*

Conforme apresentado para as atividades ectonucleotidásicas, também foram observadas diferenças nos níveis de atividade da ADA entre as três cepas estudadas (Figura 5A, B). Para a cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas, a cepa Colombiana apresentou maior nível de atividade da ADA quando comparada às cepas VL-10 e CL (Figura 5A). Em relação às formas tripomastigotas derivadas da cultura de células, a cepa CL apresentou maior atividade de ADA em comparação às cepas Colombiana e VL-10 (Figura 5B).

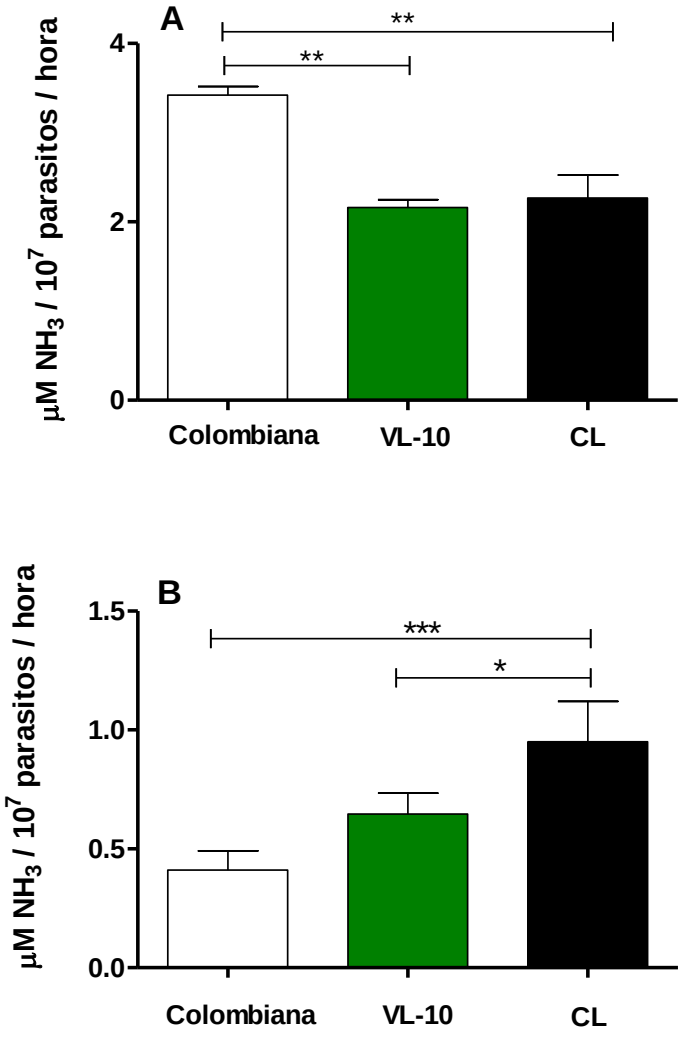

Figura 5: Atividade da Adenosina Deaminase (ADA) da cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas e de formas tripomastigotas derivadas de cultura de células de diferentes cepas de *T. cruzi*. (A) Cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas, (B) Formas tripomastigotas derivadas de cultura de células das cepas Colombiana, VL-10 e CL de *T. cruzi* foram centrifugadas e incubadas com adenosina por 1 hora a 37ºC.A atividade foi avaliada pela quantidade de amônia liberada. Os dados apresentados referem-se a média e desvio-padrão de três repetições independentes. Análise estatística realizada por One-Way ANOVA, seguido de teste Tukey em comparação ao grupo controle. *p<0,05.

5.3 O pré-tratamento com suramina interfere na infecção de células J774A.1 pelo *T. cruzi* e na produção de óxido nítrico

Para avaliar a participação da ectonucleotidase na infecção *in vitro* pelo *T. cruzi*, o parasito foi pré-tratado ou não com 100µM de suramina e as células J774 foram infectadas para analisar a infectividade, o número de amastigotas por célula e a produção de NO. Observou-se que, 24 horas após a infecção pela cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas, o pré-tratamento com suramina reduziu a infectividade (Figura 6A) e o número de amastigotas por célula (Figura 6C), além de aumentar a produção de NO (Figura 6E) pelas células J774 nas três cepas estudadas. Além disso, sem o pré-tratamento com suramina, a cepa Colombiana apresentou maior infectividade e número de parasitos por célula que as cepas VL-10 e CL. Da mesma forma, a inibição com suramina nas 24 horas após a infecção também reduziu a infectividade celular (Figura 7A) e o número de amastigotas (Figura 7C), bem como o aumento da produção de NO (Figura 7E) pelas células J774 infectadas com formas tripomastigotas derivadas da cultura de células de todas as cepas avaliadas. Com essa forma evolutiva do parasito, a cepa CL apresentou maior infectividade e número de parasitos por célula quando comparada às cepas Colombiana e VL-10.

Após 24 horas de infecção, as células J774 foram estimuladas ou não com 10 U/mL de IFN-gama murino recombinante por 48 horas. Dessa forma, 72 horas após a infecção, o pré-tratamento dos parasitos com suramina e o tratamento de células com IFN-gama reduziram a infectividade (Figura 6B; 7B), o número de amastigotas por célula (Figura 6D; 7D), além de aumentar a produção de NO por essas células (Figura 6F; 7F) na infecção pela cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas bem como por formas tripomastigotas derivadas de cultura de células. A infecção pela cepa Colombiana da cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas apresentou maior infectividade e maior número de parasitos por célula quando comparada às cepas VL-10 e CL, enquanto a infecção pela cepa CL de formas tripomastigotas derivadas da cultura celular manteve maior infectividade e número de parasitos por célula, em comparação à cepa Colombiana, como observado anteriormente em 24 horas de cultivo.

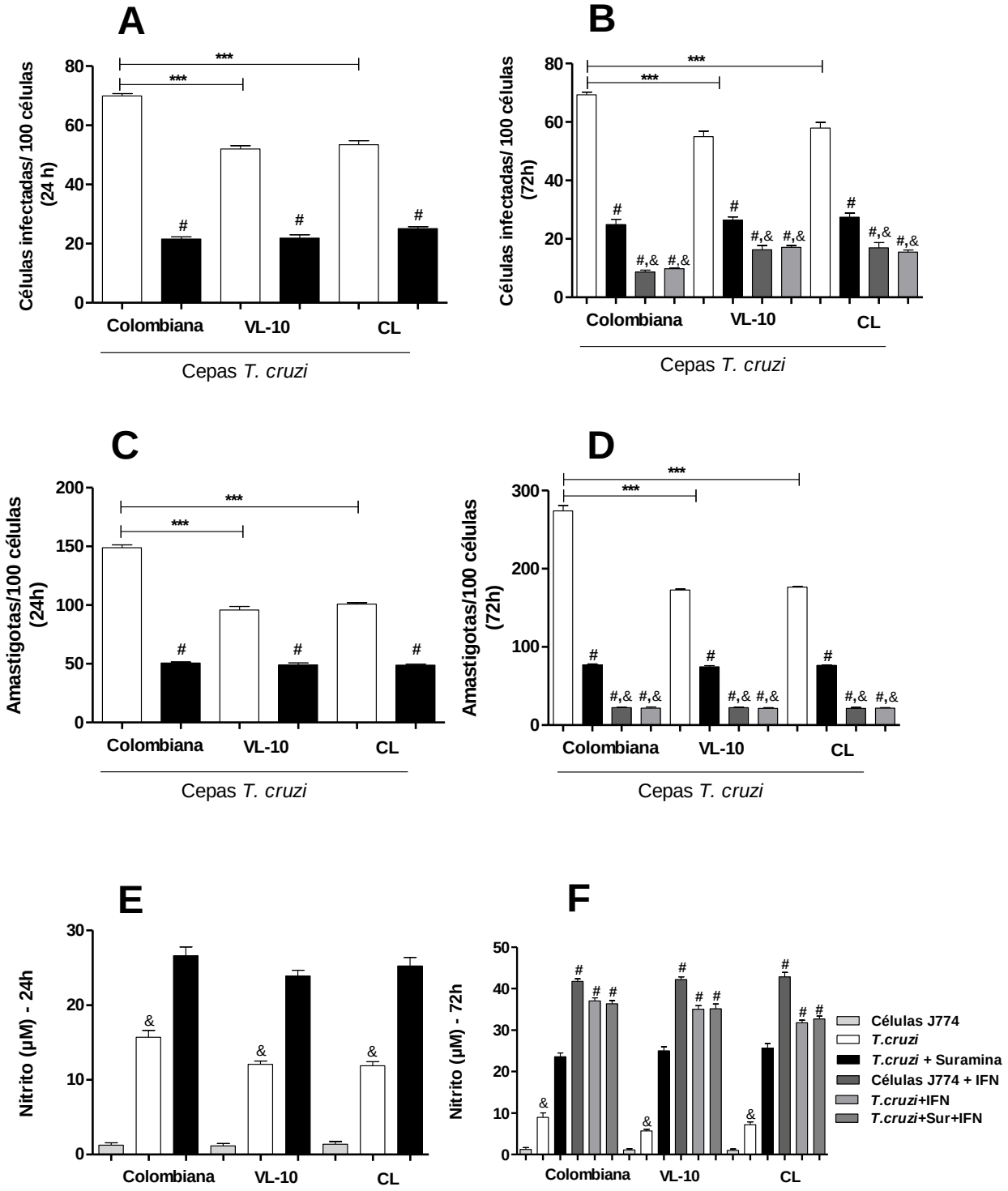

Figura 6: Infecção de células J774 por cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas de diferentes cepas de *T. cruzi* e produção de óxido nítrico. Células J774 foram infectadas por cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas das cepas Colombiana, VL-10 e CL de *T.cruzi* na proporção de 1:1 (parasito/célula) com ou sem pré-tratamento com suramina. A porcentagem de células infectadas foi avaliada em 24 horas (A) e 72 horas (B) de cultivo, bem como a porcentagem de amastigotas em 24 horas (C) e 72 horas (D) de cultivo. A produção de óxido nítrico em 24 horas (E) e 72 horas (F) de cultivo também foi avaliada sob diferentes estímulos descritos em (F). *p <0,05 entre cepas de *T. cruzi*, # p<0,05 J774, *T. cruzi*, & p<0,05 J774, *T. cruzi* + suramina.

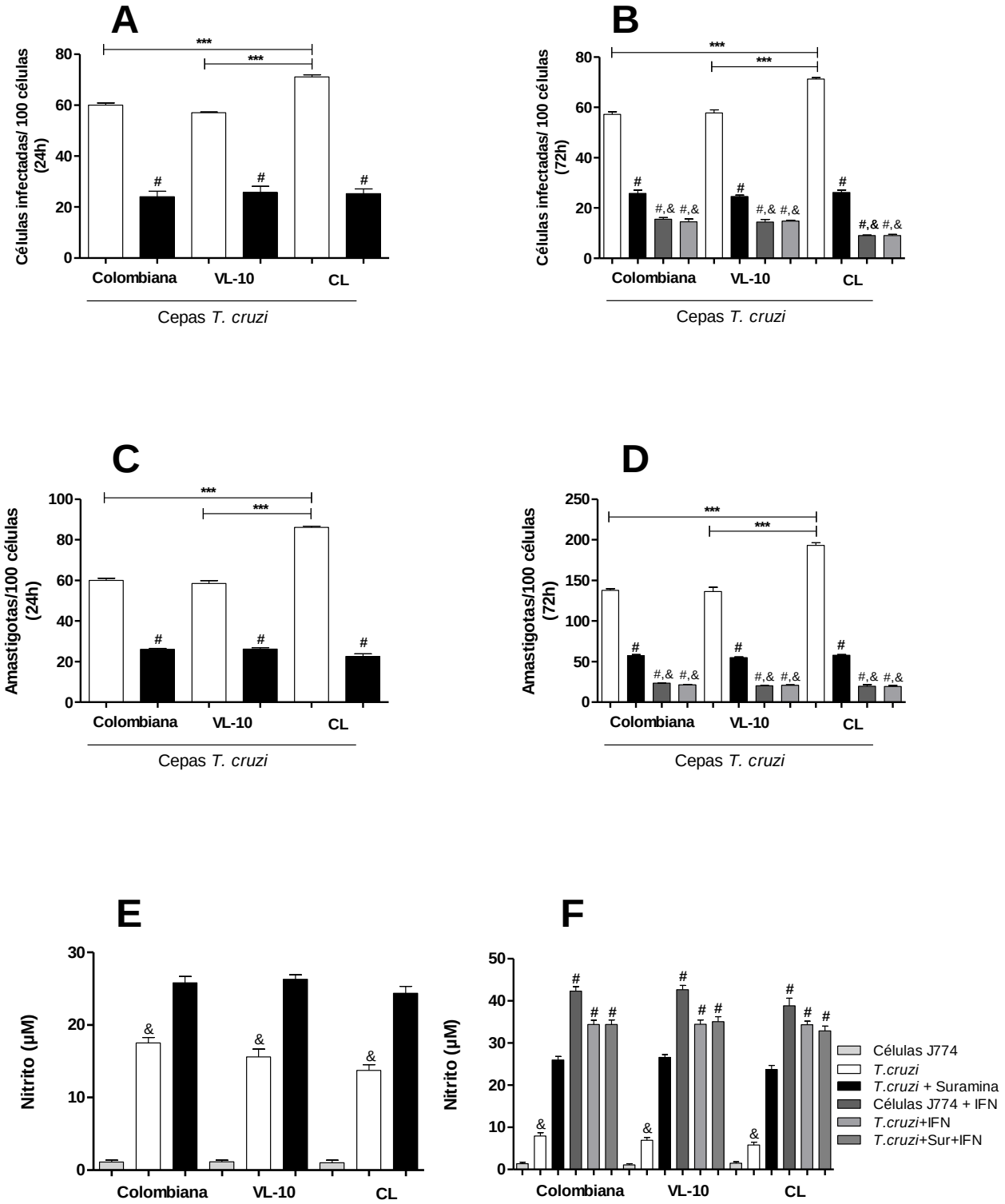

Figura 7: Infecção de células J774 por formas tripomastigotas derivadas de cultura de células de diferentes cepas de *T. cruzi* e produção de óxido nítrico. Células J774 foram infectadas por formas tripomastigotas derivadas de cultura celular das cepas Colombiana, VL-10 e CL de *T.cruzi* na proporção de 1:1 (parasito/célula) com ou sem pré-tratamento com suramina. A porcentagem de células infectadas foi avaliada em 24 horas (A) e 72 horas (B) de cultivo, bem como a porcentagem de amastigotas em 24 horas (C) e 72 horas (D) de cultivo. A produção de óxido nítrico em 24 horas (E) e 72 horas (F) de cultivo também foi avaliada sob diferentes estímulos descritos em (F). *p <0,05 entre cepas de *T. cruzi*, # p<0,05 J774, *T. cruzi*, & p<0,05 J774, *T. cruzi* + suramina.

5.4 O pré-tratamento com suramina estimulou o controle da parasitemia

De outro modo, investigamos a participação da ectonucleotidase na infecção de camundongos C57BL/6 com parasitos, de três cepas e duas origens de formas tripomastigotas do *T. cruzi*, pré-tratados com 1mM de suramina e inoculados com 1000 formas do parasito em cada animal. O grupo controle positivo foi o infectado com parasito sem pré-tratamento.

O pré-tratamento com suramina levou à redução do pico máximo de parasitemia quando os animais foram inoculados com a cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas das cepas Colombiana (Figura 8A), VL-10 (Figura 8B) e CL (Figura 8C) de *T. cruzi*. Um perfil semelhante foi observado quando os animais foram inoculados com formas tripomastigotas derivadas de cultura celular pré-tratadas das cepas Colombiana (Figura 9A) e CL (Figura 9C). No entanto, o pré-tratamento com suramina não interferiu na sobrevivência desses animais (dados não mostrados).

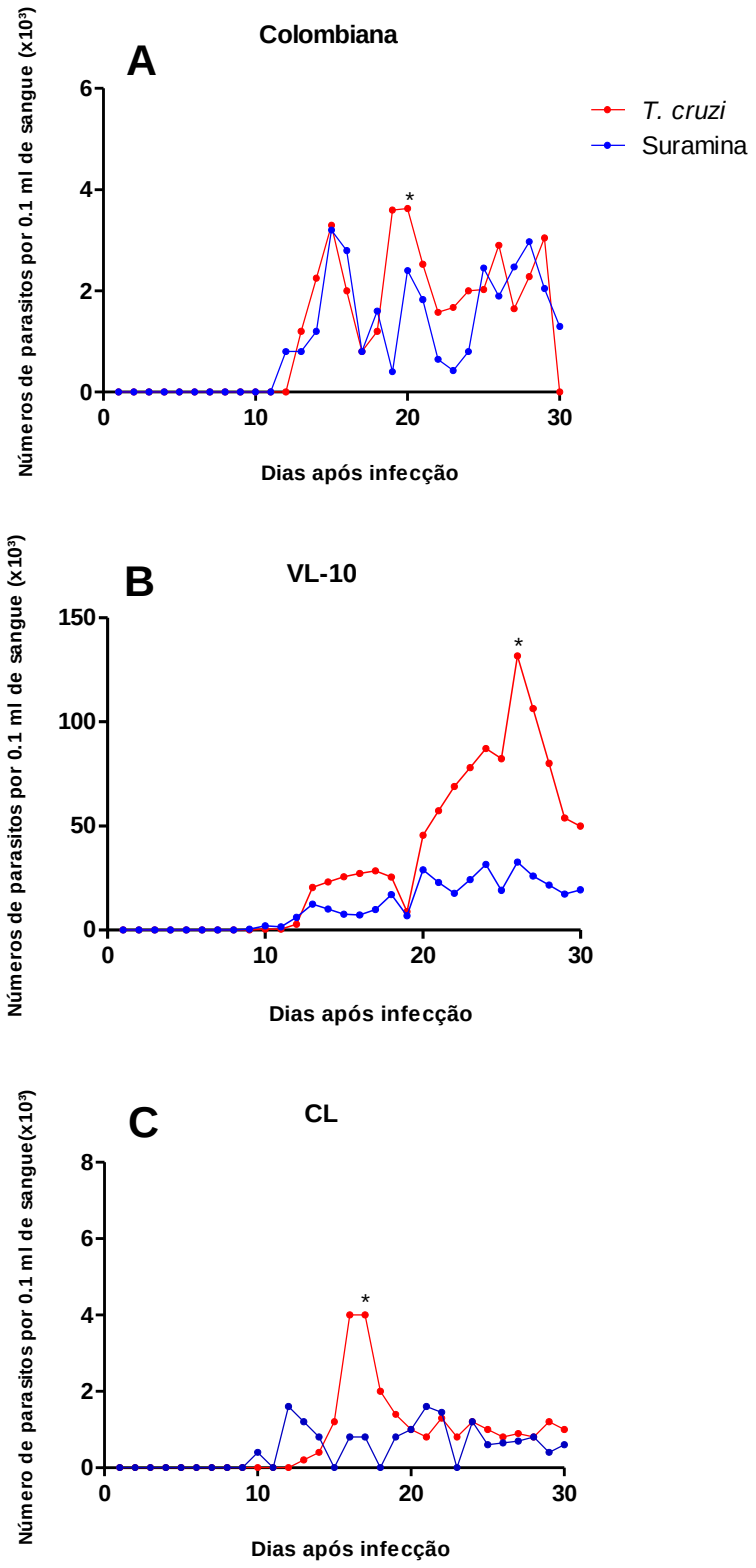

Figura 8: Curvas de parasitemia de camundongos C57BL/6 infectados com 1.000 formas da cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas das cepas Colombiana, VL-10 e CL de *T. cruzi*. Grupos de 10 animais foram infectados com cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas das cepas (A) Colombiana; (B) VL-10 e (C) CL de *T.cruzi*, pré - tratadas ou não com suramina. Os dados em cada ponto da curva equivalem à média da parasitemia/dia referente a cada grupo. * $p<0,05$.

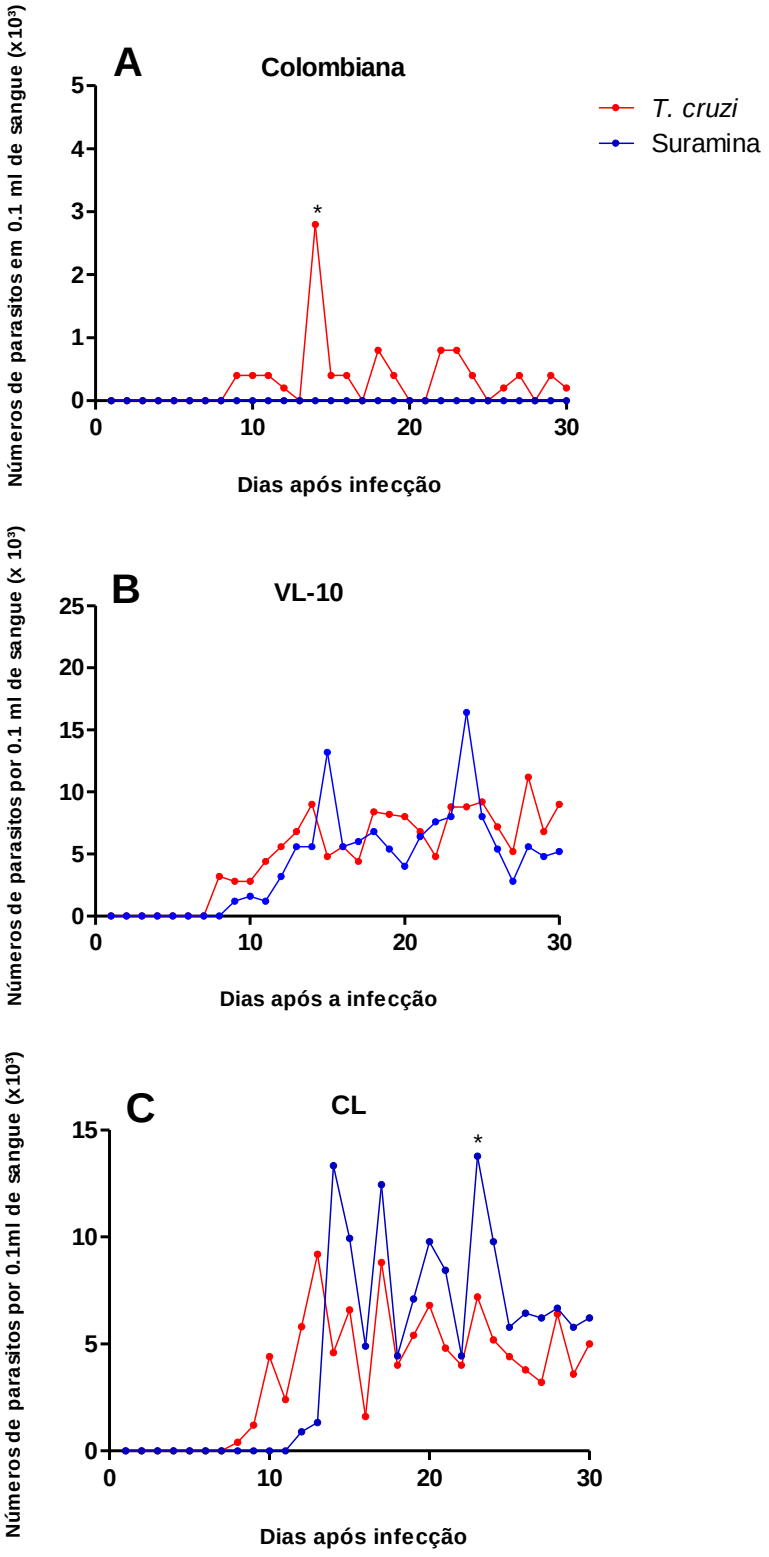

Figura 9: Curvas de parasitemia de camundongos C57BL/6 infectados com 1.000 formas tripomastigotas derivadas de cultura de células das cepas Colombiana, VL-10 e CL de *T. cruzi*. Grupos de 10 animais foram infectados com formas tripomastigotas derivadas de cultura celular das cepas (A) Colombiana; (B) VL-10 e (C) CL de *T.cruzi*, pré - tratadas ou não com suramina. Os dados em cada ponto da curva equivalem à média da parasitemia/dia referente a cada grupo. * $p<0,05$.

5.5 O pré-tratamento com suramina reduziu o infiltrado inflamatório cardíaco na infecção com formas tripomastigotas derivadas de cultura de células da cepa Colombiana de *T. cruzi*

Nos animais infectados com a cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas, o pré-tratamento com suramina não reduziu a inflamação no tecido cardíaco na infecção com as cepas Colombiana (Figura 10A, B), VL-10 (Figura 10C, D) e CL (Figura 10E, F). No entanto, a cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas da cepa VL-10 apresentou maior processo inflamatório cardíaco em animais infectados com parasitos pré-tratados ou não, quando comparado às cepas Colombiana e CL (Figura 10G).

Quando os camundongos foram infectados com formas tripomastigotas derivadas de cultura de células, o pré-tratamento com suramina foi capaz de reduzir o processo inflamatório cardíaco em animais infectados com a cepa Colombiana (Figura 11A, B). Além disso, observou-se que animais infectados com parasitos pré-tratados com suramina das cepas VL-10 (Figura 11C, D) e CL (Figura 11E, F) apresentaram aumento no processo inflamatório quando comparados aos animais infectados com a cepa Colombiana (Figura 11G).

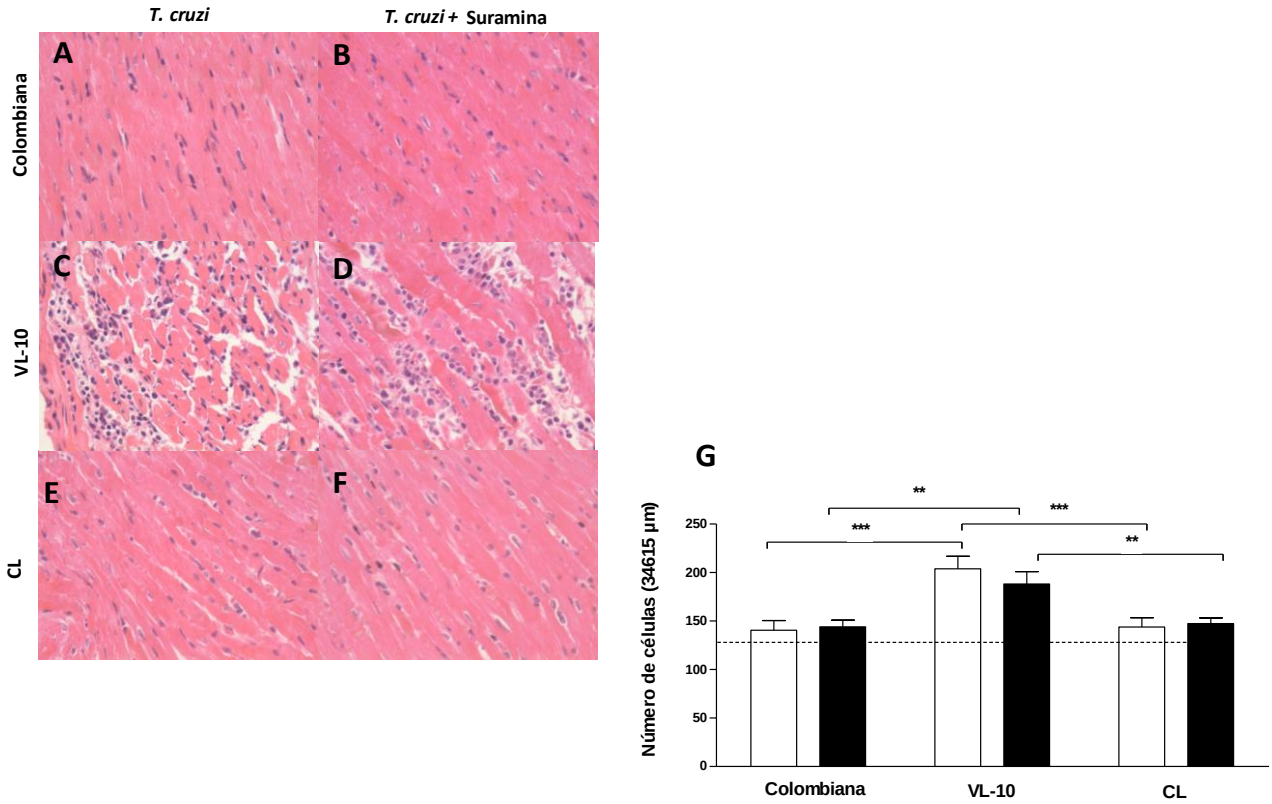

Figura 10: Fotomicrografias representativas do coração e quantificação do processo inflamatório no músculo cardíaco de camundongos infectados com 1.000 formas da cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas das cepas Colombiana, VL-10 e CL de *T. cruzi*. Fotomicrografias do infiltrado inflamatório (A-F) e análise do infiltrado inflamatório no tecido muscular cardíaco(G) de animais infectados com cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas das cepas Colombiana(A,B), VL-10 (C,D) e CL (E,F) de *T. cruzi*, pré-tratadas ou não com suramina. Hematoxilina-Eosina. Barra=50µm2. * p> 0,05 comparado com o grupo controle infectado e não tratado. A linha tracejada representa o número médio de células quantificadas em cortes histológicos cardíacos de animais não infectados(n=5).

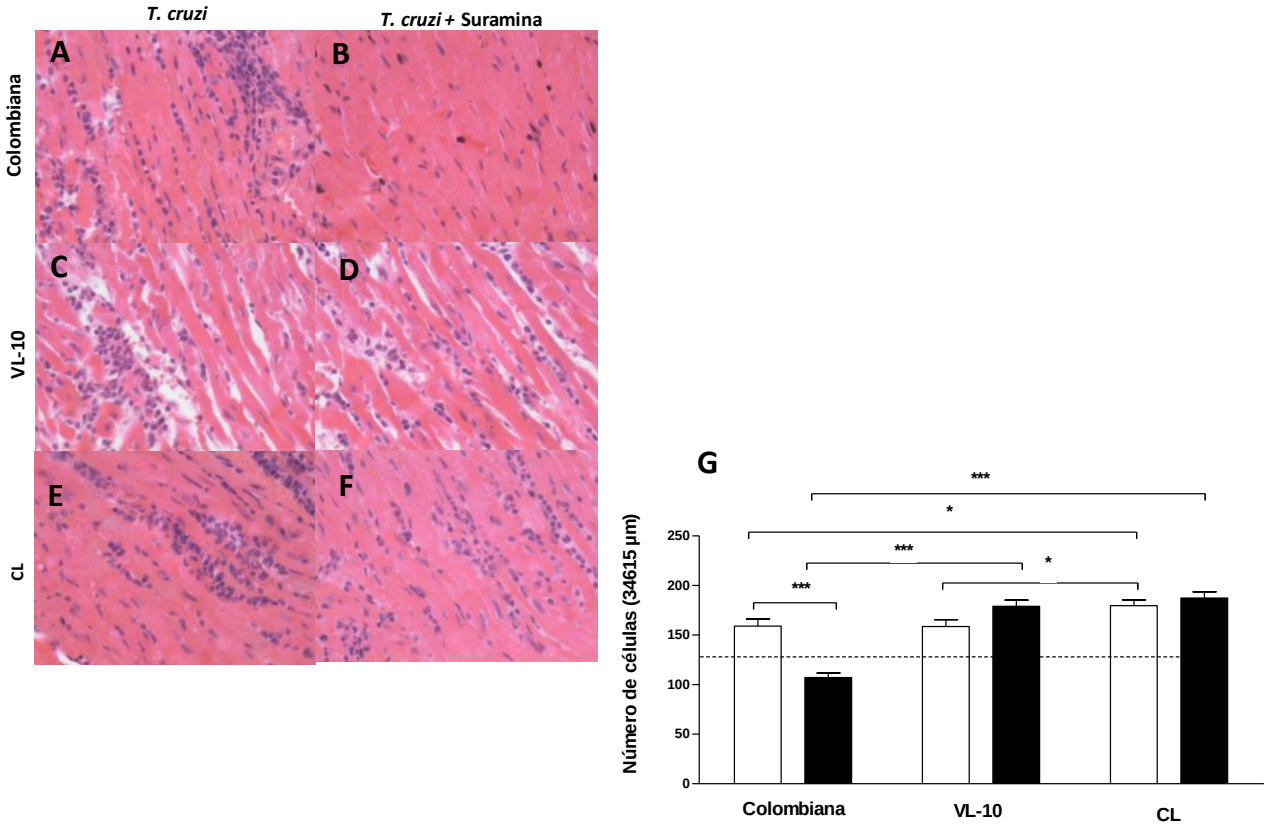

Figura 11: Fotomicrografias representativas do coração e quantificação do processo inflamatório no músculo cardíaco de camundongos infectados com 1.000 formas tripomastigotas derivadas de cultura de células das cepas Colombiana, VL-10 e CL de *T. cruzi*. Fotomicrografias do infiltrado inflamatório (A-F) e análise do infiltrado inflamatório no tecido muscular cardíaco(G) de animais infectados com formas tripomastigotas derivadas de cultura celular das cepas Colombiana(A,B), VL-10 (C,D) e CL (E,F) de *T. cruzi*, pré-tratadas ou não com suramina. Hematoxilina-Eosina. Barra=50µm2. * p> 0,05 comparado com o grupo controle infectado e não tratado. A linha tracejada representa o número médio de células quantificadas em cortes histológicos cardíacos de animais não infectados (n=5).

6. DISCUSSÃO

Uma vasta gama de moléculas de superfície da membrana, bem como enzimas que atuam em vias metabólicas, como o catabolismo da glicose, vias de salvação de fosfato-pentose e purinas, constituem elementos expressos/produzidos de maneira diferenciada nas diferentes formas evolutivas e nas diferentes populações genéticas do *T. cruzi*. Esses elementos têm sido considerados alvos quimioterápicos devido à interação direta envolvida entre o hospedeiro e o parasito (Duschak, 2011).

Destacando a via de salvação de purinas, alguns protozoários como *T. cruzi* carecem da síntese "de novo" e dependem inteiramente da via de salvação de purinas para capturá-las. A rápida taxa de replicação de *T. cruzi* exige uma alta carga energética, o que requer ATP como fonte de energia e purinas para a síntese de DNA e RNA (Koning et al., 2005, Opperdoes et al., 2016). Entretanto, enzimas responsáveis pela metabolização de nucleotídeos extracelulares, como as E-NTPDases, são utilizadas pelo *T. cruzi* para obter moléculas essenciais para sua sobrevivência. Após a atividade das E-NTPDases, o ATPe e seus produtos podem ser degradados em nucleosídeos e purinas e resgatados por transportadores de nucleosídeos equilibrados (Carter et al., 2001, Berg et al., 2010, Lauri et al., 2018). Alguns estudos mostram que *T. cruzi* (Campagnaro et al., 2018), *T. brucei* (Henriques et al., 2003), *Leishmania spp* (Vasudevan et al., 1998, Alzahrani et al., 2017), *Toxoplasma gondii* (Krug et al., 2012) e *Plasmodium falciparum* (Carter et al., 2000) apresentam esses transportadores codificados em seus genomas, permitindo assim resgatar uma ampla variedade de nucleosídeos e purinas do hospedeiro que são usados para a síntese de nucleotídeos por esses parasitos (Landfear et al. al., 2004, Lauri et al., 2018).

O ATP e os outros nucleotídeos são freqüentemente liberados para o meio extracelular a partir de células inflamatórias ou sob condição de morte celular em mamíferos (Junger, 2011). O ATPe pode mediar a migração celular em direção a tecidos inflamados, atuando como sensor de células apoptóticas e promove a maturação das células dendríticas, bem como a eliminação de células apoptóticas por fagocitose (Ayna et al., 2012, Schnurr et al., 2000). Nestes termos, todo organismo multi ou unicelular pode detectar alterações nas concentrações extracelulares de ATP através da sinalização purinérgica que são, em parte, responsáveis pela resposta imune contra esse organismo. As apirases da família CD39/GDa1 ou ectonucleotidase trifosfato

difosfohidrolase (E-NTPDases) são enzimas presentes na membrana de *T. cruzi* que interferem na sua interação com as células imunes do hospedeiro. Contudo, poucos estudos avaliaram a atividade dessa enzima em outras formas evolutivas e cepas de *T cruzi*. Dentre esses estudos, Bisaggio e cols (2003) analisaram a relação entre a atividade ectonucleotidásica e as diferentes formas evolutivas da cepa Y do parasito e observaram que a forma epimastigota apresentou menor atividade ectonucleotidásica em relação às formas tripomastigotas derivadas de cultivo celular e amastigotas. O estudo de Santos e cols (2009) avaliou a atividade ectonucleotidásica das formas tripomastigotas derivadas de cultivo celular de diferentes cepas do parasito (Y, CL, Be-62 e CL-Brener) e observaram que as diferentes cepas de *T. cruzi* possuem níveis distintos de hidrólise de ATP e ADP no qual a cepa Y apresentou maior nível de hidrólise de ATP e menor de ADP. Esse estudo também mostrou que a virulência e infectividade *in vitro* e *in vivo* das formas tripomastigotas derivadas da cultura de células (cepa Y) estavam relacionadas à maior atividade ectonucleotidásica.

No ciclo evolutivo de *T. cruzi* a forma tripomastigota é encontrada em dois momentos: na corrente sanguínea/ derivada de células e na ampola retal do inseto vetor (tripomastigota metacíclica). Devido à dificuldade em isolar a forma sanguínea e mantê-la viva para realização de experimentos, normalmente para estudos *in vitro*, utiliza-se a forma tripomastigota derivada de cultura de células. Esta forma também está presente no ciclo do parasito, quando após a replicação das formas amastigotas, as mesmas se diferenciam em tripomastigotas novamente e rompem as células para invadirem novas células/tecidos (Brener et al., 2000).

Vieira e cols (2012) demostraram que a origem da forma tripomastigota apresenta grande influência na evolução da fase aguda durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*. De acordo com este estudo, a infecção pela forma tripomastigota metacíclica promove uma resposta imune capaz de controlar não só o número de parasitos na fase aguda como também de promover uma resposta imunorreguladora no final da fase aguda limitando assim o avanço das lesões provenientes da doença de Chagas. Já a infecção com a forma tripomastigota sanguínea não é capaz de estabelecer uma resposta imunorreguladora eficaz levando há um processo inflamatório persistente.

As formas infectivas de *T. cruzi* utilizam de diferentes moléculas para interagir com células do hospedeiro, refletindo assim na resposta imune contra o parasito e,

consequentemente, na evolução clínica da doença. Dessa forma, a originalidade do nosso estudo está justamente em comparar a infecção por diferentes formas evolutivas (cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas e formas tripomastigotas derivadas de cultura de células) e cepas do parasito relacionando com a atividade ectonucleotidásica.

Acredita-se que as características biológicas observadas em populações genéticas distintas de *T. cruzi* (por exemplo virulência, imunogenicidade, patologia), bem como a fonte das formas tripomastigotas (metacíclicas ou derivadas da cultura de células) estejam, em parte, relacionadas à atividade ectonucleotidásica que, direta ou indiretamente, interferem no processo inflamatório do hospedeiro. Uma vez que há expressão diferente desta enzima nas diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* e nos grupos genéticos do parasito, possivelmente, esteja associada ao sucesso da infecção e ao desenvolvimento de quadros patológicos.

Nesse contexto, demonstramos que diferentes origens de formas tripomastigotas e diferentes cepas (Colombiana, VL-10 e CL) de *T. cruzi* possuem níveis distintos da atividade ectonucleotidásica, reforçando em parte os achados de Santos et al., 2009. A origem das formas tripomastigotas influenciou na atividade ectonucleotidásica, pois a cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas apresentou atividade superior às formas tripomastigotas derivadas da cultura de células. Acredita-se que como essas formas utilizam grupos distintos de moléculas de superfície para invadir células hospedeiras (Yoshida, 2006), parte de suas características também possam ser mantidas para a atividade ectonucleotidásica.

A inibição da atividade ectonucleotidásica pela suramina não foi capaz de inibir a hidrólise do ADP tanto nas formas evolutivas quanto nas cepas avaliadas. As E-NTPDases possuem várias isoformas que diferem na especificidade do substrato (Zimmermann, 2000). Portanto, nossos dados sugerem que diferentes cepas de *T. cruzi*, bem como a fonte das formas tripomastigotas, podem apresentar diferentes isoformas da ectonucleotidase. Essa observação também foi evidenciada com *Toxoplasma gondii*, em que cepas virulentas e não virulentas possuem diferentes isoformas da E-NTPDase. As cepas virulentas apresentaram TgNTPDase 1 e cepas avirulentas apresentaram TgNTPDase 2, também denominadas NTPDases 3 e 1 (Asai et al., 1995, Krug et al., 2012, Lauri et al., 2018).

Bisaggio e cols (2008) demonstraram que o efeito da suramina é mantido por vários dias, mesmo quando removido do meio, interferindo no número de células infectadas e no número de amastigotas. Da mesma forma, estudos anteriores mostraram que a suramina interfere na replicação de outros tripanossomatídeos (Hawking & Sen, 1960, Santos et al., 2009) e nossos dados mostraram que a inibição da atividade ectonucleotidásica afetou diretamente na redução da virulência de *T. cruzi* em ambas formas evolutivas e nas três cepas avaliadas após 24 e 72 horas de cultivo. Sabe-se que macrófagos infectados com *T. cruzi* expressam óxido nítrico sintase do tipo II, liberam óxido nítrico e eliminam parasitos na presença de L-arginina. A L-arginina modula essa produção de óxido nítrico/nitrito, enquanto os inibidores da arginase diminuem a produção de uréia, reduzem a liberação de nitrito pelos macrófagos e restauram a virulência de *T. cruzi* (Vespa et al 1994). Além disso, a suramina parece induzir indiretamente um aumento da produção de nitrito pelas células J774 infectadas para controlar a replicação dos parasitos. Nossa hipótese é baseada na inibição da atividade ectonucleotidásica e no aumento da concentração de ATPe, sinalizando "perigo" para o sistema imunológico (Ruiz-Stewart et al., 2004, Paiva et al., 2018).

Com base no estudo *in vitro* realizado por Santos e cols (2009), o pré-tratamento com suramina inibiu a infecção e a replicação de *T. cruzi* em células vero, além de reduzir a parasitemia e a mortalidade. Neste estudo, o pré-tratamento levou a redução da parasitemia e a um menor processo inflamatório em camundongos infectados com formas tripomastigotas derivadas de cultura de células da cepa Colombiana. A suramina também foi capaz de induzir alterações na expressão fenotípica de algumas proteínas presentes no ambiente extracelular da membrana do parasita e induzir alterações morfológicas na forma celular, ligação flagelar e alterações no movimento do parasito (Bisaggio et al., 2006, Bisaggio et al. 2008). Entretanto, o pré-tratamento de *T. cruzi* com suramina aumentou o infiltrado inflamatório em animais infectados com a cultura rica em formas tripomastigotas metacíclicas da cepa VL-10. Os mecanismos que explicam esse efeito adverso na infecção experimental pelo *T. cruzi* não são claros, mas acredita-se que a eficácia do pré-tratamento com suramina no estudo de Santos e cols (2009) pode ser um efeito compensatório da redução da viabilidade do parasito (Santos et al., 2015). Como observado por Bisaggio e cols (2003), as formas epimastigotas tratadas com altas doses de suramina aumentaram a atividade da E-NTPDase e mostraram maior capacidade de aderir aos macrófagos de

camundongos do que os parasitos não tratados, a fim de superar a inibição enzimática e garantir sua sobrevivência.

A suramina atua como antagonista dos receptores P2X e P2Y (Voogd et al.,1993) além de inibir a atividade ectonucleotidásica (Santos et al., 2009), no entanto este composto possui efeitos pleiotrópicos no parasito interferindo também na endocitose de moléculas e divisão celular. Logo, esta limitação do composto utilizado em nosso trabalho é uma questão a ser sanada em estudos futuros buscando compostos/inibidores específicos da NTPDase.

Outra enzima importante no contexto da sinalização purinérgica é a adenosina desaminase (ADA). Para *T. cruzi*, o perfil da atividade da ADA varia de acordo com a fonte das formas tripomastigotas e com as cepas. A ADA está relacionada a funções vitais de parasitos, como *Trypanosoma evansi* (Silva et al., 2011) e *Plasmodium falciparum* (Ivanov & Matsumura, 2012), uma vez que essa enzima é responsável pela degradação da adenosina em inosina, que posteriormente será utilizada na via de salvação de purinas desses parasitos (Lauri et al., 2018). É interessante notar que, embora *T. cruzi* tenha maior capacidade de hidrolisar o ATP, ele também possui maior atividade do ADA, responsável pela degradação da adenosina produzida a partir da hidrólise do ATP, diminuindo assim os efeitos anti-inflamatórios após a degradação da adenosina.

Em conjunto, nossos dados mostram que a atividade ectonucleotudásica participa na infecção pelo *T. cruzi* de acordo com a forma evolutiva do parasito e sua população genética. A ectonucleotidase auxilia o parasito em sua adesão na célula hospedeira e, também, na evasão do sistema imunológico. Assim, um estudo mais preciso envolvendo outras cepas do parasito e, até aprofundando na genômica de *T. cruzi* é de grande relevância para esclarecer algumas lacunas ainda desconhecidas envolvendo a relação parasito-hospedeiro e a patogênese.

7. CONCLUSÃO

A atividade ectonucleotidásica é dependente da origem da forma tripomastigota (metacíclicas ou derivadas de cultura celular) e do seu grupo genético (DTUs), favorecendo a infecção *in vitro* e *in vivo* de *T. cruzi*, além dela também exercer atividade na intensificação do processo inflamatório no tecido cardíaco.

8. REFE RÊNC IAS

Aliberti, J.C.S, Souto, J.T, Marino, A.P.M.P, Lannes-Vieira, J, Teixeira, M.M, Farber, J, Gazzinelli, R.T, Silva, J.S. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-g and-tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Pathol 158, 1433-1440, 2001.

Alzahrani, K. J. H., Ali, J. A. M., Eze, A. A., Looi, W. L., Tagoe, D. N. A., Creek, D. J., Barrett, M. P., de Koning, H. P. Functional and genetic evidence that nucleoside transport is highly conserved in *Leishmania* species: implications for pyrimidine-based chemotherapy, Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. 7:206–226, 2017.

Andrade, L. O. and Andrews, N. W. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. J. Exp. Med. 200: 1135-1143, 2004.

Andrade, S.G. & Andrade, Z. A. Estudo histopatológico comparativo das lesões produzidas por duas cepas do *Trypanosoma cruzi*. Hospital 1268-1278, 1966.

Andrade, S.G, Carvalho, M. L & Figueira, R. M. Caracterização morfobiológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. Gaz.Méd.Bahia 32-42, 1970.

Andrade, S.G. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. Rev.Pat.Trop. 65-121, 1974.

Andrade, S.G. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. Rev.Soc.Bras.Med.Trop. 39-46, 1985.

Andrade, S.G, Magalhães, J. B. Biodemes and zimodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. Rev.Soc.Bras.Med.Trop, 27-35, 1997.

Andrade, S.G, Campos, R.F, Steindel, M., Guerreiro, M.L, Magalhães, J.B, Almeida, M.C, Reis, J.N, Santos, V.C, Valadares, H.M, Reis, M.G, Macedo, A.M. Biological, biochemical and molecular features of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: its correspondence with the new *T. cruzi* Taxonomy Consensus (2009). Mem Inst Oswaldo Cruz,106 (8):948-56, 2011.

Anonymous. Recommendations from a Satellite Meeting. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 94:513 -517, 1999.

Antonioli, L. et al. Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? Drug Discov Today. Aug;19(8):1051-68, 2014.

Asai, T.; Miura, S.; Sibley, L.D.; Okabayashi, H.; Takeuchi, T. Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. The Journal of Biological Chemistry. 270(19): 11391-11397, 1995.

Ayna, G., Krysko, D.V., Kaczmarek, A., Petrovski, G., Vandenabeele, P., Fesus, L. ATP release from dying autophagic cells and their phagocytosis are crucial for inflammasome activation in macrophages. Plos One. 7, e40069, 2012.

Barros, F.S.; De Menezes, L.F.; Pinheiro, A.A.; Silva, E.F.; Lopes, A.H.; De Souza, W.; Meyer-Fernandes, J.R. Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in *Entamoeba histolytica*. Archives of Biochemistry and Biophysics. v.375(2), p.304-314, 2000.

Berg, M., Van der Veken, P., Goeminne, A., Haemers, A., Augustyns, K. Inhibitors of the purine salvage pathway: A valuable approach for antiprotozoal chemotherapy? Curr. Med. Chem. 2010. 17, 2456–2481, 2010.

Berrêdo-Pinho, M., Peres-Sampaio, C. E., Chrispim, P. P., Belmont-Firpo, R., Lemos, A. P., Martiny, A., Vannier-Santos, M. A., Meyer-Fernandes, J. R. A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. Arch Biochem Biophys. 391(1):16-24, 2001.

Bilate, A. M., Cunha-Neto, E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old Disease. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2: 67-74, 2008.

Bisaggio, D.F.R.; Peres-Sampaio, C.E.; Meyer-Fernandes, J.R.; Souto-Padrón, T. Ecto-ATPase activity on the surface of *Trypanosoma cruzi* and its possible role in the parasite-host cell interaction. Parasitology Research. v.91, p.273-282, 2003.

Bisaggio, D.F.R., Campanati, L., Pinto, R.C.V., Souto-Padrón, T. Effect of suramin on trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: changes on cell motility and on the ultrastructure of the flagellum–cell body attachment region. Acta Trop 98:162–75, 2006.

Bisaggio, D.F., Adade, C.M., Souto-Padron, T. In vitro effects of suramin on *Trypanosoma cruzi*. Int J Antimicrob Agents 31: 282–286, 2008.

Bonney, K.M., Luthringer, D. J., Kim, S. A., Garg, N. J., Engman, D. M. Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 14: 421–447, 2019.

Bours, M.J, Swennen, E.L, Di Virgilio, F, Cronstein, B.N, Dagnelie, P.C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. Pharmacol Ther. 112:358-404, 2006.

Braun N, Sévigny J, Robson SC, Enjyoji K, Guckelberger O, Hammer K, Di Virgilio F, Zimmermann H. Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/cd39 expression to microglia and vasculature of the brain. Eur J Neurosci 12:4357-4366, 2000.

Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 4: 389-396, 1962.

Brener, Z. & Chiari, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 5:5 – 220-224, 1963.

Brener, Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. Ann. Trop. Med. Parasitol., 59: 19-26, 1965.

Brener Z. The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. Ann.Trop.Med.Parasitol. 63, 215-220, 1969.

Brener Z. Intraespecific variations in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct characteristics. Scientific Publication 11-21, 1977.

Brener, Z., Andrade, Z. & Barral-Netto, M. O *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,, p. 431, 2000.

Brisse, S.; Barnabe, C.; Tibayrenc, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineagens by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. Int. J. Parasitol., v. 30, p. 35-40, 2000.

Burnstock, G. Purinergic receptors in the nervous system Curr. Top. in Membranes. Purinergic Receptors and Signallinged 54: 307– 368, 2003.

Burnstock, G., Knight, G. E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. Int Rev Cytol. 240: 231-304, 2004.

Burnstock G. Purinergic signalling--an overview. Novartis Found Symp. 276: 26-48, 2006.

Burnstock, G., Satchell, D.G., Smythe, A. A. Comparison of the excitatory and inhibitory effects of nonadrenergic, non-cholinergic nerve stimulation and exogenously applied ATP on a variety of smooth muscle preparations from different vertebrate species. Br J Pharmacol 46: 234–242, 1972.

Campagnaro, G. D., de Freitas Nascimento, J., Girard, R.B.M., Silber, A.M, de Koning, H. P. Cloning and characterisation of the Equilibrative Nucleoside Transporter Family of *Trypanosoma cruzi*: Ultra-high affinity and selectivity to survive in the intracelular niche. Biochim Biophys Acta Gen Subj. 1862(12): 2750-2763, 2018.

Campos, M. A., Gazzinelli, R. T. *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. Mediators Inflamm., 13: 139-43, 2004a.

Carter, N.S., Landfear, S.M., Ullman, B. Nucleoside transporters of parasitic protozoa. Trends Parasitol. 17: 142–145, 2001.

Carter, N.S., Mamoun, C.B., Liu, W., Silva, E.O., Landfear, S.M., Goldberg, D.E., Ullman, B. Isolation and functional characterization of the PfNT1 nucleoside transporter gene from *Plasmodium falciparum*. J. Biol. Chem. 275: 10683–10691, 2000.

Cekic, C. and Linden, J. Purinergic regulation of the imune system. Nature Reviews Immunology. 16: 177– 192, 2016.

Chagas, C. Nova Tripanozomíase Humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotripanum cruzi*. n. gen., n. SP. agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1:159-218. 1909.

Cirillo, A., Chifflet, S., Villar, B. Neural retina of chick embryo in organ culture: effects of blockade of growth factors by suramin. Cell Tissue Res. 304, 323–331, 2001.

Coelho, P.S, Klein, A, Talvani, A, Coutinho, S.F, Takeuchi, O, Akira, S, Silva, J.S, Canizzarro, H., Gazzinelli, R.T, Teixeira, M.M. Glycosylphosphatidylinositol-anchored

mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages. J Leukoc Biol 71: 837-844, 2002.

Cortez, C., Martins, R.M., Alves, R.M., Silva, R.C., Bilches, L.C., Macedo, S., et al. Differential infectivity by the oral route of *Trypanosoma cruzi* lineages derived from Y strain. PLoSNegl.Trop.Dis. 6, e1804, 2012a.

Cortez C, Sobreira TJ, Maeda FY, Yoshida N. The gp82 surface molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms. Subcell Biochem 74:137-50, 2014.

Cortez, C., Real, F., Yoshida, N. Lysosome biogenesis/scattering increases host cell susceptibility to invasion by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms and resistance to tissue culture trypomastigotes. Cellular Microbiology 18: 748-760, 2016.

Cortez, M.,Neira,I.,Ferreira,D.,Luquetti,A.O.,Rassi,A.,Atayde,V.D.,et al.Infection by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule gp30. Infect. Immun. 71, 6184–6191, 2003.

Coutinho-Silva, R., Monteiro da Cruz, C., Persechini, P. M., Ojcius, D. M. The role of P2receptors incontrolling infections by intracellular pathogens. Purinergic Signal. 3: 83–90, 2007.

Cunha-Neto, E., Nogueira, L.G., Teixeira, P.C., Ramasawmy, R., Drigo, S.A., Goldeberg, A.C., Fonseca, S.G., Bilate, A.M., Kalil, J. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. Mem Inst Oswaldo Cruz 104: 252-258, 2009.

Cutrullis, R. A., Petray, P. B., and Corral, R. S. MIF-driven activation of macrophages induces killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* dependent on endogenous production of tumor necrosis factor, nitric oxide and reactive oxygen species. Immunobiology 222: 423–431, 2017.

da Silva, A., Pimentel, V.C., Jaques, J.A.S, Wolkmer, P., Tavares, K.C.S, Lazzarotto, C.R, Miletti, L.C, Schetinger, M.R.C, Mazzanti, C.M., Lopes, S.T.A, Monteiro, S.G. Biochemical detection of adenosine deaminase in *Trypanosoma evansi*. Experimental Parasitology. 128: 298–300, 2011.

De Clerq, E. Suramin: a potent inhibitor of the reverse transcriptase of RNA tumor viruses. Cancer Lett. 8, 9–22, 1979.

Desdín-Micó, G., Soto-Heredero, G., Mittelbrunn, M.. Mitochondrial activity in T cells. Mitochondrion 41: 51–57, 2017.

Ding, Q. and Tan, K.S. The danger signal extracellular ATP is an inducer of Fusobacterium nucleatum biofilm dispersal. Front. Cell. Infect. Microbiol. 6, 155, 2016.

Duschak, V.G. A decade of targets and patented drugs for chemoterapy of Chagas disease. Recent Pat Antiinfect Drug Discov. 6 (3): 216-59., 2011.

Dutra, W.O, Rocha, M.O, Teixeira, M.M. The clinical immunology of human Chagas disease. Trends Parasitol 21: 581-587, 2005.

Dvorak JA, Hyde TP. *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. 1. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. Exp Parasitol 34:268–283, 1973.

Ekman, P., and Jager, O. Quantification of subnanomolar amounts of phosphate bound to seryl and threonyl residues in phosphoproteins using alkaline hydrolysis and malachite green. Anal. Biochem. 214, 138–141, 1993.

Fairlamb, A.H., Bowman, I.B.R. Uptake of trypanocydal drug suramin by bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and its effects on respiration and growth rate in vivo. Mol. Biochem. Parasitol.1, 315–333, 1980.

Favoreto, S.Jr., Dorta, M.L., and Yoshida, N. *Trypanosoma cruzi* 175-kDa protein tyrosine phosphorylation is associated with host cell invasion. Exp.Parasitol. 89, 188–194, 1998.

Fernandes, M. C. and Andrews, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. FEMS Microbiol. Rev. 36: 734-747, 2012.

Fernandes MC, Cortez M, Flannery AR, Tam C, Mortara RA, Andrews NW. *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. J Exp Med 208: 909-921, 2011.

Ferrari, D., Idzko, M., Dichmann, S., Purlis, D., Virchow, C., Norgauer, J., Chiozzi, P., Di Virgilio, F., Luttmann, W. P2 purinergic receptors of human eosinophils:

characterization and coupling to oxygen radical production. FEBS Lett. 486: 217–224, 2000.

Ferrari, D., Idzko, M., Muller, T., Manservigi, R., Marconi, P. Purinergic Signaling: A new pharmacological target against viruses? Trends in Pharmacological Sciences. 39: 926-936, 2018.

Ferreira,D., Cortez,M., Atayde, V.D., andYoshida,N. Actin cytoskeleton-dependent and- independent host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is mediated by distinct parasite surface molecules. Infect.Immun. 74, 5522–5528, 2006.

Fietto, J.L.R.; Demarco, R.; Nascimento, I.P.; Castro, I.M.; Carvalho, T.M.U.; Souza, W.; Bahia, M.T.; Alves, M.J.M.; Verjovski-Almeida, S. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. Biochemical and Biophysical Research Communications. v.316(2), p.454-460, 2004.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg. 81, 5: 755-59. 1987.

Frederici, E. E.; Abelmann, W. H.; Neva, F. A. Chronic and Progressive Myocarditis and Myositis in C3h Mice Infected with *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg. 13 272-80, 1964.

Freitas, J.M., Augusto-Pinho, L., Pimenta, J.R., Bastos-Rodrigues, L., Gonçalves, O., Macedo, A.M., Machado, C.R. e Pena, S.D. Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. Plos Pathog. 226-235, 2006.

Gao, J., Zhang, T., Kang, Z., Ting, W., Xu, L., Yin, D. The F0F1 ATP synthase regulates human neutrophil migration through cytoplasmic proton extrusion coupled with ATP generation. Mol. Immunol. 90: 219–226, 2017.

Giusti, G., Gakis, C. Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. Enzyme. 12: 417–420, 1971.

Gomes, J. A.; Molica, A. M.; Keesen, T. S., Morato, M. J., de Araujo, F. F., Fares, R. C., Fiuza, J. A., Chaves, A.T., Pinheiro, V., Nunes, M. do C., Correa-Oliveira, R., da Costa Rocha, M.O. Inflammatory mediators from monocytes down-regulate cellular

proliferation and enhance cytokines production in patients with polar clinical forms of Chagas disease. Hum Immunol.75: 20-8, 2014.

Gomes, R. S., de Carvalho, L. C., de Souza Vasconcellos, R., Fietto, J. L., Afonso, L. C. E-NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) of *Leishmania amazonensis* inhibits macrophage activation. Microbes Infect. 4: 295-303, 2015.

Gonçalves VM, Matteucci KC, Buzzo CL, Miollo BH, Ferrante D, Torrecilhas AC, Rodrigues MM, Alvarez JM, Bortoluci KR. NLRP3 controls *Trypanosoma cruzi* infection through a caspase-1-dependent IL-1R-independent NO production. Plos Negl Trop Dis 7:e2469, 2013.

Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. Anal Biochem. 126: 131–138, 1982.

Hawking, F., Sen, A. B. The trypanocidal action of homidium, quinapyramine and suramin. Br J.Pharmacol Chemother. 15: 567-70, 1960.

Henriques, C., Sanchez, M.A., Tryon, R., Landfear, S.M. Molecular and functional characterization of the first nucleobase transporter gene from African trypanosomes. Mol. Biochem. Parasitol. 130, 101–110, 2003.

Homolya, L., Steinberg, T.H., Boucher, R.C. Cell to cell communication in response to mechanical stress via bilateral release of ATP and UTP in polarized epithelia. J Cell Biol 150:1349–1360, 2000.

Ivanov, A. A., Matsumura, I. The adenosine deaminases of *Plasmodium vivax* and Plasmodium falciparum exhibit surprising differences in ligand specificity. J Mol Graph Model. 35: 43–48, 2012.

Jacob, F., Pérez Novo, C., Bachert, C., Van Crombruggen, K. Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. Purinergic Signal. 9: 285–306, 2013.

Jennings F, Rodgers J, Bradley B, Gettinby G, Kennedy P, Murray M. HAT: potential therapeutic benefits of an alternative suramin and melarsoprol regimen. Parasitol. Int. 51:381–388, 2002.

Junger, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. Nat. Rev. Immunol. 11: 201–212, 2011.

de Koning, H.P., Bridges, D.J., Burchmore, R.J.S. Purine and pyrimidine transport in pathogenic protozoa: from biology to therapy. FEMS Microbiol. Rev. 29, 987– 1020, 2005.

de Koning, H.P.; Watson, C.J.; Sutcliffe, L.; Jarvis, M.S. Differential regulation of nucleoside and nucleobase transporters in *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei brucei*. Molecular and Biochemical Parasitology. v.106, p.93-107, 2002.

Korten S, Badusche M, Büttner DW, Hoerauf A, Brattig N, Fleischer B. Natural death of adult *Onchocerca volvulus* and filaricidal effects of doxycycline induce local FOXP3+/CD4+ regulatory T cells and granzyme expression. Microbes Infect 10:313-324, 2008.

Krettli, A.U. e Brener, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. J. Immunol. 129, 2009-2012, 1982.

Krug, U., Zebisch, M., Krauss, M., Sträter, N. Structural insight into activation mechanism of *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate diphosphohydrolases by disulfide reduction. J. Biol. Chem. 287: 3051–3066, 2012.

Lana, M., Da Silveira, P.A., Barnabe, C., Quesney, V., Noel, S. e Tibayrenc, M. *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. Exp. Parasitol. 90, 20-25, 1998.

Landfear, S.M., Ullman, B., Carter, N.S., Sanchez, M.A. Nucleoside and nucleobase transporters in parasitic protozoa. Eukaryot. Cell. 3: 245–254, 2004.

Lauri, N., Bazzi, Z., Alvarez, C.L., Leal Denis, M.F., Schachter, J., Herlax, V., Ostuni, M.A., Schwarzbaum, P. J. ATPe Dynamics in Protozoan Parasites. Adapt or Perish. Genes (Basel.) 10 (1), pii: E16, 2018.

Maeda, F.Y., Cortez,C., Alves,R. M., and Yoshida,N. Mammalian cell invasion by closely related *Trypanosoma species T.dionisii* and *T.cruzi*. ActaTrop. 121, 141–147, 2012.

Mahoney, C.W., Azzi, A., Huang, K.P. Effects of suramin, an anti-human immunodeficiency virus reverse transcriptase agent, on protein kinase C. J. Biol. Chem. 265, 5424–5428, 1990.

Maioli, T. U., Takane, E., Arantes, R. M., Fietto, J. L., Afonso, L. C. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. Parasitol Res. 94(3):207-12, 2004.

Marin-Neto JA, Cunha-Neto, E, Maciel BC, Simões, MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease: Circulation. 115: 1109-1123, 2007.

Mariotini-Moura, C., Silva e Bastos, M., de Castro, F. F., Trindade, M. L., Vasconcellos, R. de S., Neves-do-Valle, M. A., Moreira, B. P., Santos, R. de F., de Oliveira, C. M., Cunha, L. C., Souto, X. M., Bressan, G. C., Silva-Júnior, A., Baqui, M. M., Bahia, M. T., de Almeida, M. R., Meyer-Fernandes, J. R., Fietto, J. L. *Trypanosoma cruzi* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion. Acta Tropica. 130: 140–147, 2014.

Martins,R.M., Alves,R.M., Macedo, S., and Yoshida, N. Starvation and rapamycin differentially regulate host cell lysosome exocytosis and invasion by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms. Cell.Microbiol. 13, 943–954, 2011.

McNamara, N., Khong, A., McKemy, D., Caterina, M., Boyer, J., Julius, D., Basbaum, C. ATP transduces signals from ASGM1, a glycolipid that functions as a bacterial receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 98:9086–9091, 2001.

Melo, R.C, Brener, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. J Parasitol 64: 475-482, 1978.

Mendes da Silva LD, Gatto M, Miziara de Abreu Teodoro M, de Assis Golim M, Pelisson Nunes da Costa ÉA, Capel Tavares Carvalho F, Ramos Rodrigues D, Câmara Marques Pereira P, Victoriano de Campos Soares ÂM, Calvi SA. Participation of TLR2 and TLR4 in Cytokines Production by Patients with Symptomatic and Asymptomatic Chronic Chagas Disease. Scand J Immunol 85:58-65, 2017.

Meyer- Fernandes, J. R. Ecto-ATPases in protozoa parasites: looking for a funciotion. Parasitol, Int 51,299-303, 2002.

Meyer-Fernandes, J.R., Saad-Nehme, J., Peres-Sampaio, C.E., Belmont-Firpo, R., Bisaggio, D.F., Do Couto, L.C., Fonseca de Souza, A.L., Lopes, A.H., Souto-Pádron, T. A Mg-dependent ecto-ATPase is increased in the infective stages of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Res. May;93(1):41-50, 2004.

Miles, M.A., Toye, P.J., Oswald, S.C. & Godfrey, D.G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg. 71, 217-225, 1977.

Morel, C., Chiari, E., Camargo, E.P., Mattei, D.M., Romanha, A.J. & Simpson. L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 77, 6810-6814, 1980.

Morris, S. A., Tanowitz, H. B., Wittner, M., Bilezikian, J. P. Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas disease. Circulation 82: 1900-1909, 1990.

Murta AC, Persechini PM, Padron Tde S, de Souza W, Guimarães JA, Scharfstein J. Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. Mol Biochem Parasitol 43:27-38, 1990.

Novaes, R. D., Santos, E. C., Cupertino, M. C., Bastos, D. S. S., Mendonça, A. A. S., Marques-da-Silva, E. A., Cardoso, S. A., Fietto, J. L. R., Oliveira, L. L. Purinergic Antagonist Suramin Aggravates Myocarditis and Increases Mortality by Enhancing Parasitism, Inflammation and Reactive Tissue Damage in *Trypanosoma cruzi* – infected mice. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2018: 1-11, 2018.

Ohmori, T., Yatomi, Y., Okamoto, H., Miura, Y., Rile, G., Satoh, K., Ozaki, Y. G(i)-mediated Cas tyrosine phosphorylation in vascular endothelial cells stimulated with sphingosine 1- phosphate: possible involvement in cell motility enhancement in cooperation with Rho-mediated pathways. J. Biol. Chem. 276: 5274–5280, 2001.

Opperdoes, F.R., Butenko, A., Flegontov, P., Yurchenko, V., Lukeš, J. Comparative metabolism of free-living Bodo saltans and parasitic trypanosomatids, J. Eukaryot Microbiol. 63: 657–678, 2016.

Osswald, H., and Youssef, M. Suramin enhancement of the chemotherapeutic actions of cyclophosphamide or Adriamycin of intramuscularly-implanted Ehrlich carcinoma. Cancer Lett., 6: 337-343, 1979.

Paiva, C.N., Medei, E., Bozza, M.T. ROS and *Trypanosoma cruzi*: fuel to infection, poison to the heart. Plos Pathog 14: e1006928, 2018.

Pandolfi, F., Altamura, S., Frosali, S., Conti, P. Key role of DAMP in inflammation, cancer, and tissue repair. Clin. Ther. 38: 1017–1028, 2016.

Pinheiro, C.M.; Martins-Duarte, E.S.; Ferraro, R.B.; De Souza, A.L.F.; Gomes, M.T.; Lopes, A.H.C.S.; Vannier-Santos, M.A.; Santos, A.L.S.; Meyer-Fernander, J.R. *Leishmania amazonensis*: Biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. Experimental Parasitology. v.114, p.16-25, 2006.

Plesner, L. Ecto-ATPases: identities and functions. Int Ver Cytol 158:141–214, 1995.

Ponce NE, Sanmarco LM, Eberhardt N, García MC, Rivarola HW, Cano RC, Aoki MP. CD73 Inhibition Shifts Cardiac Macrophage Polarization toward a Microbicidal Phenotype and Ameliorates the Outcome of Experimental Chagas Cardiomyopathy. J Immunol 197:814-823, 2016.

Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. The Lancet Rev. 1: 92-100, 2001.

Ralevic, V., Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacol Rev 50:413–492, 1998.

Revollo, S., Oury, B., Laurent, J.P., Barnabe, C., Quesney, V., Carriere, V., Noel, S. & Tibayrenc, M. *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. Exp.Parasitol. 89, 30-39, 1998.

Robson, S.C., Sévigny, J., Zimmermann, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. Purinergic Signal. (2):409-30, 2006.

Rodríguez A, Rioult MG, Ora A, Andrews NW. A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca2+ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. J Cell Biol 129:1263-1273, 1995.

Romanha, A.J. Heterogeneidade Isoenzimática em *Trypanosoma cruzi*, PhD Tese, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 110 pp, 1982.

Romanha, A.J., Da Silva Pereira, A.A., Chiari, E. & Kilgour, V. Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. Comp Biochem.Physiol B 62, 139-142, 1979.

Ruiz-Stewart, I., Tiyyagura S.R., Lin J.E., Kazerounian, S., Pitari, G.M., Schulz, S., Martin, E., Murad, F., Waldman, S.A. Guanylyl cyclase is an ATP sensor coupling nitric oxide signaling to cell metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A. 6, 37-42, 2004.

Russell, J.W., Gill, J.S., Sorenson, E.J., Schultz, D.A., Windebank, A.J. Suramin-induced neuropathy in an animal model. J. Neurol. Sci. 192, 71–80, 2001.

Santos EC, Novaes RD, Cupertino MC, Bastos DS, Klein RC, Silva EA, Fietto JL, Talvani A, Bahia MT, Oliveira LL. Concomitant Benznidazole and Suramin Chemotherapy in Mice Infected with a Virulent Strain of *Trypanosoma cruzi*. Antimicrob Agents Chemother. 59:5999-6006, 2015.

Santos RF, Pôssa MA, Bastos MS, Guedes PM, Almeida MR, Demarco R, Verjovski-Almeida S, Bahia MT, Fietto JL. Influence of Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence. PLoS Negl Trop Dis. 3:e387, 2009.

Schenkman S, Jiang MS, Hart GW, Nussenzweig V. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. Cell 65:1117-1125, 1991.

Schlemper, B R Jr. Characterization of strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from pacients with different clinical forms of Chagas disease. Rio de Janeiro; s.n; 1982. 131 p. ilus. 1982.

Schnurr, M., Then, F., Galambos, P., Scholz, C., Siegmund, B., Endres, S., Eigler, A. Extracellular ATP and TNF-a synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. J Immunol. 165: 4704e9, 2000.

Seror C, Melki MT, Subra F, Raza SQ, Bras M, Saidi H, Nardacci R, Voisin L, Paoletti A, Law F, Martins I, Amendola A, Abdul-Sater AA, Ciccosanti F, Delelis O, Niedergang F, Thierry S, Said-Sadier N, Lamaze C, Metivier D, Estaquier J, Fimia GM, Falasca L, Casetti R, Modjtahedi N, Kanellopoulos J, Mouscadet JF, Ojcius DM, Piacentini M, Gougeon ML, Kroemer G, Perfettini JL Extracellular ATP acts on P2Y2 purinergic receptors to facilitate HIV-1 infection. J Exp Med 208:1823–1834, 2011.

Silva, J. S., Machado, F. S., Martins, G. A. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. Front Biosci 8: s314-s325, 2003.

Soldani, P., Pellegrini, A., Gesi, M., Lenzi, P., Paparelli, A. Suramin-induced ultrastructural changes in the testis of albino rats. Exp Toxicol Pathol 48:299–305, 1996.

Souza W., Carvalho T. C. M. U., Barrias, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. International Journal of Cell Biology. 2010: 1-18, 2010.

Tardieux I, Webster P, Ravesloot J, Boron W, Lunn JA, Heuser JE, Andrews NW. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. Cell. 71:1117–1130, 1992.

Tibayrenc, M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. Adv. Parasitol., v. 36, p. 47-115, 1995.

Toledo, M.J., De, L.M., Carneiro, C.M., Bahia, M.T., Machado-Coelho, G.L., Veloso, V.M., Barnabe, C., Tibayrenc, M. & Tafuri, W.L. Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. Exp.Parasitol. 100, 161-172, 2002.

Toyé, P. J. Isoenzyme variation in isolates of *Trypanosoma cruzi*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 68, 147, 1974.

Trautmann, A. Extracellular ATP in the immune system: more than just a “danger signal”. Sci. Signal. 2, pe6, 2009.

Vasconcelos, E.G.; Nascimento, P.S.; Meirelles, M.N.; Verjovski-Almeida, S.; Ferreira, S.T. Characterization and localization of an ATPdiphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *Schistosoma mansoni*. Molecular and Biochemical Parasitology. v.58(2), p.205-214, 1993.

Vasudevan, G., Carter, N.S., Drew, M.E., Beverley, S.M., Sanchez, M.A., Seyfang, A., Ullman, B., Landfear, S.M. Cloning of *Leishmania* nucleoside transporter genes by rescue of a transport-deficient mutant. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 9873–9878, 1998.

Vespa, G.N., Cunha, F.Q., Silva, J.S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. Infect Immun. 62:5177-82, 1994.

Vieira, P. M. DE A., Franscisco, A. F., Machado, E. M. M., Nogueira, N. C., Fonseca, K. S., Reis, A. B., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O. A., Tafuri, W. L., Carneiro, C. M. Different infective forms trigger distinct immune response in experimental chagas disease. Plos One. 7: 1–10, 2012.

Voogd, T.E., Vansterkenburg, E.L., Wilting, J., Janssen, L.H. Recent research on the biological activity of suramin. Pharmacol Rev 45:177–203, 1993.

Woolsey AM, Sunwoo L, Petersen CA, Brachmann SM, Cantley LC, Burleigh BA. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. J Cell Sci 116:3611-22, 2003.

Wright, R. H, Fernandez-Fuentes, N., Oliva, B., Beato, M. Insight into the machinery that oils chromatin dynamics. Nucleus 7: 532–539, 2016.

Yegutkin, G. G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities. Crit Rev Biochem Mol Biol. 49:473-497, 2014.

Yegutkin, G., G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. Biochim. Biophys. Acta 1783: 673–694, 2008.

Yoshida, NA. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. An Acad Bras Cienc 78(1):87-111, 2006.

Yoshida,N., Dorta,M.L., Ferreira,A.T., Oshiro,M.E., Mortara,R.A., Acosta- Serrano,A., et al. Removal of sialic acid from mucin-like surface molecules of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enhances parasite–host cell interaction. Mol. Biochem.Parasitol. 84, 57–67, 1997.

Zhang YL, Keng YF, Zhao Y, Wu L, Zhang ZY. Suramin is an active site-directed, reversible, and tight-binding inhibitor of protein-tyrosine phosphatases. J Biol Chem 273:12281–7, 1998.

Zimmermann H, Braun N. Ecto-nucleotidases: molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system. Prog Brain Res 120:371–385, 1999.

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

Zimmermann H. Ectonucleotidases: Some recent developments and note on nomenclature, Drug Dev Res; 52:44-56, 2001.

Zimmermann, H., Zebisch, M., Sträter, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. Purinergic Signal. 8: 437–502, 2012.

Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R.S, Campbell, D.A, Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A, Romanha, A.J., Sturm, N.R, Tibayrenc, M., Schijman, A.G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 104(7): 1051-1054, 2009.

Zingales, B., Miles, M.A., Campbell, D.A., Tibayrenc, M., Macedo, A.M., Teixeira, M.M.G., Schijman, A.G., Llewellin, M.S., Lages-Silva, E., Machado, C.R., Andrade, S.G., Sturm N.R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect. Gene t. Evolut, 12: 240-253, 2012.