

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO DE UMA ATP-DIFOSFOHIDROLASE DE

Trypanosoma cruzi

IVAN PEREIRA NASCIMENTO

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica do
Instituto de Química da Universidade de São Paulo**

Orientador:

Prof. Dr. Sergio Verjovski-Almeida

SÃO PAULO

1998

“Caracterização de uma ATP-Difosfohidrolase de *Trypanosoma cruzi*”.

IVAN PEREIRA NASCIMENTO

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado por:

Prof. Dr. SERGIO VERJOVSKI DE ALMEIDA
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. PEDRO SOARES DE ARAUJO
IQ - USP

Prof. Dr. SERGIO SCHENKMAN
UNIFESP

SÃO PAULO
09 DE MARÇO DE 1998

*À mainha Josefa, que me deu não apenas à luz,
mas também a luz que ilumina o meu caminho.*

*“ Que a tua Luz possa de alguma maneira
iluminar a mente daqueles que acreditam
apenas na escuridão da ciência”.*

*A painho Pedro e aos meus irmãos Tan, Véio,
Lóren, Lon e Bi.*

Obrigado por vocês serem assim.

À minha noiva *Carla*. “Nenhum ser se tornará Uno,
até que encontre a si mesmo.

E isso só será possível,
quando ele encontrar outro Ser”.

Obrigado Carla por você ter tornado-me Uno.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Sergio Verjovski-Almeida que me recebeu em seu laboratório e fez deste um local de aprendizado inestimável, sem o qual ficaria difícil dar continuidade a posteriores desafios na carreira científica.

À Prof^a. Maria Julia Manso Alves, para a qual, sem dúvida alguma, também dirigo os agradecimentos do primeiro parágrafo.

Ao Prof. Jorge Mauricio David que me iniciou na pesquisa científica.

À Prof^a. Marisa Medeiros, que se fez presente em um momento inicial, mas fundamental, para o desenvolvimento do meu mestrado.

Ao Prof. Roberto Casadei, que mostrou desde o início uma preocupação pela minha formação e que me fez ver, que nem só de arrogância vive a ciência.

Aos colegas de pós-graduação, Marinez, Luiz, Fátima, Jorge, Fernando, Bia, Telma, Luciano, Lucivanda, Izaura , em fim, à todos que se tornaram, de alguma maneira, parte integrante da minha passagem por esse instituto, tornando-a bem mais agradável.

À Marinei Gonçalves e ao Roberto, e de um modo geral a todos os funcionários técnicos, peças humanas importantíssimas nessa engrenagem chamada pesquisa científica.

Ao colega Ricardo Giordano, que dedicou muito do seu tempo e paciência, para ensinar-me técnicas, que apesar de não terem sido relatadas nesse trabalho, foram, sem dúvida alguma, tão importantes quanto o trabalho aqui apresentado.

À colega Eveline Vasconcelos, por ter dado-me o suporte técnico necessário ao desenvolvimento desse trabalho, o qual foi de extrema importância para que o mesmo chegasse ao seu término.

Aos colegas de laboratório Eduardo, Vitor, Alessandra, Juliana, Roberto, Paulinho, Paolo, André, Melissa, Valéria, Juliana, Jefferson e Ivone. "Que os motivos que nos levaram a partilharmos do mesmo espaço, possam de alguma maneira estenderem-se a outros tantos".

Aos amigos Humberto, Newman, Glauber, Lucas, que por serem baianos já justificaria os agradecimentos, mas não sendo isso o bastante, então por estarem presentes aqui, tornando a distância da terra mãe, não tão distante assim.

Aos amigos Almir, Carlisvan, Eduardo, Evanilson, Josué, Luciano, Renivaldo, Robison, e Josélia que acreditam e torcem por mim.

A todos os amigos distantes, mas não esquecidos, que por motivos culturais e históricos não puderam também fazerem-se distantes, e que vêem em mim uma espécie de "auto-realização".

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	v
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Ciclo Biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.2. Fosfohidrolases detectadas em <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
1.3. ATP-difosfohidrolase.....	8
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1. Materiais.....	14
3.2. Obtenção dos diversos estágios do parasita.....	15
3.3. Determinação da concentração de proteínas.....	17
3.4. Medidas de hidrólise de nucleotídeos.....	18
3.5. Efeito do pH sobre as atividades ATPásica e p-nitrofenilfosfatásica.....	18
3.6. Eletroforese em gel não desnaturante.....	19
3.7. Dependência de concentrações para Ca^{2+} e Mg^{2+}	22
3.8. Reatividade cruzada entre a apirase de <i>T. cruzi</i> e soros anti-apirase de batata e anti-NTPase de <i>Toxoplasma gondii</i>	23
3.9. Dependência da concentração de substratos.....	25

3.10. Imunoprecipitação.....	25
3.11. Análise comparativa da atividade ATPásica, ensaiada para os diversos estágios das cepas Y e CL 14 de <i>T. cruzi</i>	27
3.12. Determinação da atividade ATPásica usando o parasita intacto.....	28
3.13. Determinação da quantidade de proteínas por número de parasitas	29
3.14. Imunolocalização por microscopia de imunofluorescência.....	29
4. RESULTADOS.....	30
4.1. Especificidade enzimática	30
4.2. Exclusão de associações enzimáticas.....	32
4.3. Eletroforese em gel não desnaturante.....	35
4.4. Curvas de atividade em função da concentração de Ca^{2+} e Mg^{2+}	37
4.5. Curva de atividade em função da concentração de substrato.....	40
4.6. Reatividade cruzada dos soros anti-NTPase de <i>T. gondii</i> e anti-apirase de batata contra a ATP-difosfohidrolase do <i>T. cruzi</i>	42
4.7. Imunoprecipitação.....	44
4.8. Análise comparativa da atividade ATP-difosfohidrolásica, ensaiada para os diversos estágios das cepas Y e CL 14 de <i>T. cruzi</i>	46
4.8.1. Estudo comparativo da atividade ATPásica dos diversos estágios das cepas Y e CL 14 de <i>T. cruzi</i> , em gel não desnaturante.....	49
4.9. Atividade ATPásica usando parasitas intactos.....	53
4.10. Imunolocalização da ATP-difosfohidrolase.....	54

5. DISCUSSÃO.....	56
5.1. Especificidade enzimática.....	56
5.2. Exclusão de associações enzimáticas.....	58
5.3. Dependência de Ca^{2+} e Mg^{2+}	59
5.4. Determinação do Km da apirase de <i>Trypanosoma cruzi</i>	61
5.5. Resultados com soros imunes anti-apirase de outros organismos.....	61
5.6. Purificação parcial da ATP-difosfohidrolase por eletroforese em gel não desnaturante.....	63
5.6. Imunolocalização da ATP-difosfohidrolase.....	64
6. CONCLUSÕES.....	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

ABREVIATURAS

ADP- Adenosina 5'difosfato

AMP- Adenosina 5'monofosfato

Ap₅A- p¹, p⁵-di (adenosina) 5'pentafosfato

ATP - Adenosina 5'difosfato

ATP- Adenosina 5'trifosfato

CDP- Citosina 5'difosfato

CTP- Citosina 5'trifosfato

dATP- deoxi-adenosina 5'trifosfato

EDTA- ácido etilenodiamino tetraacético

EGTA- ácido etileno-glicol bis (B-aminoetileter)-N,N, tetraacético

GDP- Guanosina 5'difosfato

GTP- Guanosina 5'trifosfato

HEPES- (N-piperazina [2-hidroxietil]-N'-[2-ácido etanosulfônico])

kDa- kiloDaltons

MOPS- ácido (3-N-morfolino)- propanosulfônico

NTPase- Nucleosídeo trifosfato hidrolase

PBS- Tampão fosfato salina

SDS-PAGE- eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

TCA- Ácido tricloroacético

TEMED- N, N, N', N'- tetrametiletilenodiamina

Tris- Tris (hidroximetil) aminometano

TRITC- Tetrametilrodamina isotiocianato

Triton X-100- polioxietilenoglicol (9-10) p-t-octilfenol

Tween 20- polioxietilenosorbitan monolaureato

UDP- Uridina 5' difosfato

UTP- Uridina 5' trifosfato

RESUMO

ATP-difosfohidrolases, comumente denominadas de apirases, descritas pela primeira vez à cerca de quarenta anos atrás, são enzimas que hidrolisam nucleosídeos di ou trifosfatados por um mecanismo que parece ser sequencial, mas sem a formação de um intermediário energético, e de funções metabólicas ainda desconhecidas. Elas tem sido encontradas nas células dos mais diversos pró- e eucariotos investigados e também em tumores. A vasta abundância dessas enzimas e a sua alta atividade enzimática sugerem que as mesmas estariam envolvidas em importantes funções do metabolismo celular.

No presente trabalho, identificamos e caracterizamos a presença de uma nova enzima em *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da doença de Chagas, uma apirase, com características semelhantes à outras apirases já descritas em diversos organismos. Diversos ensaios enzimáticos foram feitos mostrando uma atividade enzimática que não foi anulada pelos inibidores clássicos de ATPases tipo-P, tipo-F ou tipo-V. Esta enzima mostrou dependência para Mg^{2+} , não acontecendo o mesmo para Ca^{2+} . Experimentos usando soros imunes contra apirases de outras fontes, revelaram não apenas reação cruzada, mas também sugeriram que a massa molecular dessa enzima no *T. cruzi*, estaria em torno de 57,5 kDa. Ensaio citoquímico (imunofluorescência) com o soro imune anti-NTPase de *Toxoplasma gondii*, apresentou fluorescência contra diferentes estágios desse protozoa. No entanto, a localização subcelular dessa enzima no *T. cruzi* não ficou muito clara, tornando-se necessário uma microscopia eletrônica para resolver esse problema. Um dado interessante e particular nesse trabalho, foi a presença dessa enzima nos diversos

estágios do ciclo de vida do parasita, com atividades enzimáticas diferentes para esses mesmos estágios.

ABSTRACT

ATP-diphosphohydrolases which are generally called apyrases were described for the first time some forty years ago. These are enzymes which hydrolyze di- and tri-phosphate nucleosides through a mechanism which seems to be sequential, without forming a high-energy enzyme intermediate. Their metabolic function is yet unknown. ATP-diphosphohydrolases have been found in a number of pro- and eucariotic cells and also in tumor cells. The vast abundance of these enzymes and their high enzymatic activity suggest that they are involved in important functions in the cell metabolism.

In the present work we have identified and characterized the presence of a new enzyme in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, namely an apyrase with characteristics which are similar to other apyrases already described in different organisms. A number of enzymatic assays showed that the enzyme is not inhibited by the classical inhibitors of P-type, F-type or V-type ATPases. The enzyme exhibited a marked dependence on Mg^{2+} and not on Ca^{2+} . Experiments using immune sera against apyrases of other sources showed cross- reactivity and suggested that the molecular mass of the enzyme in *T. cruzi* is around 57.5 kDa. Immunofluorescence cytochemistry using anti-*Toxoplasma gondii* NTPase antibodies showed that fluorescence was present in different stages of the protozoa. However, the exact sub-cellular localization of the enzyme in *T. cruzi* was not clear and electron microscopy will be necessary to answer this question. An interesting result of our work is the identification of the enzyme in different stages of the life cycle of the parasite, with different enzymatic activities among the stages.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado (Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae) capaz de parasitar o homem, causando a Doença de Chagas também conhecida como tripanossomíase americana (Chagas, 1909). Atualmente esta doença afeta cerca de 16-18 milhões de pessoas na América Latina, desde o México até o sudoeste da Argentina (Moncayo, 1993). Por essa razão esse grupo de protozoários tem sido objeto de alguns estudos nos últimos anos. Este parasita tem um complexo ciclo de vida caracterizado pela presença de diferentes estágios de desenvolvimento que podem ser observados nos hospedeiros vertebrados e invertebrados. Os hospedeiros vertebrados somam uma grande variedade de espécies, incluindo o homem.

Durante o ciclo de vida do *T. cruzi* há diferentes formas que podem ser facilmente identificadas. A definição dessas formas está baseada principalmente em critérios morfológicos, tais como a forma geral da célula, a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e a região de onde o flagelo emerge da bolsa flagelar. De acordo com esses critérios, as seguintes formas tem sido identificadas: 1) epimastigotas: essas formas medem 20-40 μm de comprimento, seu cinetoplasto está localizado anteriormente ao núcleo e multiplicam-se no tubo digestivo de insetos triatomíneos. São também encontrados no interior das células de vertebrados, no final do ciclo intracelular, quando as formas amastigotas transformam-se em tripomastigotas (Meyer & de Oliveira, 1948; Almeida de Faria et al., 1997); 2) tripomastigotas: possuem cerca de 25 μm de comprimento, o cinetoplasto está localizado posteriormente ao núcleo, são observadas em

células de tecido e no sangue do hospedeiro vertebrado, na porção superior do tubo digestivo, nas fezes e na urina do hospedeiro invertebrado. É uma forma responsável pela infectividade desse protozoa e não sofre divisão; e 3) amastigota: é arredondada, mede cerca de 4 μm de diâmetro, possui um flagelo curto e é a forma multiplicativa intracelular.

O ciclo biológico do parasita inicia-se quando o hospedeiro invertebrado, através da picada, suga o sangue de mamíferos infectados. Os hospedeiros invertebrados são insetos triatomíneos hematófagos pertencentes às famílias Hemiptera e Reduvidae, tais como *Rhodinus prolixus*, *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, e outros. Durante a picada, as formas tripomastigotas circulantes no sangue do hospedeiro vertebrado infectado são ingeridas pelo inseto. Estas formas transformam-se em epimastigotas no intestino médio do inseto. Os epimastigotas dividem-se rapidamente por fissão binária e podem fixar-se às células do intestino (Zeledon et., 1977). No reto uma certa proporção de epimastigotas transformam-se em tripomastigotas metacíclicos, que são eliminados com as fezes e são capazes de infectar o hospedeiro vertebrado quando encontram uma descontinuidade na pele ou mucosa (Brenner e Alvarenga, 1976; Brenner, 1973; Brack, 1968; Dias, 1934; Zeledon et al., 1977).

Ao penetrar no hospedeiro, o *T. cruzi* pode invadir uma extensa variedade de células: células fagocíticas, principalmente macrófagos (Andrade & Andrade, 1979) e células não fagocíticas, tais como células epiteliais, fibroblastos, células musculares e neurônios (Brenner, 1992). Em humanos, o parasita mostra preferência por células musculares e nervosas, sendo esse tropismo preferencial, provavelmente devido a características intrínsecas das células invadidas, como também ao tipo de cepa do parasita. As formas tripomastigotas que invadem as células interagem com moléculas da membrana

modificando o trânsito de lisossomos dependentes de microtúbulos e contribuindo para a formação de membranas dos vacúolos parasitóforos (cf. Alves, 1996). Os tripomastogotas conseguem escapar desse vacúolo, indo para o citoplasma onde se diferenciam e multiplicam-se como amastigotas por divisão binária. Posteriormente, ocorre uma nova diferenciação para a forma tripomastigota que é liberada para a circulação pela ruptura da membrana plasmática. Estes tripomastigotas podem invadir então novas células ou atingir órgãos distantes.

A transmissão do *T. cruzi* para o homem pode ocorrer não só pelo inseto vetor, mas também por transfusão de sangue, transplante de órgãos, via placentária, oral ou acidental. Os insetos vetores são encontrados em toda a América, desde o sul dos EUA até o sudoeste da Argentina (Brenner & de La Merced, 1987). A disseminação dos vetores ocorre principalmente nas regiões rurais, onde as instalações precárias de moradia se tornam um nicho ideal para o habitat dos vetores devido à proximidade com o ciclo natural.

Um complemento para o ciclo biológico do *T. cruzi* clássico, como descrito, tem sido proposto, com a forma amastigota podendo invadir e estabelecer o ciclo intracelular, como sugerido inicialmente por Umezawa et al., (1985). Além disso há alguns trabalhos mostrando que sob condições determinadas, formas amastigotas podem ser obtidas em culturas axênicas. Foi mostrado que essas formas são capazes de reproduzir o ciclo intracelular do *T. cruzi* em células de músculo da pele mantidas em cultura de tecido (Pan, 1978). Quando formas circulantes de algumas linhagens de *T. cruzi* são inoculadas em meio axênico, observam-se agrupamentos de formas arredondadas, que são capazes de se multiplicar (Baker & Price, 1973). Essas formas são, por critérios morfológicos,

bioquímicos, imunológicos e ultraestruturais, semelhantes às amastigotas (Andrews et al., 1987; Ley et al., 1988; Mortara, 1991). Marcadores moleculares específicos de amastigotas, não encontrados em tripomastigotas ou formas intermediárias, foram identificados em sua superfície (Andrews et al., 1987; Lima et al., 1988). Esses dados, os quais mostram uma diferenciação da forma tripomastigota em amastigota em meio de cultura livre de células, sugerem que o mesmo poderia ocorrer no sangue de hospedeiros vertebrados, contrastando, portanto, com o ciclo de vida do *T. cruzi* classicamente estabelecido. Segundo esses autores, amastigotas, produzidos extracelularmente ou liberados de células infectadas durante a lise, poderiam circular e infectar outras células.

1.2. Fosfohidrolases detectadas no *Trypanosoma cruzi*

Há muitas informações a respeito de fosfohidrolases em tripanosomatídeos. Aqui, serão citadas apenas as ATPases julgadas importantes ao trabalho, ou seja, aquelas que de algum modo poderiam mascarar os resultados previstos para a apirase do *T. cruzi*.

A presença de fosfatases tem sido descrita em vários trabalhos (Zingales et al., 1979; Letelier, et al., 1985, 1986; Nagakura, et al., 1985, 1986). Atividade ácido-fosfatásica em *Trypanosoma cruzi* foi localizada sobre a superfície externa da membrana plasmática. Tanto a atividade específica, como a atividade por célula dessa enzima foram significativamente mais altas nas células amastigotas do que em tripomastigotas e epimastigotas. Durante a transformação de epimastigotas a amastigotas **in vitro**, essa atividade ácido-fosfatásica foi elevando-se comitadamente com o aumento na população de amastigotas. Esses resultados foram interpretados de duas maneiras: uma é que essa elevação da atividade enzimática seria requerida para a parasitemia intracelular desse

organismo e a outra é que isso seria uma consequência da transformação morfológica. Uma atividade ácido-fosfatásica também localizada sobre a superfície externa de *T. cruzi* foi recentemente descrita por Furuya et al., (1998).

O íon cálcio está envolvido em um grande número de diferentes processos fisiológicos, sendo requerido, entre outras funções, como sinalizador intracelular para adesão, motilidade, expressão gênica e proliferação celular (Ghosh & Greenberg, 1995; Berridge, 1993) ou de estímulos externos, que provocam respostas nas células de eucariotos (Carafoli, 1991). Em eucariotos mais evoluídos, bombas de cálcio ou (Ca^{2+} - Mg^{2+})-ATPases localizadas na membrana plasmática, têm sido propostas como a estrutura responsável pela manutenção da concentração de Ca^{2+} citoplasmático em nível submicromolar. Estas ATPases hidrolisam ATP, utilizando a energia química derivada dessa hidrólise para extrair cálcio do citosol para o espaço extracelular (Carafoli 1991; Rega, 1986). Em muitas células eucarióticas a homeostase de cálcio é feita pela ação combinada de alguns sistemas transportadores de cálcio localizados na membrana plasmática, retículo endoplasmático e mitocôndria (Carafoli, 1987; Akron, 1988).

Têm crescido as evidências que apoiam uma função importante do Ca^{2+} em tripanosomatídeos. Assim, a reunião dos microtúbulos em *T. brucei* (Dolan et al., 1986), o movimento flagelar em *Crithidia oncopelti* (Holwill & McGregor, 1976), a liberação de glicoproteínas variantes de superfície em tripanosomas africanos (Voorheis & Martin, 1982) e a diferenciação celular em *Leishmania* (Morrow et al., 1981) parecem ser reguladas por cálcio. Além disso, a principal proteína de células eucarióticas, calmodulina, que serve como um sensor de Ca^{2+} , tem sido detectada e isolada de tripanosomas

americanos (Tellez-Ifion et al., 1985; Gonçalves et al., 1980) e africanos (Ruben et al., 1983).

A presença de uma Ca^{2+} -ATPase em tripanosomatídeos tem sido amplamente debatida. Enquanto alguns grupos têm descrito a ausência desta, outros tem mencionado a existência de uma enzima que é independente de Mg^{2+} (McLaughlin, 1985; Ghosh et al., 1990; Mazumder et al., 1992) ou igualmente inibida por este. Todavia, em nenhum desses trabalhos foi mostrado uma correlação entre a atividade Ca^{2+} -ATPásica observada e a função de transporte de cálcio atribuída a essa enzima. Não obstante, diversos trabalhos mostrando a existência de uma Ca^{2+} -ATPase dependente de Mg^{2+} com alta afinidade por cálcio além de outras características semelhantes à Ca^{2+} -ATPase de mamíferos, têm sido realizados em *Trypanosoma cruzi* entre outros tripanosomatídeos (Benaim et al., 1991, 1993, 1995; Cataldi & Stoppani, 1992).

A bomba de sódio ou Na^+/K^+ -ATPase, como frequentemente é denominada, está presente na membrana plasmática de muitas células animais. Esta ATPase, a exemplo da Ca^{2+} -ATPase, também utiliza a energia livre liberada pela remoção de um dos grupos fosfato do ATP para direcionar o movimento de Na^+/K^+ contra seus respectivos gradientes eletroquímicos (Sweadner & Goldin, 1980).

Várias tentativas têm sido feitas para obter-se frações puras de membrana plasmática de diversos tripanosomatídeos, incluindo *T. cruzi*. Em muitos casos o único caminho para assegurar-se da pureza dessas frações é através de ensaios por meios de marcadores enzimáticos, dentre os quais a Na^+/K^+ -ATPase seria um desses. Tais estudos no entanto, têm revelado a inexistência dessa enzima em *T. cruzi* (Pereira et al., 1978; Zingales et al., 1979).

Desde que muitas enzimas intracelulares são extremamente sensíveis às concentrações de $H^+(OH^-)$, células eucarióticas necessitam manter o pH citoplasmático em faixas bastantes restritas (Roos & Boron, 1981; Swallow et al., 1988). Quatro principais sistemas, que participam na regulação do pH interno, têm sido identificados (Roos & Boron, 1981; Swallow, et al., 1988). O transporte Na^+/H^+ promove a troca líquida de Na^+ externo por H^+ interno, sendo dirigido pelo gradiente de Na^+ interno (Roos & Boron, 1981). Outros dois sistemas regulatórios do pH interno envolvem a translocação de equivalentes de protons através da membrana plasmática na forma de bicarbonato (HCO_3^-) em troca de íon cloreto (Cabantchik et al., 1978; Boron, 1983). Em adição aos três sistemas listados acima, um quarto mecanismo regulatório do pH interno existe em algumas células. É conhecido que extrusão de prótons dependente de ATP ocorre em algumas células normais e tumorais (Van Adelsberg & Al-Awqati, 1986; Turrini et al., 1989), bem como em eucariotos menos evoluídos tais como *Saccharomyces cerevisiae* (Serrano, 1988) e *Pneumocystis carinii* (Docampo et al., 1996). Nestes casos, acredita-se que a bomba de próton seria mediada por ATPases. Essas bombas ocorrem em duas formas, uma H^+ -ATPase eletrogênica e uma H^+/K^+ -ATPase eletroneutra. As H^+ -ATPases de membrana plasmática de eucariotos como a levedura são do tipo-P (sensível a vanadato) (Serrano, 1988), enquanto que as presentes em células de mamíferos são do tipo-V ou vacuolar (insensível a vanadato) (Van Adelsberg & Al-Awqati, 1986; Turrini et al., 1989).

Alguns trabalhos mostrando a existência de H^+ -ATPase em *Trypanosoma cruzi* têm sido relatados (Vanderheyden et al., 1996; Schwarcz et al., 1995).

Uma H^+ -ATPase presente em compartimentos ácidos denominados de acidocalcissomas têm sido descrita por Docampo et al. (1995). Segundo esse autor, essa enzima que, estaria localizada na membrana desses vacúolos ácidos, seria responsável pelo acúmulo de cálcio nesses vacúolos, através de um mecanismo em que cálcio estaria sendo armazenado nesses compartimentos ácidos em troca de protons numa reação dependente de ATP.

ATPases do tipo-F ($F_0-F_1 H^+$ -ATPase) presentes em mitocôndrias também tem sido descritas em *T. cruzi* (Cataldi-Flombaum & Stoppani, 1986; Rilo & Stoppani, 1993).

Embora muitos trabalhos tenham sido feitos evidenciando diversas ATPases em *T. cruzi*, nenhum, até o momento, mostrando a existência de uma ATP-difosfohidrolase nesse protozoa, foi descrito.

1.3. ATP-difosfohidrolase

ATP-difosfohidrolase (E. C. 3. 6. 1. 5.), comumente chamada de apirase, foi descrita pela primeira vez por Meyerhof (1945).

Apirases revelam baixa especificidade por substrato. Elas catalizam a hidrólise de nucleosídeos di- e trifosfatados extra ou intracelularmente, bem como tiamina pirofosfato (Valenzuela et al., 1989; Yagi et al., 1991; Frasseto et al., 1993; Komoszynski & Skalska, 1990). Enzimas de diferentes fontes diferem na razão de hidrólise de ATP e ADP. A razão de hidrólise de ATP para ADP varia entre um e dois para muitas apirases (Valenzuela et al., 1989; Yagi et al., 1991; Frasseto et al., 1993; Komoszynski & Skalska, 1990). O pH ótimo dessa enzima em planta está em torno de 6,5 (Valenzuela et al., 1989; Komoszynski

& Skalska, 1990; Vara & Serrano, 1981), enquanto que para as apirases de animais está acima de 7,0 (Sarkis & Salto, 1991; Picher et al., 1993).

Informações sobre enzimas que hidrolisam nucleosídeos extracelulares tri e/ou difosfatados sobre a superfície das células podem ser encontradas na literatura sob diversos nomes. Esses incluem Ecto (Ca^{2+} - ou Mg^{2+} -dependente)-nucleosídeos trifosfatases, nucleosídeos fosfohidrolases, ATP pirofosfatases, ATPDases, apirase e alguns outros nomes.

O termo Ecto-ATPase é usado para enzimas que hidrolisam ligações pirofosfato de nucleosídeos extracelulares tri- e/ou difosfatados. No entanto, nucleosídeos monofosfatados e fosfatos não nucleosídicos não são seus substratos. Além disso, uma ecto-ATPase caracteriza-se por uma atividade enzimática dependente de Ca^{2+} ou Mg^{2+} , que é insensível a inibidores específicos de ATPases tipo-P, tipo-F e tipo-V. Uma atividade enzimática exibindo tais características é chamada atividade ATPásica tipo E.

ATP-difosfohidrolase tem sido encontrada em células de todos pro- e eucariotos investigados (Amano et al., 1993; Vasconcelos, 1993; Hamlyn & Senior, 1983; Valenzuela et al., 1989; Yagi et al., 1991) e em células tumorais (Knowles et al., 1983). A vasta abundância dessas enzimas e a sua alta atividade enzimática sugerem que apirases poderiam desempenhar um importante papel no metabolismo celular (Najjar et al., 1993).

Há algumas evidências de que apirase participa na neurotransmissão (Edwards & Gibb, 1993), agregação plaquetária e regulação da pressão sanguínea (Marcus & Safier, 1993), controles dos níveis de açúcar e glicosilação de proteínas (Fanta et al., 1988), bem como na regulação da integridade de membranas (Girolomoni et al., 1993).

A ATP-difosfohidrolase foi inicialmente encontrada como uma enzima solúvel com atividades ATPásica e ADPásica dependentes de íons metálicos divalentes em vários tecidos de plantas (Mazelis, 1959; Traverso et al., 1965, 1970). Molnar & Lorand (1961) purificaram dois tipos de enzimas na batata, que foram chamadas de apirase solúvel e apirase insolúvel. Outras apirases insolúveis foram isoladas de outros tecidos de plantas tais como grão de bico (Vara & Serrano, 1981) e caule de ervilha (Tognoli & Marré, 1981).

Estudos no sentido de conhecer o papel fisiológico da ATP-difosfohidrolase da batata têm sido feitos (Fanta et al., 1988; Anich et al., 1990). Embora ainda não esteja definida a função, Anich e cols. (1990) propõem que esta enzima estaria relacionada à hidrólise do ADP produzido durante os diferentes passos de síntese de amido. Várias reações da glicosiltransferase são comumente inibidas pelos resultantes nucleosídeos difosfatados. A ATP-difosfohidrolase poderia ativar essas reações por remoção dos produtos inibitórios. Tanto a síntese de sacarose como a de amido em plantas envolvem reações reversíveis liberando UDP ou ADP como produtos e a enzima poderia favorecer todas essas reações até finalização das mesmas.

Em invertebrados, a atividade apirásica está associada com a glândula salivar de insetos hematófagos, onde um papel antihemostático tem sido descrito. Neste caso, supõe-se que a enzima atue diretamente sobre o ADP, inibindo a agregação plaquetária. A saliva ou homogenizado de glândula salivar de artrópodes não relacionados tais como o barbeiro Rhodnius prolixus (Ribeiro & Garcias, 1979; Sarkis, 1985), a mosca tsetse Glossina austeni (Mant & Parker, 1981), o carrapato Ixodes dammini (Ribeiro et al.,

1985) previnem agregação plaquetária *in vitro* e contêm alta concentração de atividade apirásica. Está presente também em mosquitos *Aedes aegypti* (Ribeiro et al., 1984).

Em mamíferos, a ATP-difosfohidrolase tem sido encontrada ligada à membrana nos seguintes tecidos animais: glândula salivar, glândula mamária e útero de rato (Valenzuela et al., 1992); pâncreas de porco (LeBel et al., 1980); membrana plasmática de várias células de mamíferos, incluindo tecido normal e tumoral (Knowles et al., 1983); aorta bovina (Yagi et al., 1989; Côté et al., 1991); sinaptosoma de rato (Battastini et al., 1991); placenta humana (Papamarck & Tsolas, 1990); placenta de rato (Pieber et al., 1991) e plaquetas (Frasseto et al., 1993). A função da ATP-difosfohidrolase em aorta bovina, placenta humana, e de rato, tem sido proposta como estando ligada à inibição da agregação plaquetária. Já a enzima de sinaptosoma de rato supõe-se estar envolvida no metabolismo de liberação de ATP nas fendas sinápticas, participando juntamente com a 5'-nucleotidase na formação de adenosina, que é a principal forma de reabsorção de nucleotídeo (Battastini et al., 1991).

Uma atividade ATP-difosfohidrolásica foi caracterizada na superfície externa de *Schistosoma mansoni* (Vasconcelos, 1993), e também na superfície externa de *Entamoeba histolytica* (McLaughlin & Muller 1981; Aley et al., 1980). O endo-parasita *Toxoplasma gondii* também exibe uma alta atividade nucleosídeo trifosfato hidrolásica (Bermudes et al., 1994), esta foi descrita originalmente como uma enzima citosólica (Asai et al., 1983). No entanto, Sibley et al., (1993) têm sugerido que esta enzima estaria localizada em grânulos densos e vesículas secretoras do parasita, sendo secretada no espaço vacuolar de células infectadas.

Nos últimos anos, diversas apirases de diferentes organismos foram clonadas e suas sequências de aminoácidos comparadas entre si, mostrando bastante similaridade. Entre estas NTPases, estão a guanosina difosfatase de levedura (Abeijon et al., 1993), nucleotídeo trifosfatase (NTPase) de ervilha (Asai et al., 1995), NTPase de *Toxoplasma gondii* (Bermudes et al., 1994), apirase de turbéculo de batata (*Solanum tuberosum*) (Handa and Guidotti., 1996) e CD39 uma molécula expressa em células T ativadas (Wang and Guidotti, 1996). Essas sequências sugerem uma nova família de nucleosídeos fosfatases (Vasconcelos et al, 1996) as quais contêm um motivo conservado (I/V)(V/M/I)(I/L/F/C)DAGS(S/T) próximo à região amino-terminal.

2. OBJETIVOS

O trabalho tem como objetivo identificar e caracterizar a presença de uma ATP-difofoshidrolase na superfície de *T. cruzi*, utilizando-se métodos de caracterização dessa enzima semelhantes aos que foram utilizados em outras espécies. Esses métodos consistem em ensaios padrão de atividade enzimática, que serão feitos na presença de inibidores de diversas outras enzimas que utilizam ATP, eliminando-se, dessa forma, possíveis associações ou atividades enzimáticas que poderiam de alguma maneira interferir nos resultados da atividade da enzima em questão.

A identificação de uma ATP-difofoshidrolase em *T. cruzi* poderá ser feita, também, através de uma possível reatividade cruzada entre soros imunes policlonais anti-ATP-difofoshidrolase de outras fontes e a provável apirase de *T. cruzi*.

Outros experimentos como eletroforese em gel não desnaturante, dependência de concentrações para Ca^{2+} e Mg^{2+} e medida da especificidade por substrato também serão feitos.

A localização da enzima no *T. cruzi* será feita principalmente através de estudos citoquímicos (imunofluorescência e microscopia eletrônica).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Nucleotídeos, inibidores de proteases, azida, ortovanadato de sódio, ouabaína, EDTA, EGTA, Mops, Hepes, Triton-X, deoxicolato de sódio, Temed e acrilamida foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO). Sepharose-Proteína A, foi obtida da Pharmacia. O Kit-ECL para detecção em “western blotting” mais as membranas de nitrocelulose foram adquiridas da Amersham (USA). Todos os outros reagentes foram do mais alto grau analítico.

O soro imune contra a proteína de fusão NTPase de *Toxoplasma gondii* (Bermudes et al., 1994) foi gentilmente cedido pelo Dr. Keith Joiner (Yale University School of Medicine, USA). Anti-soro monoespecífico anti-apirase de batata *Solanum tuberosum* var. Desirée (isoforma de 49 kDa) foi obtido a partir do inóculo da apirase, extraída de SDS-PAGE, em coelho. Este soro foi cedido pela Dra. M. A. Valenzuela (Universidade do Chile, Santiago, Chile).

3.2. Obtenção dos diversos estágios do parasito

3.2.1. Epimastigotas

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (Liver Infusion and Triptose) (Camargo, 1964), em agitador rotatório a 28° C. As células foram recuperadas durante o crescimento estacionário por centrifugação em 1000x g (4° C). O protozoário foi lavado duas vezes com NaCl 0,9 %.

3.2.2. Tripomastigotas Metacíclicos

Tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* foram obtidos através de culturas epimastigotas em meio LIT ou em meio de Grace (Sigma) contendo 20 % de soro fetal bovino e então purificados numa coluna de dietilaminoetil (DEAE-celulose, Sigma) (Al-Abiassy et al., 1972), obtendo-se um eluido com 99-100 % de tripomastigotas metacíclicos. Os parasitas foram lavados com NaCl 0.9 % para retirar o fosfato contaminante, antes de serem usados para os experimentos de atividade ATPásica.

3.2.3. Amastigotas extracelulares

Células epitéliais de rim de macaco Rhesus, LLC-MK₂, mantidas em garrafas de 75 mL em meio DME (Dulbecco's modified eagle medium) contendo 20 % de soro fetal. foram infectadas com tripomastigotas e incubadas em estufa a 37 °C por 2 dias com o parasita (Andrews & Colli, 1982). Ao final desse tempo, as células foram lavadas e um novo meio foi adicionado às mesmas. Após o quarto dia de infecção, as formas tripomastigotas começaram a eclodir. Ao longo de 7 dias, o número de formas

amastigotas foi aumentando em relação às tripomastigotas, sendo que entre o sétimo e o décimo dia o número de amastigotas obtidos no sobrenadante era superior a 90 %. Essa amostra foi recuperada por centrifugação, ressuspensa em 3 mL de DME e centrifugada sobre 1 mL de “Lymphoprep” (Gibco) a 1000 g por 10 minutos. As células amastigotas foram recuperadas e contado o número de células.

3.2.4. Tripomastigotas de cultura de tecidos

Tripomastigotas foram obtidos a partir de células LLC-MK₂, como descrito para a obtenção das células amastigotas, sendo que o sobrenadante das células foi coletado no quarto dia após a incubação, quando os tripomastigotas estão praticamente livres de contaminação com outras formas do parasita.

3.2.5. Amostras usadas para a maioria dos experimentos.

A obtenção de todas as amostras citadas acima tinha como objetivo o estudo comparativo entre as diversas formas de *T. cruzi* da cepa Y e do clone CL-14 (Silva & Nusserzweig, 1953; Brener & Chiari, 1963), em relação à enzima em estudo. Os demais experimentos para a caracterização da ATP-difosfohidrolase em *T. cruzi* foram feitos com amostras de tripanosomas metacíclicos contendo em média 80 % dessa forma em relação à forma epimastigota. A menos que seja mencionado, todos os experimentos realizados nesse trabalho foram feitos com essa amostra.

Formas metacíclicas de *T. cruzi*, clone CL-14, foram obtidas através de culturas de epimastigotas em meio LIT e então diferenciados em metacíclicos em meio Grace. Os tripomastigotas metacíclicos após diferenciação foram recuperados por centrifugação em

7500 rpm e lavados duas vezes com NaCl 0.9 % para retirar fosfato contaminante originado do meio de cultura.

As células ($2-4 \times 10^{10}$) após serem lavadas, foram ressuspendidas em 5 mL de tampão Tris-Cl 5mM, pH 7,4, contendo leupeptina (10 ug/mL), inibidor de tripsina (0,15 mg/ml), PMSF (1 mM), pepstatina (2 mg/mL), aproptina (1 mg/mL) e quimostatina (2,5 mg/mL) e em seguida submetidas a sonicação. O número de pulsos estabelecido para a sonicação foi de 10 pulsos de 15 segundos, com intervalos de 1 minuto entre os pulsos. O rompimento das células foi acompanhado por microscopia óptica. Para medida de atividade enzimática, o extrato total das células lisadas passou por um processo de enriquecimento em membranas que consistiu de duas centrifugações diferenciais: a primeira à 750 g e a segunda à 5000 g (Zingales et al., 1979). O precipitado correspondente a essa segunda centrifugação foi então usado para todos os experimentos.

Todas as amostras referidas anteriormente foram rompidas por sonicação no mesmo tampão descrito anteriormente e conservadas em nitrogênio líquido até o momento de seu uso.

3.3. Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas de todas as amostras apresentadas nesse trabalho foi determinada de acordo com o método de Lowry *et al* (1951). Foi utilizada albumina sérica bovina como padrão.

3.4. Medidas de hidrólise de nucleotídeos

As medidas de atividade para os diversos nucleotídeos foram executadas em meio padrão de reação contendo: MOPS 50 mM, pH 7,4, EDTA 5 mM, Mg^{2+} livre 300 μ M, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, ouabaina 1 mM, NaN_3 10 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, 0,5 mg de proteína /mL e NTP ou NDP 1,0 mM para um volume total de 250 μ l de reação. A reação foi iniciada pela adição de nucleotídeos, incubada por 1 hora a 37 °C e interrompida pela adição de igual volume de ácido tricloroacético 28 %. O volume total foi então centrifugado por 30 minutos em 14.000 g numa microcentrífuga (Eppendorf) e o sobrenadante usado para medir a quantidade de Pi liberado. O Pi liberado foi determinado espectrofotometricamente de acordo com o método de Fisk e Subbarow (1925), modificado pelo $FeSO_4$ como agente redutor. A concentração de $MgCl_2$ necessária para se obter magnésio iônico livre na concentração desejada (300 μ M), foi calculada para ATP e então extrapolada para os outros nucleotídeos. Esse cálculo foi feito por um programa de computador iterativo que leva em consideração as constantes de ligação de ATP e EDTA a Ca^{2+} e Mg^{2+} , em pH 7,4 (Sorenson et al., 1986).

3.5. Efeito do pH sobre as Atividades ATPásica e p-nitrofenilfosfatásica

Amostras de homogenado de *T. cruzi* foram incubadas por 1 hora a 37 °C em meio de reação contendo ATP 2 mM ou p-NPP 2 mM, $MgCl_2$ 2 mM, 0,5 mg/mL de proteína mais tampão MOPS 50 mM contendo os inibidores NaN_3 10 mM, ouabaina 1 mM. Ortovanadato de sódio 1 mM foi acrescentado somente quando ATP foi usado como substrato. A reação foi parada pela adição de 250 μ l de NaOH 1 N. O p-nitrofenol liberado foi determinado espectrofotometricamente em 410 nm usando um coeficiente de

extinção de $14,3 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os valores de pH foram ajustados entre 6,5 e 8,5 com HCl ou MOPS.

Um outro experimento nas mesmas condições descritas anteriormente foi feito com p-nitrofenilfosfato (p-NPP), exceto que agora havia ortovanadato de sódio 1 mM no meio de reação. Nestas condições não houve atividade p-nitrofenilfosfatásica.

3.6. Eletroforese em gel não desnaturante

Os experimentos em gel nativo foram executados como descrito por Laemmli (1970), usando gel de poliacrilamida 6 % e Triton X-100 0,1 % (v/v) mais Deoxicolato de sódio 0,1 % (m/v) em substituição ao Dodecil Sulfato de Sódio no gel e no tampão de corrida. Aliquotas de 50-100 μg de proteínas das amostras em questão foram solubilizadas em tampão de amostra contendo Tris 0,5 mM, pH 6,8, Triton X-100 0,6 %, Deoxicolato de sódio 0,1 %, glicerol 30 % e submetidas a eletroforese a 4 ° C. O tempo de corrida foi estabelecido em 1:30 h a 300 volts, logo após o tampão de amostra, contendo azul de bromofenol como corante, ter saído do gel.

O gel de separação continham 0,375 M Tris-Cl pH 8,8, Acrilamida-Bis (30:0,8) 6,0 %, Triton X-100 0,1 %, Deoxicolato de sódio 0,1 %, Persulfato de amônio 0,05 % e Temed 0,05 %. O gel de concentração continha Tris-Cl 0,125 M pH 6,8, Acrilamida-Bis (30:0,8) 4,0 %, Triton X-100 0,1 %, Deoxicolato de sódio 0,1 %, Persulfato de amônio 0,05 % e Temed 0,1 %.

O tampão de revelação nos experimentos envolvendo gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes continha Hepes 25,0 mM, pH 7,4, MgCl_2 2,0 mM, ATP ou ADP 2,0 mM e $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 2,0 mM.

Após a corrida, o gel foi lavado por 30 minutos em tampão contendo apenas Hepes 25,0 mM, pH 7,5, e $MgCl_2$ 2,0 mM, para retirada do tampão de corrida eletroforético. Em seguida foram cortadas duas tiras do gel (o restante do gel permaneceu imerso no tampão para ser cortado na altura da banda de atividade) e depositadas em placa de petri mais tampão de revelação fresco. Estas tiras foram incubadas a 30 °C por 4-8 horas e a reação parada lavando-se o gel com água destilada. Logo após, o gel foi imerso numa solução a 1 % de sulfeto de amônio e fotografado. A banda de atividade formada por um precipitado branco de fosfato de chumbo torna-se escura, logo mais nítida, quando esse gel é imerso numa solução a 1,0 % de sulfeto de amônio. O sulfeto reage com o chumbo do precipitado, tornando a banda escura. Esse gel pode ser conservado por alguns meses, se a solução de sulfeto de amônio for substituída por ácido acético a 3 % e guardado a 4 °C.

O restante do gel que permaneceu imerso em tampão, foi cortado na altura da banda correspondente à atividade ATPásica e eletroeluída em um *Gel Eluter* (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA) por 6-12 horas a 50 V em 300 μ l de tampão de Laemmli [Tris 0,1 M, pH 8,3, glicina 0,768 M e mais SDS 0,4 %, (4x e 1x)] de acordo com as instruções no manual do aparelho. As amostras foram reunidas e concentradas numa única coluna de filtração (Ultrafree-4 Centrifugal Filter Unit, Millipore) por centrifugação em 7500 g por 30 minutos. Em seguida foram ressuspendidas em tampão de amostra para SDS-PAGE e fervidas por três minutos antes de serem submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 8 % mais SDS 0,1 %.

Uma outra maneira de se detectar bandas de atividade em gel não desnaturante é através de um meio de reação contendo alta concentração de cálcio. Este forma um

complexo insolúvel, de cor branca, com o fosfato liberado da hidrólise do ATP pela enzima, precipitando-se sobre a enzima no gel. No entanto, devido à presença de cálcio em altas concentrações, esse método poderá não apresentar resultado, se a enzima em estudo for sensível a tais concentrações de cálcio.

Aqui, esse método foi utilizado apenas como controle positivo dos resultados obtidos pelo primeiro método. É que no primeiro método o tampão de revelação não continha os inibidores de ATPases, já mencionados ao longo desse trabalho. O nitrato de chumbo, presente nesse tampão, precipita-se muito facilmente com o ortovanadato de sódio, já que esse é um análogo do fosfato. A solubilidade desse reagente, nas concentrações usadas, mostrou-se muito sensível à faixa de pH (7,0 a 7,5) usada nos experimentos. Na presença de ADP, o nitrato de chumbo também mostrou-se sensível à formação de precipitados, o mesmo não sendo observado em relação ao ATP. Diante de tais problemas na utilização desse reagente, optou-se por utilizar o nitrato de chumbo apenas com o tampão Hepes contendo $MgCl_2$ mais ATP ou ADP. Como a atividade ATPásica, mesmo sendo afetada pela alta concentração de cálcio, ainda assim mostrava uma banda de atividade visível e porque nesse meio foi possível usar um tampão de revelação contendo todos os inibidores descritos para as atividades medidas em tubo de ensaio, esse método foi utilizado para se ter um controle positivo sobre a atividade enzimática em questão. Tiras diferentes, cortadas do mesmo gel, eram colocadas nos dois tampões de revelação e então comparado o padrão das bandas de atividade quanto à sua altura no gel.

3.7. Dependência de concentração para Ca^{2+} e Mg^{2+}

Foram realizadas curvas de dependência de concentração para cálcio na presença de magnésio contaminante ou na presença de Mg^{2+} livre na faixa de 3-29 μM ou 2,7 a 4,7 mM. EGTA 5,0 mM foi adicionado ao meio de reação como agente quelante. As quantidades de MgCl_2 e CaCl_2 necessárias para dar as concentrações desejadas de Ca^{2+} livre (10^{-9} a $10^{-2,5}$) foram calculadas por um programa iterativo que leva em consideração as constantes de ligação de ATP e EGTA a Mg^{2+} e Ca^{2+} , em pH 7,4 (Sorenson et al., 1986). EDTA foi usado no lugar de EGTA quando foram testadas concentrações variadas de Mg^{2+} livre sem adição de cálcio, sendo também usado o mesmo programa de computador, agora levando em consideração as constantes de ligação para EDTA.

As medidas de atividade enzimática desses experimentos foram executadas em meio padrão de reação contendo MOPS 50 mM, pH 7,4, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, ouabaína 1 mM, NaN_3 10 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, 0,5 mg de proteína /mL e ATP 1,0 mM para um volume total de 250 μl de reação. A reação era iniciada pela adição do nucleotídeo, incubada por 1 hora a 37 °C e interrompida pela adição de igual volume de ácido tricloroacético 28 %. O volume total foi então centrifugado por 30 minutos em 14.000 g, numa microcentrífuga (Eppendorf) e o sobrenadante utilizado para medir a quantidade de Pi liberado. O Pi liberado foi determinado espectrofotometricamente de acordo com o método de Fisk e Subbarow (1925), modificado pelo uso de FeSO_4 como agente redutor.

3.8. Reatividade cruzada entre a apirase de *T. cruzi* e soros anti-apirase de batata e anti-NTPase de *Toxoplasma gondii*

Para verificar se ocorriam reações cruzadas entre a ATP-difosfohidrolase de *T. cruzi* e soros imunes contra apirase de outros organismos, “immuno blotting” foi realizado com um soro policlonal contra uma proteína de fusão obtida da tradução do cDNA da NTPase de *T. gondii* fundida à glutatona S-transferase (Bermudes et al., 1994) e com um soro policlonal anti-apirase nativa de batata cv Desirée.

Amostras de homogenato enriquecido de membrana plasmática (100 µg) de *T. cruzi* ou as amostras eletroeluídas do gel não desnaturante foram aplicadas paralelamente em gel de poliacrilamida 8,0 % com SDS 0,1 %, segundo o método descrito por Laemmli (1970) e submetidas a eletroforese. Esta foi realizada à temperatura ambiente em 150 volts, até o corante chegar ao final do gel. Foram corridos em paralelo 10 µl de mistura de padrões de massa molecular pré-corados que continham as seguintes proteínas: miosina (cadeia H, 200.000), fosforilase B (97.400), albumina de soro bovino (68.000), ovoalbumina (43.000), anidrase carbônica (29.000), β-lactoglobulina (18.400) e lisozima (14.300).

As proteínas das amostras referidas acima, separadas por eletroforese, foram coradas com Coomassie Blue ou transferidas para membrana de nitrocelulose com poros de 0,45 µm (Amersham). Para transferência empregou-se uma câmara de eletrotransferência (Mini trans-blot cell, BioRad). O gel foi colocado sobre a membrana de nitrocelulose (Hybond-C Amersham), mergulhados em tampão de transferência (Tris 0,25 M, pH 8,3, glicina 0,129 M e metanol 20 %) e colocados entre duas folhas de papel de filtro também embebidas no mesmo tampão. O conjunto foi colocado entre duas

esponjas de 3,0 mm de espessura e protegido entre duas grades. Em seguida, o conjunto preso entre as duas grades foi encaixado na câmara de eletrotransferência contendo tampão de transferência previamente resfriado. A câmara foi mantida a 4 ° C durante todo o procedimento para evitar superaquecimento do sistema. Nessas condições, a voltagem foi regulada para 100,0 volts durante 1,0 hora, resultando numa corrente de 250 a 900 mA. Ao final da eletrotransferência a membrana foi retirada da câmara, cortada em tiras correspondentes às amostras aplicadas e incubada sob leve agitação com solução bloqueadora [pH 8.0, TN 10x conc. (24,22 g Tris-Cl pH 8.0, 175,35 g NaCl, H₂O q.s.p. 2 L), 100 mL; azida 0,5 g, leite desnatado 50 g e H₂O q.s.p. 1 L] por 1 hora a temperatura ambiente. Após 1 hora, as tiras foram isoladas umas das outras e incubadas por toda noite à temperatura ambiente em um forno de hibridização (Hybridiser HB-1D da Techne), com soro imune policlonal contendo anticorpos anti-apirase desnaturada de *S. tuberosum* cv Desirée (diluição 1:3000) ou soro imune policlonal contendo anticorpos anti-NTPase de *T. gondii* (diluição 1:3000) num volume de 10 mL de uma solução de composição igual à solução bloqueadora. Após este período de incubação, as tiras de nitrocelulose foram lavadas com TNT (TN 10x, 200 mL; Tween 20, 1,0 ml e H₂O q.s.p. 2 L) em três etapas de 10 minutos, sob leve agitação e novamente incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente em 10 mL de solução bloqueadora contendo o segundo anticorpo “anti-imunoglobulina de coelho” acoplado a peroxidase de raiz forte (diluição 1:2000). Ao término desta incubação, as membranas foram lavadas como já descrito acima, sendo que a última etapa não continha Tween 20. A revelação foi feita por quimiluminescência, com o anticorpo secundário acoplado a peroxidase de raiz forte e Luminol como substrato, usando o kit ECL (Amersham) e expondo em filme de raio-X.

3.9. Dependência da concentração de substrato

A atividade ATPásica foi determinada medindo-se a hidrólise de [γ - 32]-ATP (10^4 cpm/nmol ATP) em meio padrão de reação descrito anteriormente, contendo tampão MOPS 50 mM, pH 7,4, EDTA 5 mM, Mg^{2+} livre 300 μ M, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, ouabaína 1 mM, NaN_3 10 mM, ortovanadato de sódio 1 mM e 0,5 mg de proteína /mL para um volume de 500 μ l de reação. O experimento foi iniciado pela adição do substrato nas diferentes concentrações (10 μ M a 5000 μ M) e parado pela adição de 500 μ l de uma mistura contendo HCl : Carvão ativado 1:1. O material foi centrifugado por 30 minutos em microcentrífuga Eppendorf a 14.000x g. Uma alíquota de 300 μ l do sobrenadante foi levada ao contador de cintilação em frascos contendo 4 mL de líquido de cintilação miscível com amostra aquosa.

3.10. Imunoprecipitação com anticorpos anti-NTPase de *T. gondii* e anti-apirase de batata.

Amostras de formas metacíclicas de *T. cruzi* (10^9 células), obtidas como descrito, foram lavadas com PBS, recuperadas por centrifugação em 7500 rpm, ressuscitadas em 5 mL de DME sem metionina, mais 5 % de soro fetal e incubadas a 28 °C por 30 minutos. Em seguida adicionou-se 50 μ Ci de 35 S-metionina e incubou-se por mais três horas. Ao final deste tempo a amostra foi centrifugada novamente a 7500 rpm por 13 minutos e lavada uma vez com PBS. Os parasitas foram ressuscitados em 500 μ l de tampão de lise (tampão Tris-Cl 5 mM, pH 7,4 contendo os inibidores de proteases descritos em materiais e métodos e o detergente não iônico NP40 2%) e mantido a 4 °C por cinco minutos. O lisado foi centrifugado em microcentrífuga (Eppendorf) por 3

minutos a 4 ° C e o sobrenadante utilizado para o experimento de imunoprecipitação, seguindo basicamente o protocolo descrito por Kessler, 1975.

Tubos contendo Sepharose-proteína-A, previamente lavada com PBS, foram incubados com 230 µl do sobrenadante do lisado de *T. cruzi* e 5 µl de soro anti-NTPase de Toxoplasma (título 1:2000) ou 5µl do soro anti-apirase de batata (título 1:10.000). Ambos os tubos foram incubados durante uma noite sob leve agitação a 4 ° C. Após incubação, as amostras foram centrifugadas e os precipitados guardados para serem utilizadas posteriormente. Os sobrenadantes de cada tubo foram transferidos para os tubos contendo Sepharose-proteína-A e 5 µl de um soro policlonal de camundogo imunizado com extrato total de *T. cruzi*. Essas amostras foram incubadas sob leve agitação por 2 horas à temperatura ambiente e centrifugadas. Os precipitado dos tubos foram então lavados por três vezes com 1 mL de Kessler 0,05% e uma vez com 500 µl de Kessler + SDS (50µl de SDS 20 % + 10 mL de Kessler 0,05 %). Em seguida foram lavadas 2 vezes com PBS para retirar o excesso de albumina e ressuspendidas em tampão de amostra para SDS-PAGE. As amostras foram fervidas por 3 minutos, centrifugadas em microcentrífuga (Eppendorf) e os sobrenadantes aplicados no gel.

3.10.1. SDS/PAGE referente a imunoprecipitação

Amostra do homogenado total de *T. cruzi* marcado com ³⁵S-metionina (2 µl do sobrenadante do lisado referido acima) mais as amostras correspondentes aos imunoprecipitados, foram aplicadas em gel de poliacrilamida 8,0 % mais SDS 0,1 % segundo o método descrito por Laemmli (50), e submetidas à eletroforese a 150 volts à temperatura ambiente até a saída do corante.

Foram utilizados como padrões de massa molecular pré-corados 30 μ l da mistura que continha as seguintes proteínas: MBP¹- β -galactosidase de *E. coli* (175 000), MBP-paramiosina¹ de *E. coli* (83 000), glutamato desidrogenase de fígado bovino (62 000), aldolase de músculo de coelho (47 500), triosefosfato isomerase de músculo de coelho (32 500), β -lactoglobulina A de leite bovino (25 000), lisozima de clara de ovo de galinha (16 500) e aprotinina de pulmão bovino (6 500). ¹MBP = proteína que liga maltose. MBP- β -galactosidase = fusão de MBP e β -galactosidase. ¹MBP-paramiosina = fusão de MBP e paramiosina.

O gel contendo as proteínas das amostras referidas acima foi corado com Coomassie Blue e colocado para secar a 60 ° C. Depois de seco o gel foi exposto em filme de raio-X a -70 ° C.

3.11. Análise comparativa da atividade ATPásica, em diversos estágios da cepa Y e do clone CL-14 de *T. cruzi*.

A obtenção das amostras dos diversos estágios de Y e CL-14 de *T. cruzi*, assim como os demais procedimentos, estão descritos em materias e métodos.

As medidas de atividade enzimática para as diversas amostras, foram realizadas em meio padrão de reação contendo tampão MOPS 50 mM, pH 7,4, EDTA 5 mM, Mg²⁺ livre 300 μ M, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, ouabaína 1 mM, NaN₃ 10 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, 0,5 mg de proteína /mL e ATP 1,0 mM para um volume total de 250 μ l de reação. A reação foi iniciada pela adição do substrato, incubada por 1 hora a 37 °C e interrompida pela adição de igual volume de ácido tricloroacético 28 %. O volume total foi então centrifugado por 30 minutos em 14.000x g numa microcentrífuga (Eppendorf) e

o sobrenadante usado para quantificar o Pi liberado. O Pi liberado foi determinado espectrofotometricamente de acordo com o método de Fisk e Subbarow (Fisk & Subbarow, 1925). A concentração de MgCl₂ necessária para obter-se magnésio iônico livre na concentração desejada (300 μM), foi calculada para um meio contendo ATP 1,0 mM. Esse cálculo foi feito por um programa de computador iterativo que leva em consideração as constantes de ligação de ATP (ou ADP) e EDTA a Ca²⁺ e Mg²⁺, em pH 7,4 (Sorenson et al., 1986).

3.12. Determinação da Atividade ATPásica no Parasita Íntegro.

Parasitas ~ 9,5 x 10⁸ de *T. cruzi* epimastigotas CL 14 foram obtidos de meio de cultura. O número de parasitas viáveis usados para realizar esse experimento foi de 10⁸ células, que corresponde a 0,64 mg/mL de proteína. Esse experimento foi realizado em meio de reação contendo tampão Hepes 20 mM, pH 7,4, ouabaína 1 mM, NaN₃ 10 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, NaCl 0,9 %, KCl 5 mM, EDTA 5 mM, Mg²⁺ livre 3 μM, 0,5 mg de proteína /mL e ATP 1,0 mM para um volume total de 250 μl de reação. A reação foi iniciada pela adição do substrato, incubada por 1 hora a 37 °C e após esse tempo, os tubos foram colocados em gelo. O volume total foi imediatamente centrifugado por 30 minutos à 14.000x g numa centrífuga Eppendorf e o sobrenadante usado para quantificar o Pi liberado. O Pi liberado foi determinado espectrofotometricamente de acordo com o método de Fisk e Subbarow (Fisk & Subbarow, 1925). A concentração de MgCl₂ necessária para se obter magnésio iônico livre na concentração desejada (3 μM) foi calculada para um meio contendo ATP 1,0 mM. Esse cálculo foi feito por um

programa de computador iterativo que leva em consideração as constantes de ligação de ATP e EDTA a Ca^{2+} e Mg^{2+} , em pH 7,4 (Sorenson et al., 1986).

3.13. Determinação da quantidade de proteínas por número de parasitas

Esse experimento foi realizado em epimastigotas de *T. cruzi*, obtida como descrito em materiais e métodos. Cinco diferentes pontos em volume de uma amostra contendo $3,12 \times 10^7$ células/mL foram ensaiados contra um padrão de albumina sérica bovina através do método de Lowry et al., (1951). Inferindo os valores de absorvância destes pontos com os valores da curva padrão de albumina, obteve-se um valor de 0,64 mg/mL de proteínas para 10^8 parasitas intactos.

3.14. Imunofluorescência indireta por microscopia de imunofluorescência

Amostras de tripomastigotas, epimastigotas e amastigotas extracelulares de *T. cruzi* foram preparadas para imunofluorescência indireta. Essas amostras foram fixadas com formaldeído 4 % em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 por 1 hora a temperatura ambiente. As células fixadas foram lavadas em tampão salina-fosfato por 3x, colocadas para aderir em lâminulas redondas, previamente tratadas com poli-l-lisina, por 10 minutos, lavadas 1x com PBS-albumina 1 % e incubadas com cloreto de amônio 50 mM por 30 minutos para bloquear grupamentos aldeídicos livres. Em seguida foram lavadas 2x novamente com PBS-albumina 1 % e incubadas por uma hora à temperatura ambiente com antisoro policlonal contra a NTPase de *T. gondii* (diluição 1:100). Após incubação lavaram-se as amostras com PBS-albumina 1 % 2x e fez-se uma nova incubação à temperatura ambiente por uma hora com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com

tetrametilrodamina isotiocianato (TRITC) (Sigma, T5268). As amostras foram lavadas 2x novamente com PBS-albumina 1 % e montadas em lâminas histológicas com n-propilgalato (agente anti-“fading”). O controle foi feito com preparações das mesmas amostras, incubando-as por uma hora com TRITC-anti-IgG de coelho, lavadas 2x com PBS-albumina 1 % e montadas com n-propilgalato. O material foi observado em um microscópio confocal a laser (CLSM 410-Zeiss), usando comprimento de onda para excitação de 543 nm e filtro de barreira LP570. As fotos foram feitas com filme Kodak ASA 100 utilizando o monitor de tela plana acoplado ao microscópio confocal. As observações foram feitas pela Dra. Técia M. U. de Carvalho (Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Universidade Estadual do Norte Fluminense, RJ, Brasil).

4. Resultados

4.1. Especificidade enzimática

A presença de atividade fosfohidrolítica foi ensaiada em amostras de homogenado enriquecido de membrana plasmática de *T. cruzi*, usando-se diferentes nucleotídeos como substrato. A tabela I mostra que esse homogenado contém uma atividade hidrolítica bastante efetiva na degradação de ATP quando relacionada aos outros nucleotídeos. Os outros nucleotídeos foram também degradados pela enzima do *T. cruzi*, embora em menor velocidade, mas ainda assim revelando uma ampla especificidade.

Tabela I

Especificidade da ATP-difosfohidrolase por Substratos

Substratos	Atividade (nmol Pi liberado.mg ⁻¹ .h ⁻¹)
ATP	700,0
ADP	160,8
GTP	250,2
GDP	60,0
UTP	150,0
UDP	111,6
CTP	122,4
CDP	46,8
dATP	154,2
TPP	26,4
TMP	0,0
AMP	0,0

Tabela I - A atividade ATP-difosfohidrolásica foi medida em um meio contendo os nucleotídeos citados acima (1 mM), MOPS 50 mM, pH 7.4, EDTA 5 mM, Mg²⁺ livre 300 μM, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, ouabaína 1 mM, NaN₃ 10 mM, ortovanadato de sódio 1 mM e 0,5 mg de proteína /mL. A reação foi iniciada pela adição de nucleotídeos e incubada por 1 hora a 37 °C. A quantidade de MgCl₂ necessária para obter-se a concentração de Mg²⁺ livre desejada foi calculada para ATP, como descrito em materiais e métodos, e extrapolada para os demais nucleotídeos.

TPP- tiamina pirofosfato, TMP- tiamina monofosfato, ambos derivados da vitamina B 12.

4.2. Exclusão de associações enzimáticas

4.2.1. Atividade ATPásica

Para descartar a participação de ATPases transportadoras de íons do *T. cruzi* na hidrólise de ATP, o meio padrão de reação continha sempre os inibidores Na_3N (azida 10 mM), ouabaína 1mM e vanadato de sódio 1 mM, que são inibidores de $\text{F}_0\text{-F}_1\text{-ATPases}$, $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ e ATPases de transporte tipo-P (Ca^{2+} e $\text{H}^+\text{-ATPases}$), respectivamente.

4.2.2. Atividade fosfatásica

Para descartar a possibilidade da hidrólise do ATP estar sendo devida à atividade fosfatásica, o efeito do pH sobre as duas atividades foi examinado com mais detalhes. Como mostra a figura 1, na faixa de pH entre 6,5 e 8,5, enquanto a atividade fosfatásica diminuiu, a atividade ATPásica aumentou. Para confirmar que a hidrólise do ATP não era devida a atividade fosfatásica, fez-se um ensaio de atividade enzimática na presença de ortovanadato de sódio. Vanadato inibiu completamente a atividade fosfatásica (resultado não mostrado), não observando-se nenhum efeito sobre a atividade ATPásica.

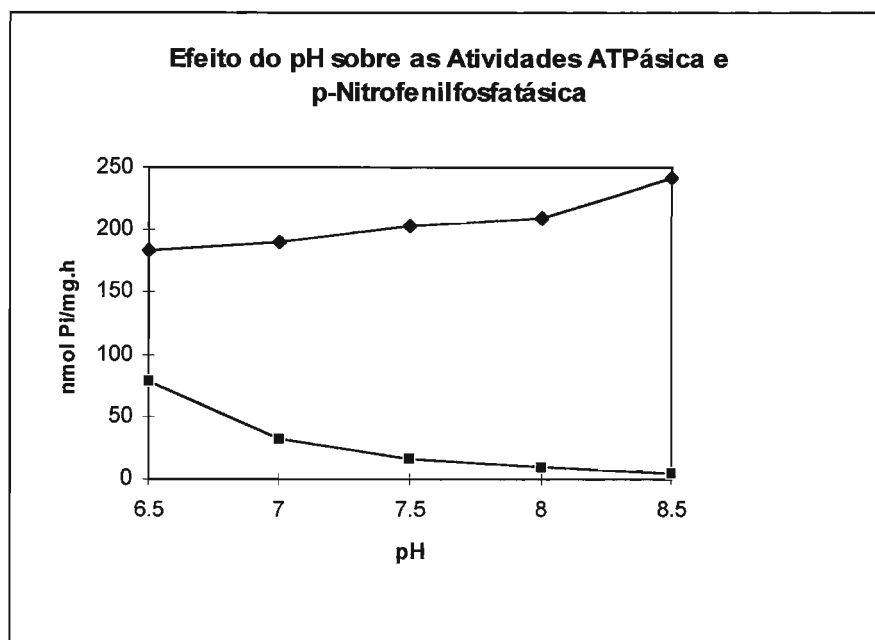


Fig. 1. Efeito do pH sobre as atividades ATPásica e p-nitrofenilfosfatásica de homogenado enriquecido de membrana plasmática de *T. cruzi*. Amostras foram incubadas por 1 hora a 37 ° C em meio de reação contendo ATP 2 mM ou p-NPP, MgCl₂ 2 mM, 0,5 mg/mL de proteína e tampão MOPS 50 mM mais os inibidores: NaN₃ 10 mM, ouabaína 1 mM e ortovanadato de sódio 1 mM somente quando ATP foi usado. Os valores de pH foram ajustados entre 6,5 e 8,5 com HCl ou MOPS. Atividade ATPásica (◆); Atividade p-nitrofenilfosfatásica (■). Esses são resultados representativos de duas determinações com diferentes amostras de células.

4.3.1. Eletroforese em gel não desnaturante

Evidência adicional confirmando que uma única enzima degrada ATP e ADP foi obtida por eletroforese de amostras de homogenato de *T. cruzi* em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes e posterior localização da atividade fosfohidrolásica no gel (Figura 2). Após a corrida eletroforética, o gel foi incubado em meio de reação contendo tampão Hepes 25,0 mM, pH 7,5, Ap₅A 100 µM final, MgCl₂ 2,0 mM, ATP ou ADP 2,0 mM e Pb(NO₃)₂. A reação foi parada após algumas horas, lavando-se o gel com água destilada. A banda de atividade formada por um precipitado branco de fosfato de chumbo tornou-se mais nítida quando esse gel foi imerso numa solução de sulfeto de amônio 1,0 %. Revelada tanto com ATP como com ADP, a banda com atividade possui a mesma mobilidade eletroforética.

4.2.3. Atividade ADPásica

Um aspecto importante, seria verificar se não havia a participação de uma possível adenilato quinase presente no sistema em estudo. A atividade adenilato quinásica utilizaria 2 moles de ADP para gerar um mol de ATP e um mol de AMP e uma posterior hidrólise do ATP por uma ATPase de *T. cruzi* produziria o Pi medido. Foi adicionado um potente inibidor da adenilato quinase, o Ap₅A ou p¹p⁵-Di (adenosina) 5' pentafosfato (Melnick et al., 1979) na concentração final de 100 µM. Mesmo na presença desse inibidor houve hidrólise tanto de ATP como de ADP. Esse resultado foi mostrado através do experimento em gel não desnaturante, que continha o inibidor Ap₅A no tampão de revelação (Figura 2).

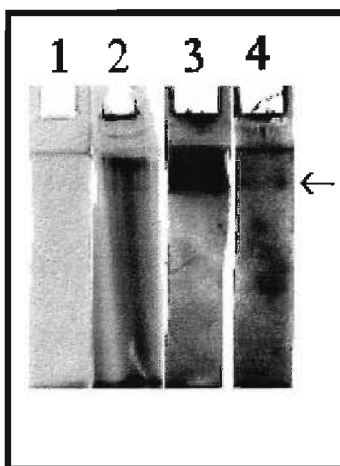


Fig. 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes. Amostras de homogenado de *T. cruzi* (100 μ g) enriquecidas em membranas foram aplicadas no gel, poços 2-4, e submetidas à eletroforese na presença de Triton-X-100 0,1 % e deoxicolato de sódio 0,1 %. O gel foi cortado em tiras, e as tiras 3 e 4 imersas em meio de reação contendo tampão Hepes 2 mM, A_p_5A 100 μ M, $MgCl_2$ 2 mM, pH 7,4, $Pb(NO_3)_2$ 2 mM, ATP ou ADP 2 mM e incubado a 37 °C. Após 4-8 horas de incubação o gel apresentou uma banda branca formada pelo precipitado de fosfato de chumbo. Esse foi lavado com água e imerso numa solução 1,0 % de sulfeto de amônio. Em seguida, essa solução foi substituída por ácido acético e as tiras fotografadas. Poços 1 e 2, gel corado com Coomassie Blue sendo que em (1) há apenas o tampão de corrida. Poços 3 e 4 correspondem às atividades ATPásica e ADPásica respectivamente. A banda correspondente à atividade está indicada por uma seta. Sob as condições usadas, uma pequena quantidade de proteína não entrou no gel de corrida e pode ser observada banda de precipitado no gel de concentração.

4.4. Curvas de atividade em função da concentração de Ca^{2+} e Mg^{2+}

O meio de reação padrão utilizado para todos os experimentos continha tampão MOPS 50 mM, pH 7,4, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, ouabaína 1 mM, NaN_3 10 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, 0,5 mg de proteína /mL e ATP ou ADP 0,5 mM para um volume total de 250 μL de reação. Para melhor caracterizarmos a dependência de íons divalentes, curvas para cálcio e magnésio foram feitas (Figuras 3 e 4).

Na presença de magnésio contaminante, a enzima foi ativada por cálcio numa faixa entre 1 a 3000 μM (Figura 3A). Na presença de 3 a 29 μM de Mg^{2+} livre, a hidrólise de ATP não foi estimulada quando a concentração de cálcio variou de 0,001 a 3000 μM (Figura 3B). Na presença de 2,7 a 4,2 mM de magnésio, a hidrólise de ATP novamente não foi estimulada pela adição crescente de cálcio na faixa de 0,001 a 3000 μM (Figura 3C), no entanto, a atividade aqui foi maior que as mencionadas anteriormente. Na presença de cálcio contaminante a hidrólise de ATP foi estimulada por magnésio em concentrações micromolares (Figura 4), sendo a atividade máxima (700 $\text{nmol Pi}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) bem superior à atividade máxima medida na presença de cálcio livre e magnésio contaminante (140 $\text{nmol Pi}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$).

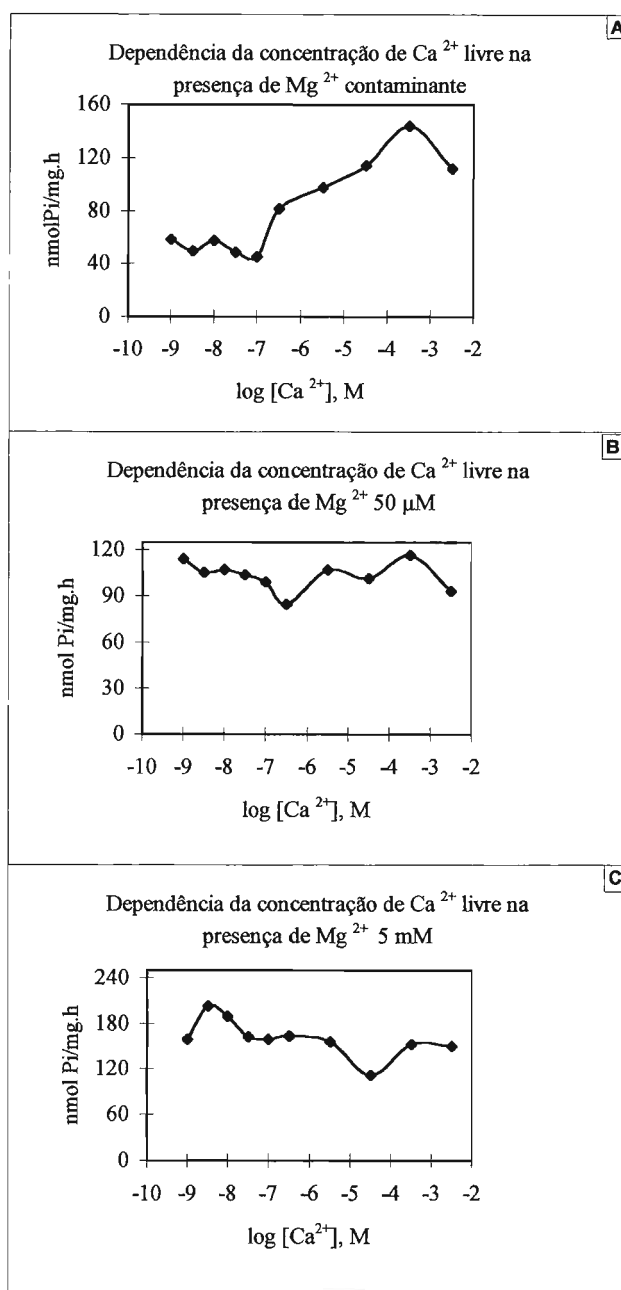


Fig. 3 - Dependência da concentração de Ca^{2+} livre na presença de Mg^{2+} contaminante (A), na presença de Mg^{2+} livre na faixa de 3-29 μM (B) e na presença de Mg^{2+} livre na faixa de 2,7 a 4,2 mM. O homogenizado de *T. cruzi* enriquecido em membranas (0,5 mg/mL) foi incubado em meio de reação contendo Mops 50 mM, pH 7,4, ouabaina 1 mM, azida sódica 10 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, EGTA 5,0 mM e diferentes concentrações de CaCl_2 para fornecer as concentrações de cálcio iônico livre na faixa de 1 nM a 3 mM como indicado na figura, além de MgCl_2 (B) e (C) suficiente para fornecer as concentrações de Mg^{2+} livre indicada acima. A reação foi iniciada pela adição de 1,0 mM de ATP, seguida de incubação por 1,0 hora a 37 °C, e foi interrompida pela adição de 1 volume de ácido tricloroacético 28 %. O Pi liberado foi medido de acordo com Fisk & Subarrow (48).

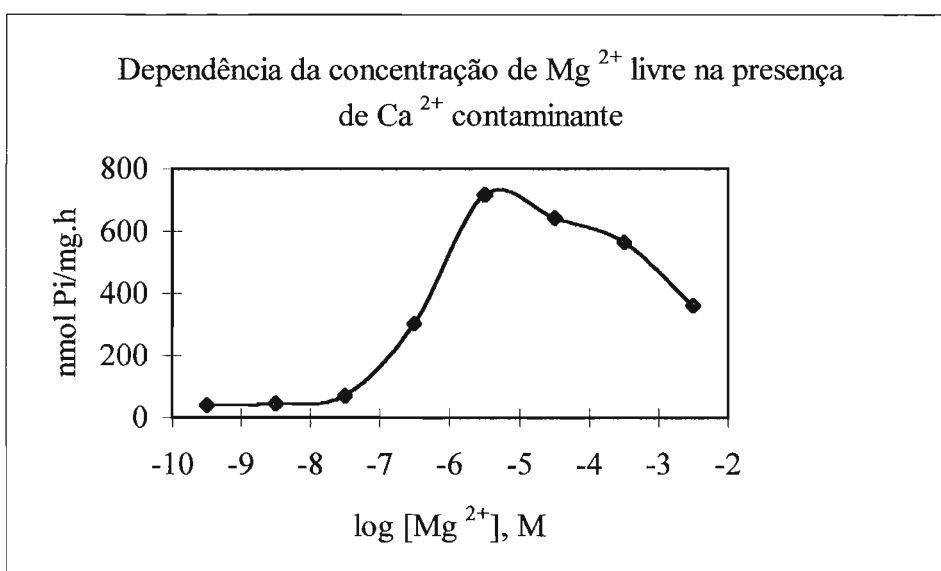


Fig. 4 - Dependência da concentração de Mg^{2+} livre na ausência de Ca^{2+} . Homogenizado de *T. cruzi* enriquecido em membranas (0,5 mg/mL) foi incubado em meio de reação contendo tampão Mops 50 mM, pH 7,4, ouabaína 1 mM, azida sódica 10 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, EDTA 5 mM e diferentes concentrações de $MgCl_2$ para fornecer as concentrações de magnésio iônico livre na faixa de 3 nM a 3 mM como indicado na figura. A reação foi iniciada pela adição de 1 mM de ATP (□), seguida de incubação por 1,0 hora a 37 °C, e foi interrompida pela adição de 250 µl de ácido tricloro acético 28 % em um volume final de 500 µl. O Pi liberado foi medido de acordo com Fisk & Subarrow (1925).

4.5. Curva de atividade em função da concentração de substrato

A dependência da concentração de substrato para hidrólise de ATP é mostrada na figura 5. Foi encontrada uma dependência hiperbólica da velocidade em função da concentração de ATP para os valores entre 10 μM e 300 μM , com um valor de K_m aproximadamente de 10 μM . Acima de 300 μM de ATP houve um aumento da velocidade de reação, sugerindo um segundo K_m . Para os valores de ATP entre 600 e 3000 μM houve um aumento da velocidade de reação sempre crescente até um valor em torno de 970 nmol $\text{P}_i/\text{mg.h.}$, correspondente a concentração de 3000 μM de ATP. Não foi possível fazer experimentos com concentrações mais altas de ATP. Logo, não foi possível determinar o segundo K_m dessa reação.

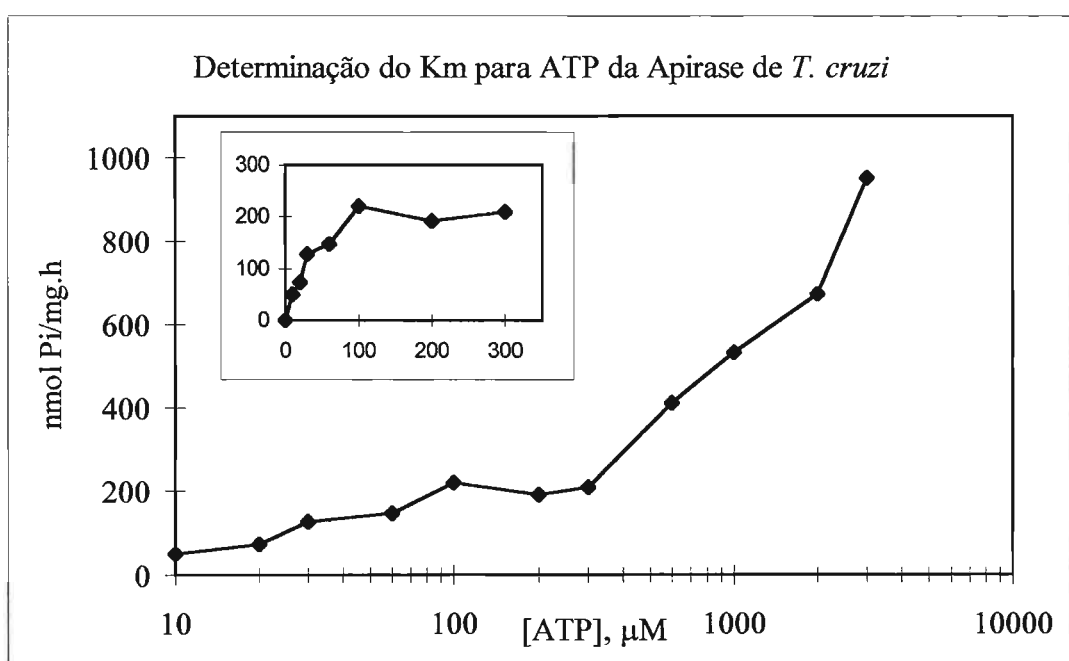


Figura 5. Determinação do K_m para ATP. As velocidades de hidrólise foram medidas usando-se diferentes concentrações de nucleotídeos (10 μM , 20 μM , 30 μM , 60 μM , 100 μM , 200 μM , 300 μM , 600 μM , 1000 μM , 2000 μM e 3000 μM), meio de reação padrão e proteína (0,05 mg/mL) a 37 °C durante 4 minutos ou 8 minutos. A medida de Pi foi feita de acordo com materiais e métodos.

4.6. Reatividade cruzada dos soros anti-NTPase de *T. gondii* e anti-apirase de batata com a ATP-difosfolidrolase do *T. cruzi*.

Uma amostra do homogenado enriquecido de membrana plasmática de *T. cruzi* (100 µg) (Figura 6, poço 2), mais a amostra extraída da banda de atividade do gel não desnaturante (poços 3-5), foram aplicadas e corridas em gel de poliacrilamida 8 % com SDS 0,1 %. Após a corrida uma parte foi corada com “Coomassie blue” e uma outra parte eletrotransferida para membranas de nitrocelulose. Estas membranas foram incubadas com soro imune (diluição 1:3000) contendo anticorpos contra uma proteína de fusão obtida da tradução do cDNA da NTPase de *T. gondii* fundida a glutathione S-transferase (Bermudes et al., 1994) ou com soro imune (diluição 1:3000) contendo anticorpos anti-apirase nativa de batata cv Desirée. A revelação foi feita por quimioluminescência com um anticorpo secundário anti-IgG de coelho (diluição 1:2000) acoplado a peroxidase de raiz forte e luminol como substrato e expondo-se em filme de raio-X. Esse experimento (Figura 6) revelou que tanto o soro anti-NTPase de *Toxoplasma* como o soro anti-apirase de batata, reagiram com a mesma banda de uma proteína obtida da amostra retirada da banda de atividade do gel não desnaturante similar àquele da Figura 1.

Os poços correspondentes à amostra excisada do gel não desnaturante mostram a mesma banda de massa molecular em torno de 57,5 kDa, sugerindo assim uma homologia entre a ATP-difosfolidrolase de *T. cruzi*, NTPase de *T. gondii* (Bermudes et al 1994) e apirase de batata.

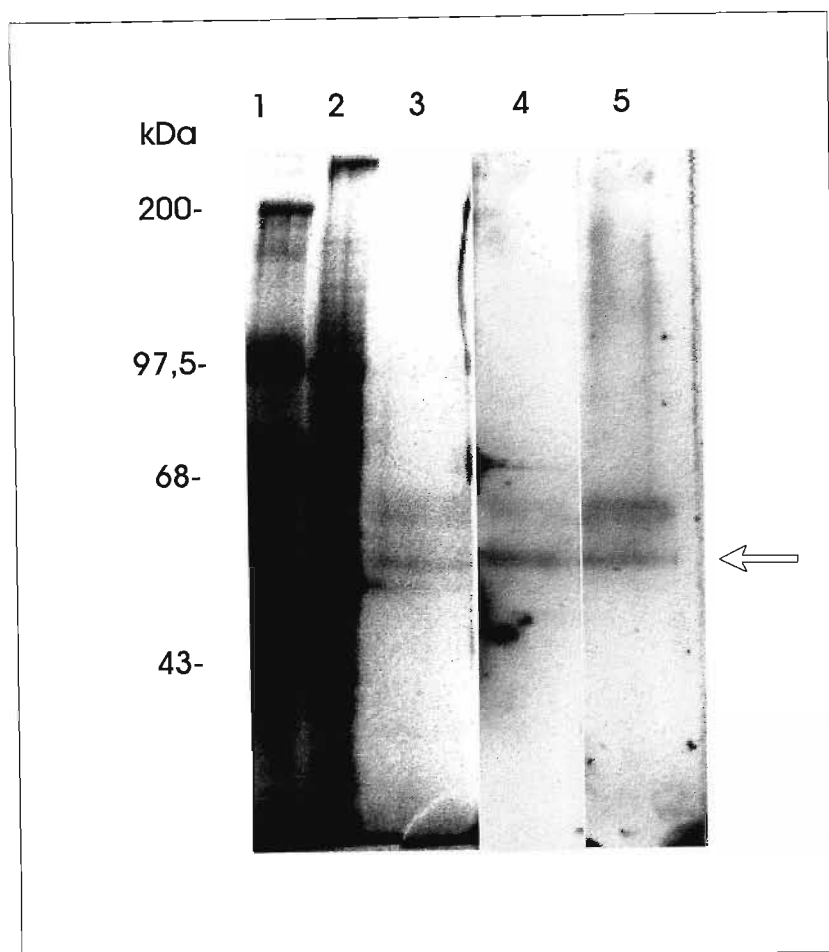


Fig. 6. Apirase de *T. cruzi* foi reconhecida pelos soros anti-NTPase de *T. gondii* e anti-apirase de batata. Gel não desnaturante similar àquele mostrado na Fig.1 foi corrido e revelado com ATP. A banda correspondente à atividade foi eletroeluída do gel e alíquotas foram submetidas a SDS-PAGE, tendo sido colocadas nos poços 3 a 5. Poço 2 contém um controle de 100 μ g de homogenado enriquecido em membranas. Poço 1 corresponde ao padrão de massa molecular. Parte do gel foi corado com "Coomassie Blue" (1 a 3) ou as proteínas foram eletrotransferidas para nitrocelulose (4,5) e reveladas com soros anti-NTPase de *T. gondii* (4) ou anti-apirase de batata variedade Desirée (5). A seta está indicando a banda que possivelmente corresponde à apirase.

4.7. Imunoprecipitação de apirase de *T. cruzi* com soros heterólogos.

O procedimento para a realização desse experimento está detalhado no item materiais e métodos.

Resumidamente, amostras de *T. cruzi* marcado com ^{35}S -metionina foram solubilizadas e incubadas com soro imune contendo anticorpos contra a proteína NTPase de *T. gondii* ou com soro imune contendo anticorpos anti-apirase de batata. Os dados obtidos nesse experimento mostraram (Figura 7) uma única banda entre as proteínas do *T. cruzi*, com massa molecular em torno de 57,5 kDa, que reagiu de maneira intensa e altamente específica, com o soro imune policlonal anti-NTPase de *T. gondii*. A mesma banda também foi reconhecida pelo soro imune policlonal anti-apirase de batata, embora com menor intensidade. Esse experimento confirma os resultados obtidos por “imuno blotting” apresentados na (Figura 6).

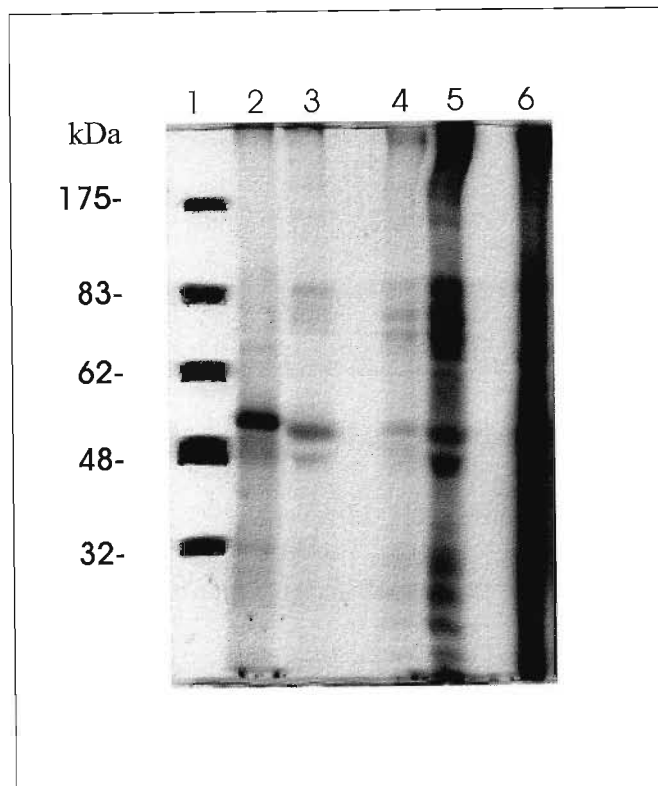


Fig. 7. Imunoprecipitação, usando-se a reatividade cruzada dos soros policlonais anti-apirase de batata e anti-NTPase de *T. gondii*, contra proteína total de *T. cruzi* marcado com ^{35}S -metionina. Extrato total de *T. cruzi*, marcado com ^{35}S -metionina, foi incubado “overnigth” com soro policlonal anti-NTPase de *T. gondii* ou anti-apirase de batata e os respectivos imunoprecipitados separados por SDS-PAGE (“lanes” 2,3). Os sobrenadantes desses imunoprecipitados, foram então incubados por 2 horas com um soro policlonal contra extrato total de *T. cruzi* e os seus imunoprecipitados também separados por SDS-PAGE (“lanes” 4,5). “Lane” 1, padrão de massa molecular, “lane 6”, extrato total marcado com ^{35}S -metionina.

4.8. Análise comparativa da atividade ATPásica de diversos estágios da cepa Y e do clone CL-14 de *T. cruzi*.

A caracterização de uma ATP-difosfohidrolase do parasita *T. cruzi*, baseada nos trabalhos de caracterização dessa mesma enzima em *S. mansoni*, tinha como princípio a hipótese de que parasitas que viviam ou tinham uma passagem transiente pela circulação sanguínea do seu hospedeiro, usaria essa enzima, entre outras formas, como uma maneira de se proteger dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra esses parasitas. Dentre tais mecanismos, o processo de agregação plaquetária, assim como a destruição do parasita por células T citotóxicas estariam envolvidos. Portanto, dever-se-ia escolher a forma do parasita que durante o seu ciclo biológico tivesse passagem pela circulação sanguínea do hospedeiro. Essa forma seria a tripomastigota. Entretanto, houve dificuldades em estudar-se essa forma. Primeiro, tal forma não pode ser obtida em meio líquido de cultura, o que dificultaria a realização do presente trabalho. A obtenção dessa forma do *T. cruzi* em cultura de células, conteria sempre um contaminante de enzimas das próprias células de cultura, o que tornaria os resultados experimentais mais difíceis de serem analisados. Devido a esses fatores foi escolhida inicialmente a forma tripomastigota metacíclico, que pode ser obtida em meio axênico e também por ser a forma infectante. No entanto, ao longo desse trabalho fez-se necessário um estudo comparativo, ainda que sumário, das diversas formas da cepa Y e do clone CL-14 do *T. cruzi*. Tais aspectos serão discutidos posteriormente.

Os resultados mostrados na Tabela III revelaram que, de um modo geral, não houve diferença de atividade entre as mesmas formas da cepa e do clone estudadas quando comparadas entre si. No entanto, o mesmo não ocorreu quando a comparação se

fez entre as formas da mesma cepa ou clone. De maneira geral, as formas, obtidas em meio axênico (epimastigotas ou tripomastigotas metacíclicos) apresentaram menor atividade do que as obtidas em cultura de tecido (tripomastigotas e amastigotas).

Atividade ATPásica de LL-CMK₂ nas mesmas condições de ensaio feita para *T. cruzi* também foi determinada. Os valores de atividade específica obtidos foram determinados para mg de proteínas /mL e não por números de células. Esses valores ficaram em torno de cinco e duas vezes menor em relação as formas amastigotas e tripomastigotas respectivamente (dados não mostrados). Note-se que esses valores correspondem a atividade por quantidade de proteína e não por número de células. Se considerarmos que o número de células LL-CMK₂ contaminante na cultura das formas amastigotas e tripomastigotas foi em torno de uma célula LL-CMK₂ por 10⁸ células de *T. cruzi*, os valores da atividade ATPásica dessas células no ensaio com *T. cruzi* seriam desprezíveis.

Medida de atividade ATPásica em diversas formas (CL-14 e Y) de *T. cruzi*

Tabela III

<i>T. cruzi</i>	Atividade nmolPi.mg ⁻¹ .h ⁻¹ .
Epi CL-14	240,0
Epi Y	232,0
Meta CL-14	266,4
Tripo CL-14	628,0
Tripo Y	632,0
Amastigota Y	1437,6

Tabela III. Os experimentos foram realizados em meio padrão de reação contendo tampão MOPS 50 mM, pH 7,4, EDTA 5 mM, Mg²⁺ livre 300 μM, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, ouabaína 1 mM, NaN₃ 10 mM, ortovanadato de sódio 1 mM e 0,5 mg/mL de proteína a partir do extrato total das células. A reação foi iniciada pela adição de ATP 1 mM e incubada por 1 hora a 37 °C.

Epi- Epimastigota

Meta- Tripomastigota metacíclico

Tripo- Tripomastigota

4.8.1. Estudo comparativo da atividade ATPásica dos diversos estágios da cepa Y e do clone CL-14 do *T. cruzi* em gel não desnaturante.

Para verificar se a diferença de atividade ATPásica, entre os diferentes estágios das duas cepas aqui estudadas, não seria devida à presença de outras fosfohidrolases, fez-se um gel não desnaturante contendo todas as formas mostradas na tabela III, além do extrato de tripomastigotas metacíclicos usado na maioria dos experimentos. Esse experimento foi realizado da mesma maneira que o representado na Figura 1.

Analisando o gel (Figura 7), verifica-se que o padrão das bandas de atividade ATPásica mostradas aqui, corresponde à mesma enzima, ou seja, que as diferentes amostras são responsáveis pela mesma banda de atividade ATPásica nesse gel. A banda fraca inferior que aparece no gel (indicada por uma seta), principalmente no poço contendo a forma amastigota, seria provavelmente devido à atividade fosfatásica, uma vez que essa banda de atividade não aparece quando o meio de reação contém ortovanadato de sódio além dos outros inibidores (resultado não mostrado).

As duas bandas intensas que aparecem em todos os poços, à mesma altura, na verdade representam agregados da mesma proteína. Em gel não desnaturante espera-se migração das proteínas devido a diferenças na carga líquida total de cada proteína e a possível formação de agregados.

Para confirmar que essas duas bandas correspondiam à mesma proteína, fez-se um gel não desnaturante preparativo, similar àquele da (Figura 7), em que apareceram também duas bandas de atividade ATPásica. O gel foi então cortado na altura das bandas de atividade e as proteínas eletroeluídas, da mesma maneira que o experimento de “imuno blotting”. Após eletroeluição, essa amostra foi concentrada e aplicada em gel de

poliacrilamida mais dodecil sulfato de sódio. As proteínas após separação por eletroforese em “SDS/PAGE”, foram coradas com “Coomassie blue”.

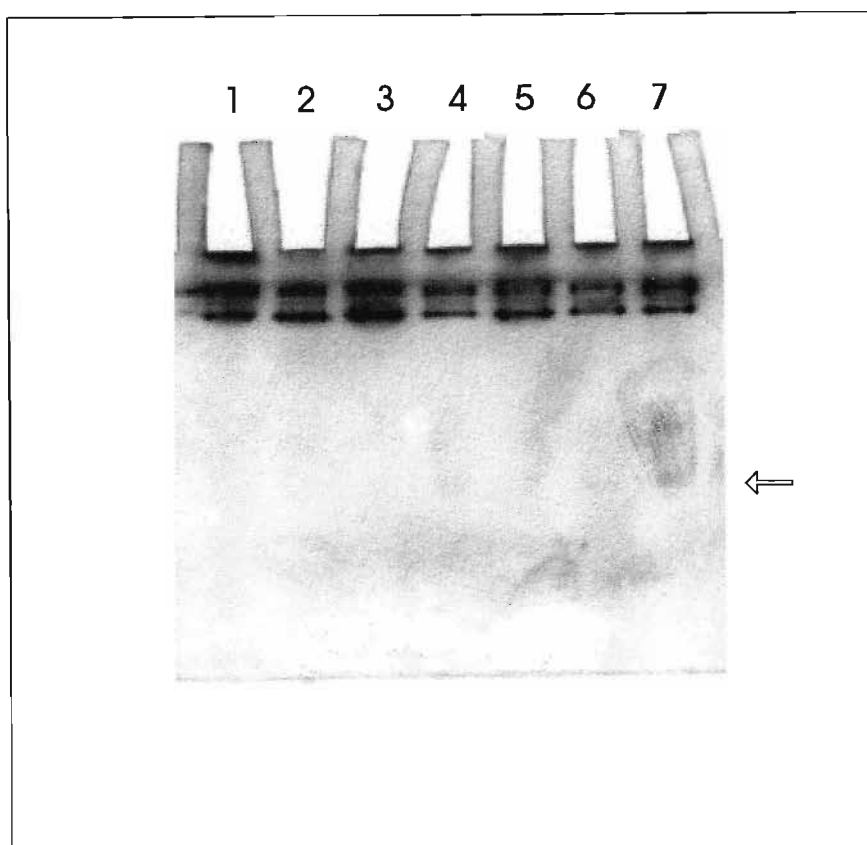


Fig. 8- Gel nativo contendo diversas formas (cepa Y e clone CL-14) de *T. cruzi*. Amostras de diversas formas *T. cruzi* (50 μ g), obtidas como descrito em materiais e métodos, foram solubilizadas em tampão de amostra e aplicadas em gel nativo de poliacrilamida. Após a corrida, o gel foi incubado em tampão de revelação contendo Hepes 25 mM, pH 7,5, $MgCl_2$ 2 mM, $Pb(NO_3)_2$ 2 mM e ATP 2 mM por 4-8 horas. Nos poços 1-7 foram aplicadas amostras contendo homogenado enriquecido em membranas e homogenado total de tripomastigota metacíclico, epimastigota e tripomastigota de clone CL-14, epimastigota, tripomastigota circulante e amastigota extracelular da cepa Y, respectivamente.

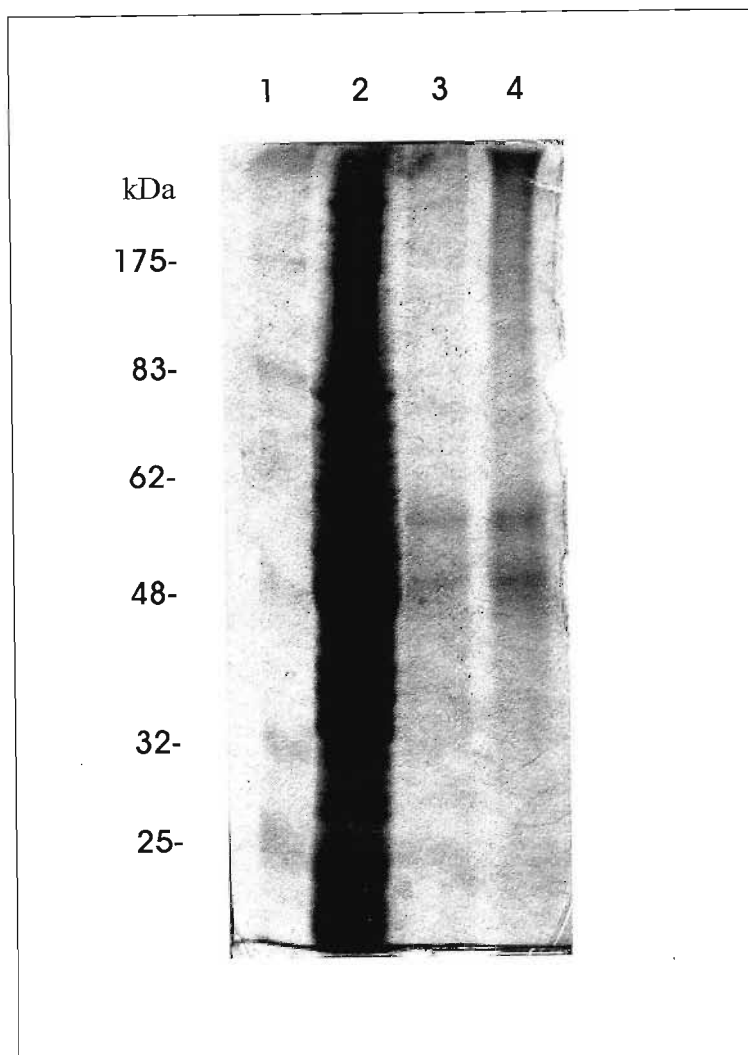


Fig. 9- SDS-PAGE contendo as bandas, superior e inferior, retiradas do gel nativo. As bandas de atividade cortadas de um gel nativo semelhante àquele da figura 8 foram eletroeluídas do gel e após terem sido concentradas, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10 % mais SDS. O gel foi corado com "Coomassie blue" em seguida seco e fotografado. Poço 1, padrão de massa molecular, poço 2, 100 µg de homogenado total de *T. cruzi*, poços 3 e 4 estão as amostras extraídas do gel nativo, que correspondem as bandas inferior e a banda superior, respectivamente.

4.9. Atividade ATPásica usando parasitas intactos.

O objetivo desse experimento foi caracterizar a eventual exposição da enzima na superfície do parasita. Os ensaios enzimáticos foram realizados como descrito em materiais e métodos. Células intactas (10^8) foram adicionadas em meio de reação contendo tampão Hepes 25 mM, pH 7,4, ouabaína 1 mM, NaN_3 10 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, NaCl 0,9 %, KCl 5 mM, EDTA 5 mM, Mg^{2+} livre 3 μM , 0,5 mg de proteína /mL e ATP 1,0 mM para um volume total de 250 μl de reação. Após um período de 1 hora de incubação a reação foi parada pela adição de igual volume de ácido tricloroacético 28 %. O volume total foi centrifugado e o sobrenadante recuperado para medir a quantidade de Pi hidrolisado.

O resultado desse ensaio com parasitas intactos revelou uma atividade ATPásica em torno de 179,68 nmol Pi.mg⁻¹.h⁻¹. Utilizando-se o extrato enriquecido em membranas a atividade ATPásica nas mesmas condições é de 604 nmol Pi.mg⁻¹.h⁻¹. A razão de hidrólise do lisado de *T. cruzi* em relação ao parasita íntegro foi em torno de 3 vezes. A integridade dos parasitas após os experimentos de atividade foi acompanhada por microscopia óptica, notando-se que todos os parasitas apresentavam-se intactos.

Para verificar se o fenômeno observado não seria o resultado de enzimas solúveis secretadas pelo parasita, preparou-se uma amostra de células (10^{10} células) e esta foi incubada por toda noite a 4 °C. Subsequentemente, essa amostra foi passada em 10 mL de PBS em filtro “millipore” e o material coletado foi utilizado, nas mesmas condições descritas para a medida da atividade ATPásica do parasita intacto, para se detectar a presença de atividade ATPásica nesse filtrado. Ao final desse ensaio, constatou-se que não havia a presença de atividade ATPásica nesse material (resultado não mostrado).

4.10. Imunolocalização da ATP-difosfohidrolase

Uma vez que a reatividade cruzada do soro imune anti-NTPase de *T. gondii* contra a propovável apirase do *T. cruzi* mostrou-se bastante específica, o mesmo foi então usado para imunolocalizar a ATP-difosfohidrolase do *T. cruzi*.

Para isso tripomastigotas, epimastigotas e amastigotas extracelulares de *T. cruzi* cepa Y, foram observados por microscopia confocal a laser, após a incubação com o soro anti-NTPase (diluição 1:100) citado acima seguida pelo segundo anticorpo anti-IgG de coelho, conjugado com TRICT. Como mostrado na figura 10, uma marcação intensa foi vista com a forma amastigota extracelular, uma marcação fraca na forma tripomastigota e uma marcação intermediária na forma epimastigota. Nenhuma marcação foi observada quando essas mesmas formas foram incubadas com o segundo anticorpo, conjugado à TRITC, na ausência do anticorpo anti-apirase (Figura 10).

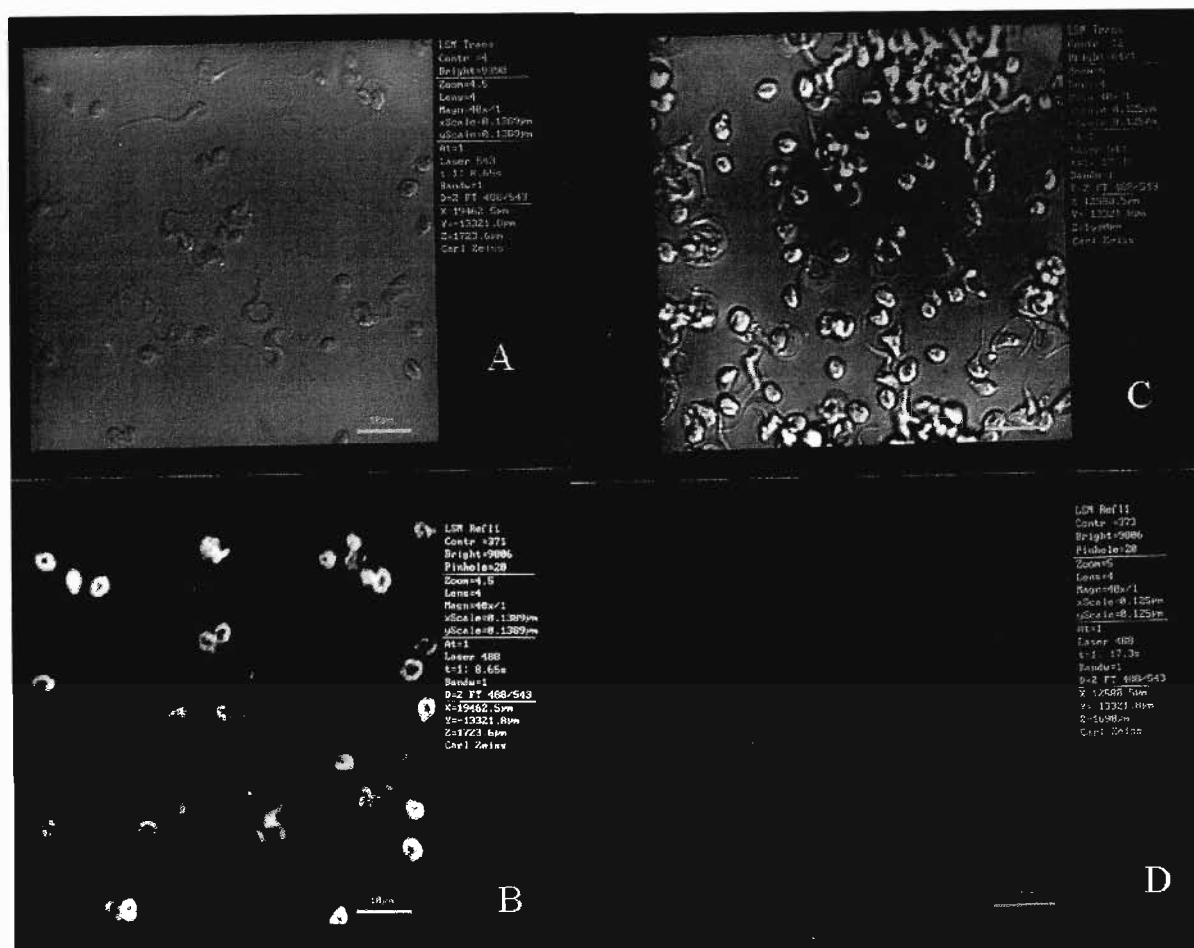


Fig. 10. Reatividade da ATP-difosfohidrolase por imunofluorescência indireta usando microscopia confocal à laser. Dois estágios diferentes de *T. cruzi*, cepa Y, foram fixados e incubados na ausência (C e D) ou na presença (A e B) de anticorpo anti-NTPase de *T. gondii*, seguido pelo anticorpo secundário marcado com TRITC (A-D). O mesmo campo microscópico foi observado por microscopia de contraste interferencial (A e C,) ou por imunofluorescência (B e D). Intensa fluorescência foi observada sobre o estágio amastigota extracelular (B, formas arredondadas). O estágio tripomastigota circulante (B, formas alongadas), não apresentou a mesma intensidade.

5. Discussão

5.1. Especificidade enzimática

A ATP-difosfohidrolase de *T. cruzi* hidrolisou diferentes di e tri nucleotídeos, o que é uma característica comum a outras ATP-difosfohidrolase de diferentes origens (Tognoli & Marré, 1981; LeBel et al., 1980; Yagi et al., 1989; Battastini, 1991; Vara & Serrano, 1981).

Os primeiros estudos sobre a especificidade da apirase foram feitos utilizando-se preparações parcialmente purificadas de batata (Cori et al., 1965). Estes autores mostraram que a estrutura da porção orgânica do substrato não é essencial à atividade enzimática, já que a quebra de ribo- e deoxiribo-nucleotídeos di e trifosfatados naturais e fenil-propil di e trifosfatados permaneciam com velocidades comparáveis. No entanto, a presença da porção orgânica mostrava-se essencial, uma vez que a preparação enzimática atacava polifosfatos inorgânicos a velocidades não comparáveis àquelas observadas para di ou trifosfatados orgânicos, sendo essa atividade provavelmente devida a uma pirofosfatase inorgânica, contaminante da preparação.

Traverso-Cori e cols. (Traverso-Cori et al, 1970) analisando apirases de diferentes variedades de batatas obtidas por reprodução policlonal, mostraram que durante os passos de purificação a razão entre a velocidade de hidrólise do ATP e a velocidade de hidrólise do ADP (chamada razão ATPase/ADPase) era constante para uma dada variedade de Solanum tuberosum e que esta mesma razão podia ser diferente em outra variedade de batata. Portanto, essas isoenzimas apresentavam especificidades diferentes para ATP e ADP com razões ATP/ADPase também diferentes.

Duas diferentes ATP-difosfohidrolases têm sido caracterizadas em tecidos de plantas. Uma foi encontrada em membrana microssomal de Cicer arietum (grão de bico) (Vara & Serrano, 1981). Ela hidrolisa diferentes trifosfo e difosfonucleotídeos e quebra ADP mais rápido que ATP, com valores de Km para ADP e ATP de 0,5 e 0,2 mM, respectivamente. A outra enzima, descrita por Tognoli & Marre (Tognoli & Marré, 1981), foi purificada de microssomas de caule de ervilha. Estes autores observaram que a hidrólise de ADP é 30 % mais veloz que a hidrólise do ATP, com valores de Km de 70-80 μM e 21-35 μM para ATP e ADP, respectivamente.

No protozoa *Toxoplasma gondii* tem sido descrita uma nucleosídeo trifosfato hidrolase (NTPase), capaz de hidrolisar diferentes nucleosídeos trifosfatos (Asai et al., 1983). Recentemente, tem sido mostrado que a enzima purificada não é uma única enzima, mas a mistura de duas isoenzimas, denominadas NTPase I e NTPase II, e que a diferença primária entre essas isoenzimas é que a NTPase II hidrolisa substratos nucleosídeos trifosfatos e difosfatos quase numa mesma razão de hidrólise, enquanto que a NTPase I hidrolisaria nucleosídeos difosfatos numa razão muitíssimo menor (Asia et al., 1995).

Em relação à caracterização dessa enzima em *T. cruzi*, a razão entre as atividades de hidrólise de ATP e ADP observada foi de aproximadamente 4,35. A atividade específica para hidrólise de ATP e ADP (ver tabela I) foi 700,0 $\text{nmole Pi.mg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e 160,8 $\text{nmole Pi.mg}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente. Esses resultados sugerem que estamos trabalhando com uma enzima de alta razão ATP/ADPase.

5.2. Exclusão de associações enzimáticas

Como trabalhou-se o tempo todo com homogenato total de *T. cruzi* ou homogenato de tripomastigotas metacíclicos enriquecido em membranas, houve uma preocupação preliminar de eliminarmos a hipótese de que a atividade hidrolítica encontrada, para os diversos nucleotídeos, estivesse ocorrendo por conta de outras enzimas ou associações enzimáticas. Considerando apenas os produtos finais da reação, a atividade apirásica propicia, em algumas circunstâncias, a possibilidade de interpretações errôneas, já que a típica atividade dessa enzima pode ser confundida com verdadeiras ATPases, que hidrolisam apenas o fosfato terminal do ATP, bem como associações enzimáticas que poderiam simular uma reação apirásica.

A atividade apresentada pelo extrato de *T. cruzi* possui, entretanto, várias características que sugerem ser devidas a uma ATP-difosfohidrolase verdadeira.

A presença de ATPases nas amostras utilizadas nos experimentos aqui apresentados, se torna óbvia quando se trabalha com extrato total de *T. cruzi*, ou mesmo com amostras enriquecidas em membranas (Zingales et al., 1979). Como já foi comentado no início dessa dissertação, diversas enzimas que hidrolisam ligações pirofosfato têm sido detectadas em *T. cruzi*. Em epimastigotas de *T. cruzi* uma atividade ATPásica não inibida por ouabaína foi bioquimicamente detectada sobre a membrana plasmática (Meirelles & de Souza, 1984; Ghosh, 1990). Usando citoquímica ultraestrutural, mostrou-se que esta atividade ATPásica estava localizada na membrana plasmática (no corpo celular e no flagelo) de amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* (Meirelles & de Souza, 1984). Tal atividade não foi sensível à ouabaína, mas foi sensível a Mg^{2+} . ATPases ativadas por Ca^{2+} com alta afinidade e que não demonstram nenhuma dependência por

Mg^{2+} tem sido descritas na membrana plasmática de diferentes tripanosomatídeos (Benaim et al., 1991; Plesner, 1995).

Para descartar a hipótese de que outras enzimas estariam participando da atividade apirásica, todos os experimentos nessa dissertação foram realizados na presença dos inibidores azida 10 mM, ouabaína 1mM e ortovanadato de sódio 1 mM, que são inibidores de F_0-F_1 -ATPases, Na^+/K^+ -ATPase e ATPases de transporte tipo-P (Ca^{2+} e H^+ -ATPases), respectivamente.

5.3. Dependência de Ca^{2+} e Mg^{2+}

Para melhor caracterização da ATP-difosfohidrolase de *T. cruzi*, foi estudada a dependência das concentrações de cálcio e magnésio para a hidrólise de ATP. Foi observado que a enzima é altamente estimulada por concentrações micromolares de Mg^{2+} , podendo essa ativação por Mg^{2+} ser substituída por concentrações milimolares de Ca^{2+} .

A dependência de íons metálicos divalentes é uma característica comum a todas apirases de plantas (Tognoli & Marré, 1981; Vara & Serrano, 1981S). O Ca^{2+} demonstra ser o melhor íon ativador das atividades ATPásica e ADPásica de algumas isoenzimas de apirase de batata, enquanto que em outras Mn^{2+} ou Cd^{2+} representam melhor este papel. Foi demonstrado também que as atividades ATPásica e ADPásica podem ser ativadas diferentemente por íons divalentes.

Numa revisão (Plesner, 1995) sobre ecto-ATPases, é mencionada a ocorrência de ecto-ATPases que são ativadas por Ca^{2+} e/ou Mg^{2+} , apenas por cálcio e inibida por magnésio ou ativadas apenas por magnésio e inibida por cálcio. Portanto, a enzima descrita neste trabalho não se distancia de outras apirases já descritas.

Recentemente, uma atividade ecto-ATPásica dependente de Mg^{+2} (Meyer-Fernandes et al., 1997), foi descrita em *Leishmania tropica* possuindo características semelhantes à enzima de *T. cruzi* descrita nesta dissertação. No entanto, os autores descartam a possibilidade dessa enzima ser uma apirase. Não obstante, tal afirmação não nos pareceu correta, haja vista que o termo ecto-ATPase, que inclui as apirases, tem se tornado cada vez mais abrangente, já que diversos trabalhos tem mostrado a existência de apirases que diferem em algumas de suas características bioquímicas (Plesner, 1995).

Os cátions podem exercer seus efeitos por ligação à enzima livre, ao complexo enzima-substrato ou ao ATP formando um complexo cátion-substrato. Cada uma dessas possibilidades não é exclusiva e tanto a ligação à enzima quanto ao substrato têm sido observadas. Laliberté e cols. (1982) mostraram que ATP^{4-} livre, $Ca-ATP^{2-}$ e $Mg-ATP^{2-}$ são os melhores substratos para a enzima e que não existe nenhuma ativação da enzima por Ca^{2+} e Mg^{2+} livres, exercendo efeito indireto de ativação somente através de sua ligação ao ATP^{4-} livre. Laliberté e cols. (1982) concluíram que a hidrólise do $Mg-ATP^{2-}$ ocorre em velocidade menor que ATP^{4-} e assim sendo, o Mg^{2+} pode proceder como um inibidor da reação quando o $Mg^{2+}-ATP$ é o substrato.

No experimento da figura 4, do presente trabalho, os resultados revelam que a máxima ativação ocorre em Mg^{2+} 10 μ M em um meio que contem 1 mM de ATP, sugerindo que o Mg^{2+} deve estar se ligando a um sítio de alta afinidade na enzima, e não através do complexo ATP-Mg. Na realidade os dados sugerem que o complexo ATP-Mg provavelmente age como um inibidor, o que explicaria a redução da atividade em concentrações altas de Mg^{2+} (Fig. 4), quando aumenta a concentração do complexo ATP-Mg.

5.4. Determinação do Km da apirase de *Trypanosoma cruzi*

Os valores encontrados para a velocidade de hidrólise de ATP nas diferentes concentrações apontaram para dois Km diferentes, um em torno de 30 μM e o outro com um valor que estaria em torno de milimolar. No entanto, não foi possível determinar um valor para este último Km.

5.5. Resultados com soros imunes anti-apirase de outros organismos

Diante das prováveis homologias entre as apirases, um soro policlonal feito contra uma proteína de fusão obtida da tradução do cDNA da NTPase de *T. gondii* fundida a glutathione S-transferase (Bermudes et al., 1994) e um outro soro policlonal anti-apirase nativa de batata cv Desirée foram utilizados na tentativa de verificar se havia reações cruzadas entre essas duas enzimas e a do *T. cruzi*.

Os dois soros imunes foram usados em técnicas de “immuno blotting” e ambos detectaram uma mesma banda, originária da banda de atividade do gel nativo, que foi cortada e eletroeluída antes de ser aplicada em SDS/PAGE (Figura 5). Na verdade, esses dois soros reconheceram mais de uma banda; o soro anti-NTPase de *T. gondii* apresentou uma maior especificidade pela banda de menor motilidade, já o soro anti-apirase de batata apresentou uma especificidade que não pareceu ser tão clara em relação a essas bandas. Todavia, este soro reconhece a banda de menor motilidade, correspondente à do soro anti-NTPase de *T. gondii*, mas também reconhece outras duas bandas acima, que por não estarem bem separadas uma da outra tem-se a impressão de se tratar de uma única banda (Figura 6). Quando se faz um gel nativo e retira-se a banda de atividade, que é eletroeluída e concentrada, para então ser aplicada em gel de SDS/PAGE, verifica-se sempre a

presença das mesmas bandas, quando o gel é corado com “Coomassie blue”, ou seja, quatro bandas entre 62 e 48 kDa. Essas bandas estariam co-migrando sempre juntas, já a partir do gel nativo. Mesmo quando mais de uma banda ativa aparece no gel nativo (Figura 8) e ambas são retiradas e aplicadas em gel de SDS/PAGE, ainda assim, essas quatro bandas continuam aparecendo, sugerindo um papel importante delas na atividade. No entanto, serão precisos mais estudos para verificar se isso não seria o produto de um complexo enzimático ou apenas algum contaminante que possui epítomos que são reconhecidos pelos dois soros, o que não seria difícil, tratando-se de um soro policlonal feito em coelhos.

Uma explicação para o que foi discutido no parágrafo anterior, torna-se mais difícil quando analisamos os resultados obtidos com o experimento de imunoprecipitação, feito com o parasita marcado com ^{35}S -metionina e aqueles mesmos soros. É que nesse experimento, o soro imune anti-NTPase de *T. gondii* imunoprecipitou uma única banda, com reação cruzada forte e altamente específica. Essa banda está na mesma altura das bandas reveladas no experimento de “western blot”, ou seja, entre 62 e 48 kDa. A mobilidade eletroforética de muitas proteínas em gel de SDS/PAGE é linearmente proporcional ao logaritmo de suas massas. Usando essa relação empírica, fez-se uma estimativa da massa molecular dessa banda imunoprecipitada e da banda revelada no “western blot”. Os resultados indicaram que a banda imunoprecipitada tinha a mesma mobilidade eletroforética da banda de menor migração do experimento de “western blot”.

Estes resultados forneceram fortes evidências de que a massa molecular da ATP-difosfohidrolase de *T. cruzi* seria de aproximadamente 57,5 kDa.

5.6. Purificação parcial da ATP-difosfolidrolase por eletroforese em gel não desnaturante

Progressos no estudo de ecto-apirases tem sido impedidos pela falta de um inibidor específico para essa enzima e por sua baixa abundância, apesar da sua alta atividade específica. Além disso, muitas ecto-apirases são inativadas pelos detergentes normalmente usados para solubilizar as proteínas ligadas a membranas (Plesner, 1995).

Nesse trabalho, foi mostrado que homogenato total ou enriquecido em membranas de *T. cruzi* quando submetidos à eletroforese em gel não desnaturante, na presença do detergente não iônico Triton X-100 0,1 % mais deoxicolato de sódio 0,1 %, preserva a atividade ATP-difosfolidrolásica. A enzima solubilizada foi capaz de catalisar a hidrólise tanto de ATP como de ADP (Figura 2). A excisão dessas bandas ativas do gel nativo, seguida pela separação das proteínas em SDS/PAGE e coradas por “Coomassie blue” revelou que somente quatro bandas apareciam. Esse resultado comparado com o extrato total de *T. cruzi* (Figuras 6, “lane 2 ou Figura 9, “lane” 2), mostrou que uma considerável purificação foi obtida, pela separação das proteínas, do extrato total por eletroforese em gel nativo e posterior excisão da banda de atividade (compare os “lanes” 2 com 3 das respectivas figuras citadas acima).

5.7. Imunolocalização da ATP-difosfohidrolase

A imunolocalização da ATP-difosfohidrolase de *T. cruzi*, usando o soro imune anti-NTPase de *T. gondii*, revelou dados interessantes. Um desses dados é que a intensidade da fluorescência variou entre os estágios do parasita apresentados aqui (Figura 10). Intensa fluorescência foi observada nas formas amastigotas extracelulares, enquanto as formas tripomastigotas de cultura de tecido não mostraram a mesma intensidade (Figura 10). Outro dado seria quanto a localização propriamente dita, os resultados apontaram para uma localização provavelmente sobre a superfície do parasita. No entanto, a forma tripomastigota apresentou uma reação cruzada que não foi regular para todos os parasitas mostrados no campo da figura 10, não acontecendo o mesmo para as formas amastigotas, que apresentaram o mesmo padrão de reação sobre os parasitas de todo o campo (Figura 10). Não obstante, será preciso fazer-se uma microscopia eletrônica para definir melhor a localização dessa reação cruzada.

É interessante notar que a diferença da resposta ao anticorpo quanto à forma utilizada, pôde também ser vista em relação à atividade enzimática quando atribuída a esses estágios do *T. cruzi*. Foi observado que a atividade enzimática dessas formas, quando medidas em tubos de ensaios, mostrou-se também diferentes para os diversos estágios analisados (Tabela II). A forma amastigota extracelular apresentou uma atividade bem maior em relação as outras formas, dado esse que corrobora o da imunofluorescência. Já a forma tripomastigota apresentou uma atividade enzimática maior em relação à forma epimastigota. Possíveis explicações para esses resultados serão discutidos mais adiante.

6. Conclusões

Nesse trabalho foram mostradas diversas evidências para concluirmos que uma enzima com as mesmas características de uma ATP-difosfohidrolase estaria realmente presente no protozoário *Trypanosoma cruzi*. Inicialmente uma atividade enzimática para a hidrólise de diversos nucleotídeos di ou trifosfatados permaneceu detectável mesmo na presença dos principais inibidores de outras ATPases e/ou fosfohidrolases. Uma outra característica dessa enzima foi a falta de especificidade pelo substrato, ela promoveu a hidrólise de diversos nucleotídeos di e/ou trifosfatados. Uma ativação dependente de Mg^{2+} e uma inibição dessa mesma atividade por Ca^{2+} também pode ser mostrada como características dessa enzima. É devido as características citadas acima (Plesner, 1995) e pertencentes a uma mesma enzima que se pode propor a existência de uma apirase em *T. cruzi*. Além disso, outra forte evidência da presença de uma apirase em *T. cruzi*, foi a reação cruzada entre os soros heterólogos anti-NTPase de *T. gondii* e anti-apirase de batata com a enzima do *T. cruzi*.

A presença dessa enzima nos diversos estágios do *T. cruzi* também ficou evidente, no entanto, a atividade dessa enzima comportou-se diferentemente entre essas formas. A forma amastigota extracelular que mostrou uma atividade maior, tanto para a hidrólise dos nucleotídeos como para a reação cruzada no experimento de imunoflorescência indireta, é reconhecida como um estágio do parasita onde a expressão, de um modo geral, de suas proteínas são realizadas numa quantidade superior as outras formas (comunicado pessoal, feito pela Dra. Maria Júlia M. Alves). Todavia, devemos enfatizar que a forma amastigota utilizada nos experimentos dessa dissertação não são realmente as formas amastigotas do estágio intracelular do ciclo de vida do *T. cruzi*. Essas formas denominadas de

amastigotas-like e que aqui foram citadas como amastigotas extracelulares, são por critérios morfológicos, bioquímicos, imunológicos e ultraestruturais, apenas semelhantes às amastigotas (Andrews et al., 1987; Ley et al., 1988; Mortara, 1997). Em relação a diferença verificada entre as formas epimastigotas e tripomastigotas, a atividade enzimática na forma epimastigota foi menor que a da forma tripomastigota, seria difícil apontar algum fator realmente concreto que pudesse justificar tal diferença. No entanto, há um trabalho (Letelier et al., 1986), mostrando que a forma epimastigota de *T. cruzi* (cepa Tulahuen) pode apresentar atividades ácido-fosfatásicas diferentes quando essas enzimas estivessem no citossol ou ligadas à membrana microssomal e que tais diferenças estariam relacionadas aos diferentes momentos na fase de crescimento. Uma atividade ácido-fosfatásica presente na membrana microssomal permaneceu alta durante todo o período de crescimento de 16 dias, ou seja, paralelo à curva de crescimento (Letelier et al., 1986). Por outro lado, duas atividades fosfatásicas citosólicas permaneciam altas somente durante os primeiros dias de crescimento, 7-8 dias de cultura, que corresponde a fase logartímica de crescimento. Quando essa cultura entrava na fase estacionária da curva de crescimento as duas atividades enzimáticas citosólicas declinavam, estabilizando-se quando alcançava um valor que era em torno de 60 % abaixo do máximo (Letelier et al., 1986). Esse dado mostra que algumas enzimas revelam diferentes velocidades de hidrólise para o seu substrato dependendo da fase de crescimento. Se considerarmos que a apirase aqui caracterizada pudesse também apresentar-se dessa maneira, talvez fosse possível explicar porque a atividade enzimática na forma epimastigota seria menor em relação a tripomastigota (Tabela II), já que as amostras de epimastigotas usadas nessa dissertação foram obtidas na fase estacionária da curva de crescimento.

Visto que a presença de uma ATP-difosfohidrolase em *T. cruzi* foi comprovada, restaria agora conjecturar-se sobre uma possível função dessa enzima nesse protozoário. Como já foi dito anteriormente nesse trabalho, nosso interesse começou a partir da caracterização de uma apirase na superfície do *Schistosoma mansoni*, um parasita helminto que vive na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado (Vasconcelos et al., 1993). Nesse trabalho, postula-se que o *S. mansoni* estaria usando essa enzima para defender-se do mecanismo de agregação plaquetária, mediado por ADP entre outros fatores, da citotoxicidade (Bout et al., 1986; Tran et al., 1992) e da reatividade citolítica mediada por linfócitos T (Capron et al., 1982), ambos empregados pelo hospedeiro como sistema de defesa contra o organismo agressor. Todavia, para que essa hipótese pudesse torna-se verdadeira, a localização dessa enzima no *S. mansoni* teria que estar, incondicionalmente, sobre a superfície externa do parasita, o que realmente foi confirmado (Vasconcelos et al., 1993, 1996).

Similarmente ao trabalho feito com o *S. mansoni* (Vasconcelos et al., 1993), uma hipótese mais clara sobre a função dessa enzima no *T. cruzi* estaria condicionada, também, à confirmação da localização da apirase nesse protozoa.

O ciclo de vida do *T. cruzi*, entretanto, mostra-se bastante diferente ao do *S. mansoni*. Haja vista que este tem apenas uma passagem transiente pela circulação sanguínea, enquanto aquele é um parasita que vive obrigatoriamente na circulação do hospedeiro. Analisando desta forma e conjecturando-se que a apirase de *T. cruzi* estivesse realmente na superfície externa desse parasita, esta estaria enfrentando diferentes ambientes à medida que o parasita fosse passando pelos diferentes estágios do seu ciclo de vida. Durante o período em que as células tripomastigotas estivessem circulando pelo

sangue, ou seja, fora das células, essa enzima poderia atuar da mesma forma que a do *S. mansoni*. Essa mesma hipótese pode ser considerada para as formas amastigotas, já que como foi dito no início dessa dissertação, há estudos mostrando que cerca de 10 % das formas de *T. cruzi* circulantes em camundongos infectados na fase aguda são amastigotas (Andrews e cols., 1987). Outros estudos mostram que as formas amastigotas também são capazes de infectar células de mamíferos fagocíticas profissionais ou não (Pan, 1978; Andrews et al., 1987; Ley et al., 1988).

Outra hipótese para a função dessa enzima seria na aquisição de purinas: como o *T. cruzi* não consegue sintetizar purinas (Guimarães & Gutteridge, 1986; Cohn & Gottlieb, 1997) e como os nucleosídeos tri, di e monofosfatados não podem entrar nas células (Plesner, 1995), uma importante função da ação combinada dessa ecto-ATPase e uma 5'-nucleotidase produziria a purina necessária ao parasita. Essa purina seria então capturada por transportadores específicos do *T. cruzi*, onde estaria disponível para a biosíntese de nucleotídeos.

Um aspecto importante sobre a aquisição de purinas pelo *T. cruzi* é que os diferentes estágios desse parasita diferem na razão de aquisição de purinas. Guimarães & Gutteridge (1986) mostraram que a passagem de bases purínicas poderia ser predita pela relação entre a concentração e o crescimento das células, com a última fase logarítmica de crescimento mostrando a maior variabilidade. Já a razão da passagem de purinas foi inesperadamente baixa nas formas reprodutivas amastigotas e alta nas formas não reprodutivas tripomastigotas. Foi sugerido que tripomastigotas metabolizam e acumulam reservas de purinas, enquanto que amastigotas dependem da degradação de RNA e nucleotídeos como fonte de purinas. Esses resultados correlacionam-se com os

encontrados nessa dissertação, ou seja, as formas amastigotas também apresentaram maior atividade enzimática em relação as forma tripomastigotas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeijon, C., Yanagisawa, K., Mandon, E. C., Haeusler, A., Moremen, K., Hirschberg, C. B., and Robbins, P. W. (1993) Guanosine diphosphatase is required for protein and sphingolipid glycosilation in the Golgi lumen of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, **122**: 307-323.
- al-Abbassy, S. N., Seed, T. M. & Kreier, J. P. (1972) Isolation of the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi* from a mixture of the trypomastigote and epimastigote forms of the parasite by use of a DEAE-cellulose column. *J. Parasitol.* **58**: 631-632.
- Aley, S. B., Scott, W. A. & Cohn, Z. A. (1980) Plasma membrane of *Entamoeba histolytica* *J. Exp. Med.* **152**: 391-404.
- Almeida-de-Faria, M., Haapalainen, E. F., Colli, W. & Alves, M. J. M. (1997) Characterization of an intracellular epimastigote-like form of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* vol. **92**, pg 82.
- Alves, M. J. M. (1996) Members of the Tc-85 protein family from *Trypanosoma cruzi* are adhesion proteins. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **29**: 831-833.
- Amano, T., Wakagi, T. and Oshima, T. (1993) An ecto-enzyme from *Sulfolobus acidocaldarius* strain 7 which catalyzes hydrolysis of inorganic pyrophosphate, ATP, and ADP: purification and characterization. *J. Biochem.* **114(3)**: 329-333.
- Andrade, Z. A. & Andrade, S. G. (1979) Patologia - As diferentes cepas do *Trypanosomas cruzi*. In: Brener, Z. A. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 214-218.

- Andrews, N. M., Hong, K., Robbins, E. S. and Nussenzweig, V. (1987). Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* **64**: 474-484.
- Andrews, N.W. & Colli, W. (1982) Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. *J. Protozool.* **29**: 264-269.
- Anich, M., Fanta, N., Mancilla, M., Kettlun, A. M., Valenzuela, M. A. and Traverso-Cori, A. (1990) Apyrase activity and changes in metabolites during germination and tuberization of *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* **29**: 1411-1415.
- Asai, T., Miura, S., Sibley, L. D., Okabayashi, H., and Takeuchi, T. (1995) Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.*, **270**: 11391-11397.
- Asai, T., O'Sullivan, W. J. & Tatibana, M. (1983) A potent nucleoside triphosphate hydrolase from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* **258**: 6816-6822.
- Baker J. R. and Price, J. (1973) Growth in vitro of *Trypanosoma cruzi* as amastigotes at temperatures below 37degrees C. *Int. J. Parasitol.* **3(4)**: 549-551.
- Battastini, A. M. O., Rocha, J. B. T., Barcellos, C. K., Dias, R. D. and Sarkis, J. F. S. (1991) Characterization of an ATP-Diphosphohydrolase (EC 3. 6. 1. 5.) in Synaptosomes from Cerebral Cortex of Adult Rats. *Neurochemical Research* **16(12)**: 1303-1310.
- Benaim, G., Losada, S., Gadelha, R. F., and Docampo, R. (1991) A calmodulin-activated (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase is involved in Ca²⁺ transport by plasme membrane vesicles from *Trypanosoma cruzi* *Biochem. J.* **280**: 715-720.

- Benain, G. (1993) Intracellular calcium homeostasis. Calmodulin and Ca^{2+} -ATPase of the plasma membrane of Trypanosomatids *Acta Cient Venez* **44**: 57-66.
- Benain, G., Moreno S. N. J, Hutchinson G., Cervino V., Hermoso T., Romero P. J., Ruiz F., De Souza W. and Docampo R. (1995) Characterization of the plasma-membrane calcium pump from *Trypanosoma cruzi* *Biochem. J.* **306**: 299-303.
- Bermudes, D., Pecks K. R., Afifi M. A., Beckers C. J. M. and Keith A. J. (1994). Tandemly Repeated Genes Encode Nucleoside Triphosphate Hydrolase Isoforms Secreted into the Parasitophorous Vacuole of *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* **269**(46): 29252-29260.
- Berridge, M. J. (1993) Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**: 315-325.
- Boron, W. F. (1983) Transport of H^{+} and of ionic weak acids and bases. *J. Membr. Biol.* **72**(1-2): 1-16.
- Brack, C. (1968) Electron microscopic studies on the life cycle of *Trypanosoma cruzi* with special reference to developmental forms in the vector *Rhodnius prolixus*. *Acta Trop.* **25**(4): 289-356.
- Brener , Z. & Chiari, E. (1963) Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop.* S. Paulo **5**, 220-224.
- Brener, R. R. & De La Merceda, (1987) Chagas' Disease vectors. CRC Press. Boca Raton, Fla.
- Brener, Z. (1973) Biology of *Trypanosoma cruzi* *Annu. Rev. Microbiol.* **27**: 347-382.

- Brener, Z. (1992) *Trypanosoma cruzi*: taxonomy, morphology and life cycle. In: In Wendels, S; Brener, Z; Camargo, M. E; Rassi, A **Chagas disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine.** Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia: São Paulo, p. 49-80.
- Brener, Z., and Alvarenga, N. (1976). In “New Approaches in American Trypanosomiasis,” pp.83-86. Pan American Health Organization, Washington, D. C.
- Cabantchik, Z. I., Knauf, P. A. & Rothstein, A. (1978) The anion transport system of the red blood cell. The role of membrane protein evaluated by the use of 'probes'. *Biochim. Biophys. Acta.* **515(3):** 239-302.
- Camargo, E. P. (1964) Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Trop. S. Paulo* **6**, 93-100.
- Carafoli, E. (1987) Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* **56:** 395-433
- Carafoli, E. (1991) Calcium pump of the plasm membrane. *Physiol. rev.*, **71:** 129-153.
- Cataldi de Flombaum, M. A. & Stoppani, A. O. (1986) Inactivation of mitochondrial adenosine triphosphatase from *Trypanosoma cruzi* by oxigen radicals. *Biochem Int* **12(6):** 785-793.
- Cataldi de Flombaum, M. A. & Stoppani, A. O. (1992) High-affinity calcium-stimulated, magnesium-dependent adenosine triphosphatase in *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol [B]* **103(4):** 933-937.
- Chagas, C. (1909) Nova tripanozomíase humana. Estudos 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:** 1-62.

- Cori, O., Traverso-Cori, A., Tetas, M. and Chaimovich, H. (1965) Substrate especificity and inhibition studies on potato apyrase. *Biochemische Zeitschrift* **342**: 345-358.
- Côté, Y. P., Picher, M., St. Jean, P., Béliveau, R., Potier, M. and Beaudoin, A. R. (1991) Identification and localization of ATP-diphosphohydrolase (apyrase) in bovine aorta: relevance to vascular tone and platelet aggregation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1078**: 187-191.
- Dias, E. (1934). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **28**: 1-110.
- Docampo, R., Vanderheyden, N.M., Shaw, M. M., Durant, P. J., Bartlett, M. S., Smith, J. W. & McLaughlin, G. L. (1996) An H⁺-ATPase regulates cytoplasmic pH in *Pneumocystis carinii* trophozoites. *Biochem. J.* **1:316 (Pt 2)**: 681-684.
- Docampo, R., Scott, D. A., Vercesi, A. E. & Moreno, S. N. (1995) Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* **15:310 (Pt 3)**:1005-1012.
- Dolan, M.T., Reid, C. G. & Voorheis, H. P. (1986) Calcium ions initiate the selective depolymerization of the pellicular microtubules in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* **80**:123-140.
- Edwards, F. A. and Gibb, A. J. (1993) ATP - a fast neurotransmitter *FEBS Lett.* **325**: 86-89.
- Fanta, N., Anich, M., Mancilla, M., Kettlun, A. M., Valenzuela, M. A. and Traverso-Cori, A. (1988) Starch, adenine nucleotides and apyrase changes during potato tuber developoment. *Arch. Biol. Med. Exp.* **21**: 129-133.
- Fisk, C. H., and Subbarow, Y., J. (1925) The Colorimetric Determination of Phosphorus. *Biol. Chem.*, **66**: 375.

- Frasch, A. C. C., Segura, E. L., Cazzulo, J. J., and Stoppani, A. O. M. (1978) Adenonise triphosphatase activities in *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.[B]* **60(3)**: 271-275.
- Frasseto, S. S., Mendes, L.A., Dias, R. D. and Sarkis, J. F. (1993) Characterization of an ATP-diphosphohydrolase (EC 3. 6. 1. 5.) in rat blood platelets. *Mol. Cell. Biochem.* **129**: 47-55.
- Furuya, T., Zhong, L., Meyer-Fernandes, J. R., Lu, H., Moreno, S. N. J. & Docampo, R. (1998) Ecto-Protein Tyrosine Phosphatase Activity in *Trypanosoma cruzi* infective stages. *Mol. Biochem. Parasitol.* **In press**.
- Ghosh, A & Greenberg, M. E. (1995) Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* **268**: 239-247.
- Ghosh, J., Ray, M., Sarkar, S. & Bhaduri, A. (1990) A high affinity Ca²⁺(+)-ATPase on the surface membrane of *Leishmania donovani* promastigote *J. Biol. Chem.* **265(19)**: 11345-11351.
- Girolomoni, G., Santanionio, M.L., Pastores, S., Bergstresser, P.R., Giannetti, A. and Cruz, P. D. (1993) Epidermal Langerhans cells are resistant to the permeabilizing effects of extracellular ATP: in vitro evidence supporting a protective role of membrane ATPase. *J. Invest. Dermatol.* **100 (3)**: 282-287.
- Goncalves, M. F., Zingales, B. & Colli, W. (1980) cAMP phosphodiesterase and activator protein of mammalian cAMP phosphodiesterase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1(2)**: 107-118.
- Guimaraes, R. C. and Gutteridge, W. E. (1986) Purine base uptake in *Trypanosoma cruzi*: adaptations and effects of inhibitors. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **20(1)**:1-10.

- Hamlyn, J. M. and Senior, A. E. (1983) Evidence that Mg^{2+} - or Ca^{2+} -activated adenosine triphosphatase in rat pancreas is a plasma-membrane ecto-enzyme. *Biochem. J.* **214**: 59-68.
- Handa, M., and Guidotti, G. (1996) Purification and Cloning of soluble ATP diphosphohydrolase (apyrase) from potato tuber (*Solanum tuberosum*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218**: 916-923.
- Holwill, M. E. & McGregor, J. L. (1976) Effects of calcium on flagellar movement in the trypanosome *Crithidia oncopelti*. *J. Exp. Biol.* **65(1)**: 229-242.
- Kessler, S. W. (1975) Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *J. Immunol.* **115**: 1617-1624 .
- Knowles, A. F., Isler, R. E. and reece, J. F. (1983) The common occurrence of ATP-diphosphohidrolase in mammalian plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **731**: 88-96.
- Komoszynski, M. and Wojtczar, A. (1996) Apyrase (ATP-diphosphohydrolase, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1310**: 233-241.
- Komoszynski, M.A. and Skalska, E. (1990) Ca^{2+} -stimulated organic pyrophosphatase--a new plant phosphohydrolase from wheat seedling microsomes. *Acta Biochim. Polonica* **37(4)**: 405-416.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophages T4. *Nature* **227**: 680-685.

- Laliberté, J. F. , St. Jean, P. and Beaudoin, A. R. (1982) Kinetic effects of Ca^{2+} e Mg^{2+} on ATP hydrolysis by the purified ATP diphosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* **257**: 3869-3874.
- Laliberté, J. F. and Beaudoin, A.R. (1983) Sequential hydrolysis of the γ and β -phosphate group of ATP by the ATP-diphosphohydrolase from pig pancreas. *Biochim. Biophys. Acta.* **742**: 9-15.
- LeBel, D., Poirier, G. G., Phaneuf, S., St-Jean, P., Laliberté J. F., and Beaudoin, A. R. (1980). Characterization and purification of a calcium-sensitive ATP diphosphohydrolase from pig pancreas. *J. Bio. Chem.* **225**: 1227-1233.
- Letelier M. E., Alliende C., Gonzalez J., Aldune J., Repetto Y. and Morello A. (1986) Phosphatase activity in *Trypanosoma cruzi*. Phosphate removal from ATP, phosphorylated proteins and other phosphate compounds. *Comp Biochem Physiol [B]*; **85(2)**:375-380.
- Letelier M. E., Repetto Y, Aldune J. and Morello A. (1985) Acid and alkaline phosphatase activity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp Biochem Physiol [B]*; **81(1)**:47-51.
- Ley, V., Robbins, E. S. and Nussenzweig, V. (1988) Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J. Exp. Med.* **168**: 649-659.
- Lima, M. F., Beltz, L. A., and Kierszenbaum, F. (1988) . *Trypanosoma cruzi*: a specific surface marker for the amastigote form. *J. Protozool.* **35**: 108-110.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

- Mant, M. J. & Parker, K. R. (1981)- Two platelet aggregation inhibitors in tsetse (*Glossina*) saliva with studies of roles of thrombin and citrate in vitro platelet aggregation. *Br. J. Haematol.* **48**: 601-608.
- Marcus, A. J. and Safier, L. B. (1993) Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB* **7**: 516-522.
- Mazelis., M. (1959) Enzymatic degradation of adenosine triphosphate to adenine by cabbage leaf preparations. *Plant. Physiol.*, **34**: 153-158.
- Mazunder, S., Mukherjee, T., Ghosh, J., Ray, M. & Bhaduri, A. (1992) Allosteric modulation of *Leishmania donovani* plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by endogenous calmodulin. *J. Biol. Chem.* **267(26)**: 18440-18446.
- McLaughlin, J. & Muller, M.(1981) A calcium-regulated adenosine triphosphatase in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **3**: 369-379.
- McLaughlin, J.(1985) A high affinity Ca^{2+} -dependent ATPase in the surface membrane of the bloodstream stage of *Trypanosoma rhodesiense*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **15(2)**: 189-201.
- Meirelles, M. N. L. & de Souza, W. (1984) Localization of a Mg^{2+} -activated ATPase in the plasma membrane of *T. cruzi*. *J. Protozol.*, **31**: 135-140.
- Melnick, R. L., Rubnstein, C. P. and Motzkin, S. M. (1979) Measurement of mitochondrial oxidative phosphorylation: selective inhibition of adenylate kinase activity by P1 P5-di (adenosine-5')-pentaphosphate. *Anal. Biochem.* **96**: 7-11.
- Meyer, H & de Oliveira, M. X. (1948) Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in tissue cultures: a four year study. *Parasitology* **39**: 91-94.

- Meyer-Fernandes, J. R., Dutra, P. M. L., Rodrigues, C. O., Saad-Nehme, J. and Lopes, A. H. C. S. (1997) Mg-Dependent Ecto-ATPase Activity in *Leishmania tropica*. *Arch. Biochem. Biophys.* **341**: 40-46.
- Meyerohof, O. (1945). The origin of the reaction of Harden and Young in cell-free alcoholic fermentation. *J. Biol. Chem.*, **157**: 105-119.
- Molnar, J. and Lorand, L. (1961) Studies on apyrases. *Arch. Biochem. Biophys.* **93**: 353-363.
- Moncayo, A. (1994) in *Tropical Disease Research Progress 1991-92*, Eleventh Programme.
- Morrow, C. D., Flory-Granger, B. & Krassner, S. M. (1981) *Comp. Biochem. Physiol.* **69A**: 65-72.
- Mortara, R. A. (1991) *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. *Exp Parasitol* **73**: 1-14.
- Nagakura K, Tachibana H and Kaneda Y. (1985) Alteration of the cell surface acid phosphatase concomitant with the morphological transformation in *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol [B]*; **81(4)**: 815-817.
- Nagakura K, Tachibana H, Kaneda Y. and Sekine T. (1986) Subcellular fractionation of *Trypanosoma cruzi*; isolation and characterization of plasma membranes from epimastigotes. *Tokai J Exp Clin Med* Mar; **11(1)**: 23-29.
- Najjar, S. M., Accili, D., Philippe, N., Jernberg, J., Margolis, R. & Taylor, S. I. (1993) pp120/ecto-ATPase, an endogenous substrate of the insulin receptor tyrosine kinase, is expressed as two variably spliced isoforms. *J. Biol. Chem.* **268(2)**: 1201-1206.

- Pan, S. C. T. (1978) *Trypanosoma cruzi*: In vitro interactions between cultured amastigotes and human skin-muscle cells. *Exp. Parasitol.* **45**: 215-224.
- Papamarcki, T. and Tsolas, O. (1990) Identification of ATP-diphosphohydrolase activity in human term placenta using a novel assay for AMP. *Mol. Cell. Biochem.* **97**: 1-8.
- Pereira, N. (1978). M. S. Thesis, University Federal of Rio de Janeiro.
- Pereira, N. M., Timm, S. L., Costa, S. C. G., Rebello, M. and De Souza, W. (1978) *Trypanosoma cruzi*: isolation and characterization of membrane and flagellar fractions. *Exp. Parasitol.* **46(2)**: 225-234.
- Picher, M., Cote, Y.P., Beliveau, R., Potier, M. and Beaudoin, A.R. (1993) Demonstration of a novel type of ATP-diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in the bovine lung. *J. Biol. Chem.* **268(7)**: 4699-4703.
- Pieber, M., Valenzuela, M. A., Kettlun, A. M., Mancilla, M., Aranda, E., Collados, L. and Traverso-Cori, A. (1991) ATPase-ADPase activities of rat placental tissue. *Comp. Biochem. Physiol.* **100(B)**: 281-285.
- Plesner, L. (1995) Ecto-ATPases: Identities and Functions. *Int. Rev. Cytol.*, **158**: 141-214.
- Rega, A. F., & Garrahan, P. (1986) in The Ca²⁺ Pump of Plasma Membranes (Rega, A. F. & Garrahan, P. J., eds.), pp. 1-166, CRC Press, 1-166, New York.
- Ribeiro, J. M. C. and Garcias, E. S. (1979) Apyrase activity in saliva and crop of *Rhodnius prolixus*. *An. Acad. Bras. Cien.* **51**: 182.
- Ribeiro, J. M. C., Makoul, G. T., Levine, J., Robinson, D. & Spielman, A. (1985) Antihemostatic, antiinflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *J. Exp. Med.* **161** : 332-344.

- Ribeiro, J. M. C., Sarkis, J. J. F., Rossignol, P. A. & Spielman, A. (1984) salivary apyrase of *Aedes aegypti*: characterization and secretory fate. *Comp. Biochem. Physio.* **79B** : 81-86.
- Rilo, M. C. & Stoppani, A. O. (1993) Effect of polyamines on mitochondrial F-ATPase from *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **29(1)**: 131-139.
- Roos, A. & Boron, W. F. (1981) Intracellular pH. *Physiol. Rev.* **61(2)**: 296-434.
- Sarkis, J. J. & Salto, C. (1991) Characterization of a synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Brain Res Bull* **26(6)**: 871-876.
- Sarkis, J. J. F. (1985) Apirase salivar do *Rhodnius prolixus*: cinética e purificação. Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Schwarcz de Tarlovsky, M. N., Rilo, M. C., Hernandez S. M., Bedoya, A. M., Lammel, E. M. & Isola, E. L. (1995) Spermine action on mitochondrial H⁺-ATPase activity and proliferation rate of *Trypanosoma cruzi* *Cell. Mol. Biol. (noisy-le-grand)* **41(6)**: 861-866.
- Serrano, R. (1988) Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. *Biochim. Biophys. Acta* **947(1)**: 1-28.
- Sibley, L. D., Neisman, I. R., and Asai, T. (1993) *Molecular Parasitology Conference, September 26-29, 1993, Marine Biological Laboratories, Woods Hole, MA*
- Silva, L. H. P. & Nussenzweig, V. (1953) Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco Folia. *Clin. Biol.* **20**: 191-207.

- Sorenson, M. M., Coelho, H. S. L. and Reuben, J. P. (1986) Caffeine inhibition of Ca accumulation by the sarcoplasmic reticulum in mammalian skinned fibers. *J. Memb. Biol.* **90**: 219-230.
- Swallow, C. J., Grinstein, S. & Rotstein, O. D. (1990) A vacuolar type H⁺-ATPase regulates cytoplasmic pH in murine macrophages. *J. Biol. Chem.* **265(13)**: 7645-7654.
- Sweadner, K. J., and Goldin, S. M., (1980). Active transport of sodium and potassium ions: mechanism, function, and regulation. *New Engl. J. Med.* **302**: 777-783.
- Tellez-Inon, M. T., Ulloa, R. M., Torruella, M. & Torres, H. N. (1985) Calmodulin and Ca²⁺-dependent cyclic AMP phosphodiesterase activity in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **17(2)**:143-153.
- Tognoli, L. and Marré, E. (1981) Purification and characterization of divalent cation-activated ATP-ADPase from pea stem microsomes. *Biochim. Biophys. Acta.* **642**: 1-14.
- Traverso-Cori, A., Chaimorvich, H. and Cori, O. (1965) Kinetic studies and properties of potato apyrase. *Arch. Biochem. Biophys.* **109**: 173-184.
- Traverso-Cori, A., Traverso, S. and Reyes, H. (1970) Different molecular forms of potato apyrase. *Arch. Biochem. Biophys.* **137**: 133-142.
- Turrini, F., Sabolic, I., Zimolo, Z., Moewes, B. & Burckhardt, G. (1989) Relation of ATPases in rat renal brush-border membranes to ATP-driven H⁺ secretion. *J. Membr. Biol.* **107(1)**:1-12.

- Umezawa, E. S., Milder, R.V. & Abrahamsohn, I. A. (1985) *Trypanosoma cruzi* amastigotes: development in vitro and infectivity in vivo of the forms isolated from spleen and liver. *Acta Trop.* **42**: 25-32.
- Valenzuela, M. A., Collados, L., Kettlun, A. M., Mancilla, M., Lara, H., Puente, J., Aranda, E., Chayet, L., Alvarez, A. and Traverso-Cori A. (1992) Changes in apyrase activity in uterus and mammary gland during the lactogenic cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* **103(B)**: 113-118.
- Valezuela, M.A., López, J., Depix, M., Mancilla, M., Kettlun, A. M., Catalan, L., Chiong, M., Garrido, J. and Traverso-Cori, A. (1989) Comparative subcellular distribution of apyrase from animal and plant sources. Characterization of microsomal apyrase. *Comp. Biochem. Physiol.* **93B(4)**: 911-919.
- Van Adelsberg, J. & Al-Awqati, Q. (1986) Regulation of cell pH by Ca²⁺-mediated exocytotic insertion of H⁺-ATPases. *J. Cell. Biol.* **102(5)**: 1638-1645.
- Vanderheyden, N., Benain, G. & Docampo, R. (1996) The role of a H⁺-ATPase in the regulation of cytoplasmic pH in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes *Biochem. J.* **318(Pt1)**: 103-109.
- Vara, F. and Serrano, R. (1981) Purification and characterization of a membrane-bound ATP-diphosphohydrolase from *Cicer arietinum* (chick-pea) roots. *Biochem. J.* **197**: 637-643.

- Vasconcelos, E. G., Ferreira, S. T., de Carvalho, T. M. U., de Souza, Wanderley., Kettlun, A. M., Mancilla, M., Valenzuela, M. A., and Almeida, S. V. (1996) Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *S. mansoni*. Immunological cross reactivities with potato apyrase and *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. *J. Biol. Chem.* **271**: 22139-22145.
- Vasconcelos, E.G., Nascimento, P.S., Nazareth, M., Maeirelles, L., Verjovski-Almeida, S. and Ferreira, T. (1993) Characterization and localization of an ATP-diphosphohydrolase on the external superface of tegument of *S. mansoni* *Mol. Biochem. Parasitol.* **58**: 205-214.
- Voorheis, H. P., Bowles, D. J. & Smith, G. A. (1982) Characteristics of the release of the surface coat protein from bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **257(5)**: 2300-2304.
- Wang, T-F and Guidotti, G. (1996) CD39 is an ecto-(Ca²⁺, Mg²⁺)-apyrase *J. Biol. Chem.*, **271**: 9898-9901.
- Yagi, K., Arai, Y., Kato, N., Hirota, K. and Miura, Y. (1989) Purification of ATP-diphosphohydrolase from bovine aorta microsomes. *Eur. J. Biochem.* **180**: 509-513.
- Yagi, K., Shinbo, M., Hasuzime, M., Shimba, L.S., Kurimura, S. and Miura, Y. (1991) ATP diphosphohydrolase is responsible for ecto-ATPase and ecto-ADPase activities in bovine aorta endothelial and smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **180(3)**: 1200-1206.
- Zeledon, R., Alvarenga, N. J., and Schosinsky, K. (1977). In "Chagas Disease,"pp.59-70. Pan American Health Organization. Publ. No. 347.

Zingales, B. Carniol, C., Abrahamsohn P. A. and Colli W. (1979) Purification of Adenylyl cyclase-containing plasm membrane fraction from *Trypanosoma cruzi*. *Biochim. Biophys. Acta.* **550**: 233-244.