

NANCY DA ROCHA TORRES

**CLONAGEM, AVALIAÇÃO DE SNPs E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA ATP
DIFOSFOHIDROLASE 2 (NTPDase 2) DAS CEPAS ET E NSL DE *Leishmania*
(*Viannia*) *braziliensis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

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

T

T693c
2017 Torres, Nancy da Rocha, 1989-
Clonagem, avaliação de SNPs e expressão heteróloga da
ATP Difosfolhidrolase 2 (NTPDase 2) das cepas ET e NSL de
Leishmania (Viannia) braziliensis / Nancy da Rocha Torres. –
Viçosa, MG, 2017.
xiv; 72f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.56-61.

1. Leishmaniose. 2. Polimorfismos (Genética).

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica
e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em Biologia
Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22 ed. 614.53

NANCY DA ROCHA TORRES

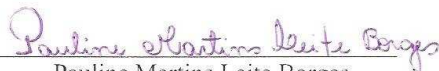
**CLONAGEM, AVALIAÇÃO DE SNPs E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA ATP
DIFOSFOHIDROLASE 2 (NTPDase 2) DAS CEPAS ET E NSL DE *Leishmania*
(*Viannia*) *braziliensis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de julho de 2017.



Vália Monteze Guimarães



Pauline Martins Leite Borges



Juliana Lopes Rangel Fietto
(Orientadora)

*A Deus, o Criador.
Ao meu avô Jaime e à tia Núbia pelos ensinamentos deixados.*

*“... também pôs o mundo no coração do homem, sem que este possa descobrir a obra que Deus fez desde o princípio até ao fim”.
(Eclesiastes 3.11).*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus o “autor e consumidor da nossa fé” (Hb. 12.2), por meio do qual “vivemos, nos movemos e existimos” (At. 17.28). Agradeço pelo Seu imenso amor ao me mostrar, todos os dias, a beleza de Suas obras. Agradeço por permitir que eu O conhecesse através de sua Criação e não canso em dizer o quão privilegiada sou por poder ver além do que ela se mostra, através da ciência.

Agradeço aos meus pais, em especial à minha mãe, exemplo de luta, força e perseverança. A ela, que me ensinou a andar no caminho da retidão me ensinando a ser justa e firme.

Agradeço aos meus avós, tios e tias pelas orações incessantes. Em especial a tia Núbia e Patrícia por ajudarem na construção desse sonho.

Aos meus padrinhos Iara e Walnir e aos tios Wanda e Expedito por não medirem esforços para realizarem meu sonho. Agradeço a Júnior e Cynthia por “me darem” Viçosa.

Agradeço ao Daniel, por ser meu apoio nos momentos de dificuldade e por acreditar em mim quando eu não mais acreditava. Agradeço por esse amor que me sustenta e me transforma a cada dia.

Agradeço a minha orientadora Juliana Fietto por me receber, ensinar e incentivar. Agradeço por ser exemplo de humanidade em um mundo acadêmico corrompido pelo poder e pela ganância.

Agradeço a Yaro pela amizade, paciência e ensinamentos, sem os quais não teria chegado até aqui.

Agradeço a Anna, Luciana, Jackson, Victor, Joice, Amanda, Fernanda, Tatiana, Thiago, Leilane, Jerusa, Isadora e Sr. Valdir. À Eduarda e Helaindo, por participarem diretamente da luta diária. Obrigada a todos pela amizade e pelos cafés compartilhados.

Agradeço à família Metodista por crescermos juntos em “fé”, na qual firmei meus passos e por meio da qual pude ser transformada durante esse “caminho”. Em especial a Layla, Leidyleni e Felipe pela amizade e aprendizado.

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1: <i>Primers</i> utilizados na clonagem da região codificante do ectodomínio da enzima NTPDase 2 no vetor pJET1.2/blunt.	18
Tabela 2: Reação de digestão das construções ET e NSL-pJET e do vetor pET21b.	21
Tabela 3: Estágios de digestão utilizados no termociclador.....	21
Tabela 4: Reação de ligação.	22
Tabela 5: Reação de PCR de colônia.	23
Tabela 6: Reação de PCR controle positivo.	23
Tabela 7: Estágios da PCR de colônia.....	24
Tabela 8: Distribuição de polimorfismos na sequência de DNA codificante da NTPDase2 das cepas ET e NSL de <i>L. braziliensis</i>	29
Tabela 9: Distribuição de mutações na sequência de aminoácidos da NTPDase2 das cepas ET e NSL de <i>L. braziliensis</i>	29
Tabela 10: <i>Templates</i> utilizados para construção do modelo NSL-NTPDase2 no I-TASSER.	32
Tabela 11: <i>Templates</i> utilizados para construção do modelo ET/NSL-NTPDase2 no I-TASSER.	33
Tabela 12: Resíduos na estrutura 3D de ET/NSL e NSL-NTPDase2 identificados como importantes para atividade pelo alinhamento com RnNTPDase2.....	36
Tabela 13: <i>Basic Local Alignment</i> para o clone NSL.....	38
Tabela 14: <i>Basic Local Alignment</i> para o clone ET.	39

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1:** Distribuição geográfica das Leishmanioses cutânea e visceral no mundo. Fonte: De acordo com dados da OMS no ano de 2016.....4
- Figura 2:** Distribuição das espécies de *Leishmania* causadoras da leishmaniose tegumentar no Brasil. Fonte: Adaptado de BRASIL, 2017, p.20.....4
- Figura 3:** Ciclo de vida de *Leishmania major*. Os parasitos são transmitidos pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas, que injetam as formas promastigotas metacíclicas na pele. Essas formas são internalizadas por macrófagos e se desenvolvem em amastigotas. Durante o repasto sanguíneo, o inseto vetor ingere macrófagos infectados. Os parasitos se desenvolvem em formas promastigotas procíclicas as quais se dividem e aderem ao epitélio intestinal. Ao migrarem para região anterior do intestino, ocorre a diferenciação em promastigotas metacíclicas, que podem ser transmitidas novamente durante o repasto sanguíneo. Fonte: Sacks, Noben-Trauth, 2002, p.847, adaptado.7
- Figura 4:** Topografia de membrana predita e propriedades catalíticas de membros da família E-NTPDase. As enzimas podem ocorrer como homomultímeros. NTPDase 5 ocorre como proteína solúvel (seta). Apenas a estrutura primária da NTPDase 6 putativa é conhecida. Nomes previamente usados estão em parênteses (modificados de Zimmermann, 1996a). Fonte: Zimmermann, 2000, adaptado.9
- Figura 5:** Dobramento do domínio extracelular da NTPDase2 de rato. (a) Diagrama em *cartoon* (Complexo Ca^{+2} x AMPPNP). Os domínios I e II estão coloridos em azul e verde, respectivamente. Um modelo conformacional para o *loop* desordenado (R289-S256) é indicado em azul escuro. Pontes dissulfeto são mostradas em laranja, resíduos Asn para possíveis sítios de glicosilação estão em púrpura e o peptídeo cis R191-P192 está em verde. Folhas-beta estão numeradas de 1 a 17. Segmentos helicoidais estão marcados de A a Q. A, D, e Q são hélices 3^{10} . A hélice Q é para esquerda. Ligantes estão em vermelho. (b) Diagrama de topologia usando o mesmo esquema de cores em a. Folhas-beta estão representadas por triângulos e hélices estão representadas por círculos. Possíveis sítios de N-glicosilação são mostrados como hexágonos e a prolina cis é mostrada como pentágono. O arranjo reflete a simetria interna como mostrado pela superposição dos dois domínios (e.g. α -hélices E e K podem ser superpostas, enquanto a folha- β 10 não possui um equivalente). Os dois ligantes marcam a posição relativa do sítio ativo entre os dois domínios. Fonte: Zebisch, Sträter, 2008, tradução nossa..... 10

Figura 6: Árvore filogenética usando E-NTPDases de mamíferos e tripanosomatídeos (*Leishmania* e *T.cruzi*). As sequências das NTPDases foram alinhadas no programa CLC worbench e usadas para construir a árvore filogenética usando o método Neighbor Joining com análise: Árvore filogenética usando E-NTPDases de mamíferos e tripanosomatídeos (*Leishmania* e *T.cruzi*). As sequências das NTPDases foram alinhadas no programa CLC worbench e usadas para construir a árvore filogenética usando o método *Neighbor Joining* com análises *bootstrap* (números nas ramificações). *Mus musculus* (Mm); *Homo sapiens* (Hs). Tripanosomatídeos tem duas ENTPDases com exceção de *T. cruzi*, que tem apenas uma ENTPDase no banco de dados. ENTPDases de tripanosomatídeos são mais similares às isoformas 5 e 6 de mamíferos e estão agrupadas no ramo superior da árvore. Fonte: Vasconcellos et al., 2014, adaptado. 11

Figura 7: Visão geral da sinalização purinérgica no contexto do sistema imune, durante a homeostase, estímulo de dano ou infecção por *Leishmania*. 1A) Representação resumida da sinalização purinérgica sob condições de homeostase. Durante a homeostase ectonucleotidases do hospedeiro (e.g., ENTPDases e 5'-NT) mantém baixas concentrações de mediadores da sinalização purinérgica (e.g., ATP, ADP, AMP e ADO) a fim de manter a homeostase dependente de ectonucleotidase do sistema imune inato. 1B) Resumo das mudanças conhecidas na sinalização purinérgica por estímulos de perigo não específicos (e.g., infecção, inflamação e necrose). Depois de um estímulo de perigo, a concentração de mediadores da sinalização purinérgica aumenta, levando à ativação de receptores purinérgicos, que podem culminar em aumento dos níveis de inflamação, apoptose, quimiotaxia, fagocitose e produção de ROS. 1C) Resumo das influências conhecidas na sinalização purinérgica durante a infecção por *Leishmania*. Durante a infecção por *Leishmania*, a ação de ectonucleotidases do parasita (e.g., ENTPDases e 5'NT) podem subverter o sistema imune do hospedeiro pela modulação da sinalização purinérgica, levando à inibição da ativação de P2 e induzindo a ativação de P1 pela adenosina. Adicionalmente, ENTPDases de *Leishmania* podem agir como moléculas de adesão para facilitar a infecção de células do parasito (e.g., macrófagos). Fonte: Pimentel et al., 2016, adaptado 14

Figura 8: Mapa do sistema pET-21a-d (+) (NOVAGEN). Os vetores desse sistema possuem uma Tag T7 N-terminal e uma sequência HisTag C-terminal. Esses vetores diferem da série pET-24 a-d (+) apenas pela marca de seleção (ampicilina vs kanamicina). 20

- Figura 9:** Sequência de aminoácidos da NSL-NTPDase2 alinhada com a sequência referênciada. Em vermelho estão anotadas as ACRs e em azul as mutações. 30
- Figura 10:** Predição de localização celular para ET/NSL-NTPDase2 no Target P. 31
- Figura 11:** Predição de localização celular para NSL-NTPDase2 no Target P. 32
- Figura 12:** Representação em *cartoon* do modelo 3D da NSL-NTPDase 2. (A) As regiões de ACR estão coloridas em rosa e as mutações estão representadas em vermelho. (B) Rotação de 180° da estrutura mostrada em A. 34
- Figura 13:** Representação em superfície e *cartoon* do modelo NSL-NTPDase 2. (A) Mutação N185S (B) Mutação S126F (rotação de 90°) (C) Mutação Q99P (rotação de 180° em relação à estrutura em A) (D) Alinhamento do modelo NSL-NTPDase 2 (azul) com a estrutura cristalina da Rn-NTPDase 2 (3cj1A), disponível no PDB (cinza). Mutação T376A (vermelho) próxima à região de ligação à base do nucleotídeo. 34
- Figura 14:** Alinhamento dos modelos NSL-NTPDase 2 e ET/NSL-NTPDase 2 com Rn-NTPDase 2. Alinhamento do modelo NSL-NTPDase 2 (azul) com Rn-NTPDase 2 (cinza) à esquerda, mostrando resíduos na enzima de rato importantes para ligação ao substrato (laranja), posicionamento da água nucleofílica (azul), coordenação do cálcio (ciano) e o resíduo catalítico E165 (preto). Resíduo de alanina da enzima de NSL (vermelho) alinhado com Y398 da enzima de rato (laranja). À direita o modelo ET/NSL-NTPDase 2 (marrom) alinhado à Rn-NTPDase 2 (cinza), mostrando o resíduo de treonina alinhado com Y398 da enzima de rato. 35
- Figura 15:** Confirmação por PCR de colônia. (A) Clones ET (B) Clones NSL. M: Marcador. C-: controle negativo. C+: controle positivo NTPDase1 de *T. cruzi*. As setas brancas indicam as bandas de 1000 pb e 1650 pb do marcador. As setas pretas indicam os fragmentos amplificados na PCR. Em C+ 1170 pb correspondente ao ectodomínio da TcNTPDase 1 e de 1 a 16 fragmento de 1158 pb correspondente ao ectodomínio da NTPDase 2 de *L. braziliensis*. 37
- Figura 16:** Confirmação por digestão dos clones obtidos no vetor pET21b. M: Marcador. As setas indicam as bandas de 1000 pb e 1650 pb do marcador. 37
- Figura 17:** Confirmação da clonagem da ET/NSL-NTPDase2 por sequenciamento 40
- Figura 18:** Confirmação da clonagem da ET/NSL-NTPDase2 por sequenciamento 41
- Figura 19:** Análise de polimorfismos no clone ET 42

- Figura 20:** Tradução da sequência NSL-NTPDase2 clonada no vetor pET21b e alinhamento com a sequência da ATP difosfohidrolase 2 de *Leishmania braziliensis* disponível no NCBI.....43
- Figura 21:** Tradução da sequência ET-NTPDase2 clonada no vetor pET21b e alinhamento com a sequência da ATP difosfohidrolase 2 de *Leishmania braziliensis* disponível no NCB.....44
- Figura 22:** Predição de ponto isoelétrico e massa molecular para a enzima recombinante ET/NSL-NTPDase 2.45
- Figura 23:** Testes de indução. Lisado da indução em pRARE com 0,5mM de IPTG nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 21h (A). Indução em BL21(DE3) com 0,2 mM e 0,4 mM de IPTG (B), 0,6 mM e 0,8 mM de IPTG (C) e 1 mM de IPTG (D). Indução em pRARE com 0,2 mM e 0,4 mM de IPTG (E) 0,6 mM e 0,8 mM de IPTG (F). M-Marcador; NT2-NTPDase 2 recombinante purificada de *L. infantum chagasi*; L-lise/fração solúvel; S- solubilização dos corpos de inclusão.46
- Figura 24:** Gráfico da purificação em FPLC. A linha azul indica absorção na faixa de 280 nm. Os quatro picos iniciais indicam a aplicação da amostra e o pico final indica a eluição. A linha verde refere-se à porcentagem de tampão B para eluição da amostra. As frações coletadas estão indicadas por números em vermelho.....47
- Figura 25:** Aumento do gráfico da purificação na região das frações coletadas. Nas frações 1 e 2 são detectados 2 picos de absorção de UV.....48
- Figura 26:** SDS-PAGE das frações 4 a 11 obtidas na purificação em FPLC. NT2-NTPDase 2 recombinante de *L. infantum chagasi* purificada. VNL-Volume não ligado. 4-11- frações.49
- Figura 27:** Western blotting das frações 1 a 8 obtidas na purificação em FPLC. NT2: NTPDase2 de *L. infantum chagasi* usada como controle. Números de 1 a 8 indicam as frações coletadas na purificação. VNL: volume não ligado. Soro policlonal anti-NTPDase2 de *L. infantum chagasi* na diluição 1:2.000 foi usada como anticorpo primário. Anti-IgG de coelho acoplado à peroxidase na diluição 1: 15.000 foi usado como anticorpo secundário..... 50

RESUMO

TORRES, Nancy da Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Clonagem, avaliação de SNPs e expressão heteróloga da ATP difosfohidrolase 2 (NTPDase 2) das cepas ET e NSL de *Leishmania (Viannia) braziliensis***. Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto. Coorientadores: Yaro Luciolo dos Santos, Raphael de Souza Vasconcellos, Gustavo Costa Bressan e Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

As leishmanioses compreendem um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas pela picada de fêmeas de insetos flebotomíneos. Apresentam diferentes formas de manifestações clínicas de acordo com a espécie envolvida, podendo apresentar sintomatologia mais severa correlacionada à infecção por cepas mais virulentas. Estudos indicam que *L. braziliensis*, principal agente da leishmaniose cutânea e mucocutânea no Brasil, possui uma diversidade intra-espécie e que diferentes cepas estão relacionadas a diferenças na virulência, podendo influenciar o desenvolvimento de diferentes formas clínicas. Foi observado que as cepas ET e NSL apresentam características polares quanto à virulência e infecciosidade em modelo murino. Além disso, foi observado que essas cepas diferem na hidrólise de nucleotídeos extracelulares e que a alta taxa de hidrólise de ATP se correlaciona com a cepa NSL, de maior virulência. O mesmo trabalho identificou a presença de SNPs não silenciosos na sequência da NTPDase2 de NSL, mas nenhuma correlação com a atividade de hidrólise de nucleotídeos, virulência e infectividade foi observada. Considerando papel das NTPDases de *Leishmania* na hidrólise de nucleotídeos extracelulares e na modulação da resposta imune do hospedeiro, o objetivo desse trabalho consistiu em investigar a relação desses polimorfismos com a atividade da enzima NTPDase2, visando compreender as diferenças de hidrólise de nucleotídeos e virulência previamente observados. Nesse trabalho, a região que codifica para o ectodomínio da enzima NTPDase2 das cepas ET e NSL foi isolado e clonado em vetor bacteriano e a sequência correspondente ao ectodomínio de ET/NSL-NTPDase2 foi clonada no vetor pET21b, expressa e purificada. Análises de polimorfismos nas sequências indicam que os clones ET apresentam apenas SNPs silenciosos nas posições 861 e 879. Diferentemente, alguns clones NSL apresentam sequência idêntica à de ET e outros possuem SNPs nas posições 213, 296, 377, 554 e 1126, mudando os aminoácidos nas posições 99, 126, 185 e 376. Avaliando a estrutura 3D das proteínas, foi observado que a maioria das mutações são externas à enzima e que a mutação T376A se localiza em uma região predita como importante para a ligação ao substrato. Juntos, esses resultados levantam questões importantes acerca da influência desses SNPs na estrutura e atividade da enzima, que podem nortear

experimentos futuros, a fim de elucidar o papel de variantes genéticas para a enzima NTPDase2 nos fenômenos observados para essas duas cepas em *L. braziliensis*.

ABSTRACT

TORRES, Nancy da Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Cloning, SNPs evaluation and heterologous expression of ATP diphosphohydrolase 2 (NTPDase 2) from *Leishmania (Viannia) braziliensis* ET and NSL strains.** Advisor: Juliana Lopes Rangel Fietto. Co-advisers: Yaro Lucio dos Santos, Raphael de Souza Vasconcellos, Gustavo Costa Bressan and Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

Leishmaniasis comprises a set of diseases caused by *Leishmania* protozoa and transmitted by the bite of females of phlebotomine insects. They present different clinical outcomes according to the species and may present more severe symptomatology correlated to infection by more virulent strains. Studies indicate that *L. braziliensis*, the main agent of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Brazil, has an intra-species diversity and different strains are related to differences in virulence, who affects the development of different clinical forms. It was observed that the ET and NSL strains have polar characteristics regarding virulence and infectivity in murine model. Furthermore, it was observed that these strains differ in hydrolysis of extracellular nucleotides and the high rate of hydrolysis of ATP correlates with the NSL, the higher virulence strain. The same work identified non-silent SNPs in NTPDase2 sequence, but no correlation with nucleotide hydrolysis activity, virulence and infectivity was observed. Considering the role of *Leishmania* NTPDases in hydrolysis of extracellular nucleotides and modulation of the host immune response, the aim of this work was to investigate the relationship of these polymorphisms with the activity of the enzyme NTPDase2, in order to understand the differences of nucleotide hydrolysis and virulence previously observed. In this work, the coding region corresponding to ectodomain NTPDase2 from ET and NSL strains was isolated and cloned into a bacterial vector and the sequence corresponding to the ET / NSL-NTPDase2 ectodomain expressed and purified. Analysis of polymorphisms in the sequences indicates that all ET clones present only silent SNPs at positions 861 and 879. In contrast, some NSL clones have a sequence identical to ET and others have SNPs at positions 213, 296, 377, 554 and 1126, changing amino acids at positions 99, 126, 185 and 376. The 3D structure of the proteins, show that most mutations are external to the enzyme and the T376A mutation is located in a predicted region as important for substrate binding. Together, these results raise important questions about the influence of these SNPs on the structure and activity of the enzyme that can guide future experiments in order to elucidate the role of genetic variants for the enzyme NTPDase2 in the phenomena observed for these two strains in *L. braziliensis*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Leishmanioses.....	3
2.2. Ciclo de Vida do Parasito	5
2.3. NTPDases de mamíferos e a sinalização purinéica	7
2.4. Atividade ectonucleotidásica, NTPDases e suas funções na infecção de kinetoplastídeos	10
2.5. Polimorfismos de base única.....	15
3. OBJETIVOS.....	17
3.1. Objetivo Geral.....	17
3.2. Objetivos específicos	17
4. METODOLOGIA.....	18
Análises de Bioinformática.....	18
4.1. Extração de DNA plasmidial, sequenciamento e análise de polimorfismos	18
4.2. Predição de localização celular.....	19
4.3. Predição de ponto isoelétrico e massa molecular	19
4.4. Construção do modelo tridimensional	19
Clonagem e expressão heteróloga	19
4.5. Clonagem no vetor de expressão pET21b	19
4.6. Preparação de células <i>Escherichia coli</i> DH5-Alpha competentes.....	22
4.7. Transformação	22
4.8. Confirmação por PCR, digestão e sequenciamento.....	23
4.9. Preparação de células <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) e pRARE competentes	24
4.10. Extração de DNA plasmidial e transformação.....	24
4.11. Expressão heteróloga-Testes de indução	24
4.12. Pré-purificação.....	25
4.13. Dosagem de proteínas.....	26
4.14. SDS-PAGE e Western Blotting	26
4.15. Purificação da ET/NSL-NTPDase2 por <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> (FPLC).....	27
4.16. SDS-PAGE e Western Blotting	27

5. RESULTADOS.....	28
Análises de bioinformática.....	28
5.1 Análise de polimorfismos	28
5.2 Predição de localização celular.....	31
5.3 Construção do modelo tridimensional	32
Clonagem e expressão heteróloga	36
5.4 Clonagem.....	36
5.5 Predição de massa molecular e ponto isoeletrico	45
5.6 Expressão heteróloga e purificação da enzima ET/NSL-NTPDase2.....	45
6. DISCUSSÃO.....	51
7. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
8. REFERÊNCIAS	56
ANEXOS	62

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses compreendem um espectro de doenças que exibem características clínicas diferentes de acordo com a espécie envolvida, podendo apresentar sintomatologia mais severa correlacionada à infecção por cepas mais virulentas. Estes parasitos são transmitidos por fêmeas infectadas de insetos hematófagos dos gêneros *Phlebotomus*, no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (HARHAY et al., 2011; MONGE-MAILLO, LÓPEZ-VÉLEZ, 2013; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017;).

Dentre as medidas de controle da Leishmaniose adotadas atualmente no Brasil está a eutanásia de cães infectados, pois o tratamento com medicamentos de uso humano não é permitido, uma vez que poderia ocasionar a resistência dos parasitos (BRASIL, 2008). Recentemente o Ministério da Saúde autorizou o tratamento de cães infectados com leishmaniose visceral com o composto Miltefosina, por não ser utilizado no tratamento dos casos humanos. Porém o tratamento não se configura uma medida de Saúde Pública para o controle da doença, mas sim uma permissão para o uso do medicamento em casos de escolha individual (BRASIL, 2016). As poucas drogas existentes são usadas para o tratamento humano, porém apresentam alta toxicidade. Não existem vacinas para o uso humano e as poucas vacinas para uso em cães não têm eficácia comprovada (KUMAR e ENGWERDA, 2014).

Assim a compreensão dos mecanismos envolvidos na infecção por *Leishmania*, bem como o estudo de fatores de virulência destes parasitos podem fornecer informações importantes para intervenção no ciclo de vida de *Leishmania*, favorecendo o surgimento de novas alternativas de prevenção, diagnóstico e tratamento da doença.

Vários estudos já foram feitos por nosso grupo de pesquisa e colaboradores acerca das E-NTPDases de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum chagasi*, nos quais mostramos, dentre outras informações, que estas enzimas participam da adesão à célula hospedeira e da modulação do sistema imune do hospedeiro, sugerindo-as como fatores de virulência e infecciosidade nestes parasitos (FIETTO et al., 2004; GOMES et al., 2015; MARIOTINI-MOURA et al., 2014; SANTOS et al., 2009; VASCONCELLOS et al., 2014).

Além disso, a infecção por *Leishmania braziliensis*, que causa diferentes formas clínicas da doença, tem sido associada à variação genotípica em diferentes isolados da espécie, incluindo a presença de polimorfismos de base única (SNPs). Sequências obtidas por RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) previamente identificaram genótipos a partir de isolados de leishmaniose cutânea, mucosa e disseminada. A partir dos amplicons obtidos foram

identificados seis loci polimórficos, incluindo as sequências da piruvato desidrogenase kinase, do transportador de nucleosídeo/nucleobase e da proteína Co-A ligase de ácidos graxos de cadeia longa. A partir desses *loci* foram identificados SNP's e indels que se associam a forma disseminada da doença na Bahia (QUEIROZ et al., 2012).

Estudo recente verificou que diferentes isolados de *L. braziliensis* com virulência diferenciada, apresentam atividade polar de hidrólise de nucleotídeos extracelulares e que isso se correlaciona com o desenvolvimento da forma clínica. Avaliando o gene da enzima NTPDase 2, que hidrolisa nucleotídeos extracelulares, verificou-se a presença de SNPs em muitos desses isolados, porém nenhuma associação específica desses polimorfismos com a atividade enzimática ou com a forma clínica foi avaliada, devido ao fato dos mesmos polimorfismos serem encontrados em cepas de alta e baixa virulência (LEITE et al., 2012).

Sabendo que a virulência e a atividade de hidrólise podem ser consequência do balanço e da regulação de muitos fatores celulares, não descartamos a hipótese de que esses polimorfismos possam influenciar a atividade enzimática direta. Portanto, considerando o papel dessas enzimas e a presença de variantes genótípicas para a enzima NTPDase 2 em *L. braziliensis*, nosso grupo iniciou estudos a fim de verificar se esses polimorfismos influenciam a atividade enzimática e conseqüentemente se podem contribuir para a diferença de hidrólise e virulência observada entre isolados dessa espécie.

Estudando duas cepas de *L. (V.) braziliensis* com atividades polares de hidrólise de nucleotídeos e virulência diferenciada: a cepa ET de menor virulência e menor atividade ectonucleotidásica e a cepa NSL de maior virulência e maior atividade nucleotidásica, Valiate (2012) observou a presença de polimorfismos de base única (SNPs) no gene que codifica a proteína NTPDase 2 na cepa ET. Neste trabalho foram identificados dois SNPs silenciosos nas posições 861 e 879, porém o trabalho para a cepa NSL não foi concluído e poucos clones da cepa ET foram analisados.

Assim, o objetivo do presente trabalho consistiu na clonagem, avaliação de SNPs e expressão heteróloga da proteína NTPDase 2 das cepas ET e NSL de *L. (Viannia) braziliensis*, buscando elucidar diferenças moleculares e bioquímicas relativas a essas enzimas, que possam contribuir para a melhor compreensão se a diferença de virulência associada à atividade ectonucleotidásica observada nessas cepas pode ter relação com a NTPDase 2.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leishmanioses

As leishmanioses compreendem um conjunto de doenças que decorrem da infecção por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos por insetos flebotomíneos. Estas doenças possuem diferentes manifestações clínicas, apresentando-se em 3 principais formas: (I) leishmaniose visceral, que afeta fígado e baço, causando distensão abdominal, febre e anemia, podendo causar a morte se não tratada; e as formas tegumentares: (II) leishmaniose cutânea que causa lesões ulcerosas na pele, geralmente próximas ao local da picada e (III) leishmaniose mucosa, podendo ser mucocutânea, que afeta boca, nariz e garganta causando destruição das mucosas. Além dessas, observam-se a (IV) leishmaniose cutânea disseminada, que se caracteriza pela presença de lesões ulceradas distantes do local da picada e a (V) leishmaniose cutânea difusa, que se caracteriza por lesões não ulcerosas, nodulares, distantes do local da inoculação e associada à anergia da resposta imune do hospedeiro (BRASIL, 2017; MARZOCHI, M., MARZOCHI, K. 1994; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

Consideradas doenças negligenciadas, estão associadas à pobreza, desnutrição, habitação precária e deslocamento populacional. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam que haja de 700 mil a 1 milhão de novos casos a cada ano, sendo 50 mil a 90 mil casos de leishmaniose visceral e 600 mil a 1 milhão de casos de leishmaniose cutânea. A figura 1 mostra os países afetados pela doença, segundo dados da OMS no ano de 2016 (OMS, 2017).

Estima-se que mais de 20 espécies de *Leishmania* sejam responsáveis pela doença e se associem diferentemente às formas de manifestação clínica observadas (OMS, 2016). As principais espécies causadoras da leishmaniose visceral são *Leishmania infantum chagasi* nas Américas, Mediterrâneo, Oriente Médio, África Ocidental e Ásia Central e *Leishmania donovani* na Índia e África (HARHAY et al., 2011). A Leishmaniose Tegumentar ocorre em 82 países com a maioria dos casos no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria. No Velho Mundo as cinco principais espécies causadoras da doença são *L. aethiopica*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major* e *L. tropica*. No Novo Mundo as espécies causadoras pertencem aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, sendo as principais: *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) venezuelensis* e *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana* e em alguns casos *L. shawi*, *L. naiffi*, *L. lainsoni* and *L. lindenbergi* (MONGE-MAILLO, LÓPEZ-VÉLEZ, 2013). A figura 2 mostra a distribuição das espécies de *Leishmania* causadoras da leishmaniose tegumentar no Brasil (BRASIL, 2017).

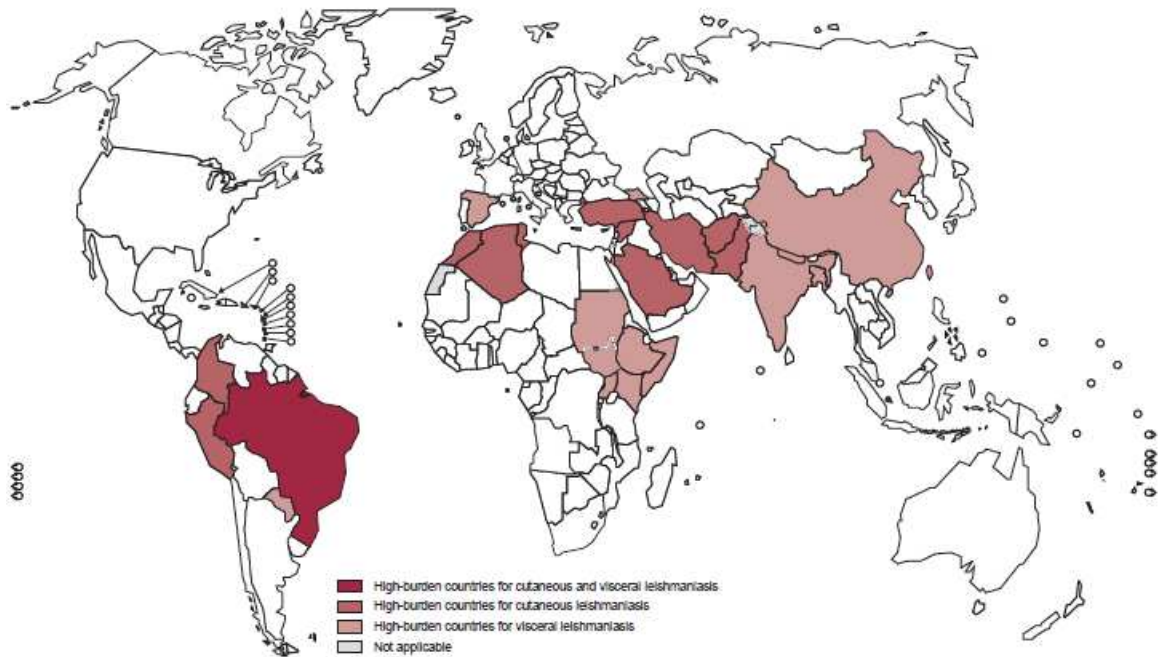


Figura 1: Distribuição geográfica das Leishmanioses cutânea e visceral no mundo. Fonte: De acordo com dados da OMS no ano de 2016.

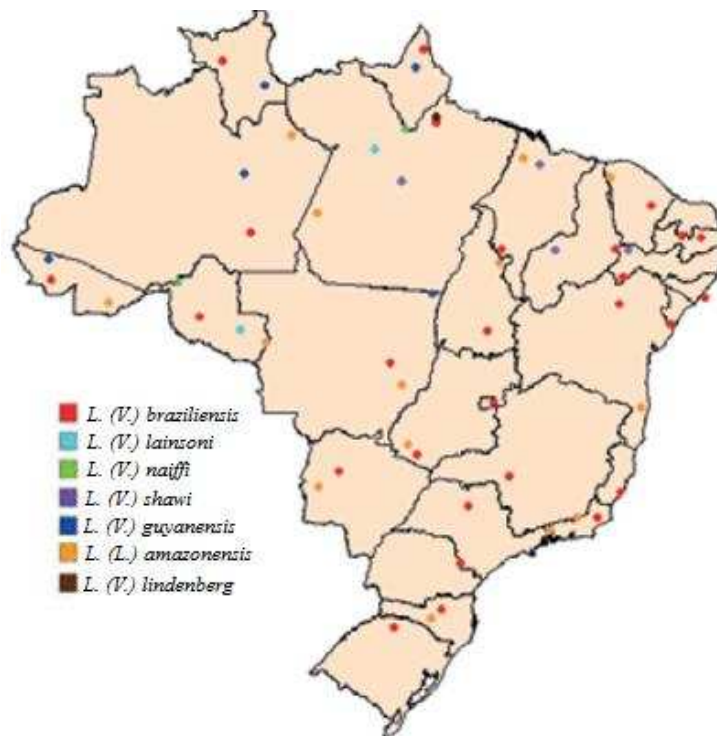


Figura 2: Distribuição das espécies de *Leishmania* causadoras da leishmaniose tegumentar no Brasil. Fonte: Adaptado de BRASIL, 2017, p.20.

L. (V.) braziliensis é o principal agente causador da leishmaniose cutânea e mucocutânea no Brasil, podendo também causar a forma disseminada. O parasito pode ser transmitido por várias espécies de vetores de acordo com a região geográfica: *Psychodopigus wellcomei* (Pará, sul da Amazônia, Serra do Baturité no Ceará), *Lutzomyia whitmani* em áreas de caatinga, cerrado e Mata Atlântica (Maranhão, Pernambuco, Bahia, Mato Grosso, Goiás e Minas Gerais) e *Lutzomyia Intermedia* (Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina) (MARZOCHI, M., MARZOCHI, K. 1994).

Dentre as medidas de controle da leishmaniose adotadas atualmente no Brasil está a eutanásia de cães domésticos infectados, pois os cães são altamente susceptíveis à infecção por *Leishmania*, tendo grande importância na disseminação da doença em humanos (BRASIL, 2006). Além disso, o tratamento de cães com medicamentos de uso humano não é permitido, uma vez que poderia ocasionar a resistência dos parasitos para as poucas drogas disponíveis para uso em humanos (BRASIL, 2017). Em 2016, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento juntamente com o Ministério da Saúde autorizaram o registro do produto Milteforan para o tratamento da leishmaniose visceral em cães. Essa decisão está de acordo com Portaria Interministerial nº1.426 de 11 de julho de 2008, que proíbe o tratamento de cães com medicamentos de uso em humanos, uma vez que o produto não é utilizado para o tratamento da Leishmaniose visceral humana no Brasil. Outras medidas incluem controle do vetor, medidas de educação e saúde e tratamento precoce dos casos humanos (BRASIL, 2006).

De forma geral as drogas usadas no tratamento dos casos humanos são compostos de antimônio pentavalente, miltefosina, anfotericina B, anfotericina B lipossomal e paramomicina, porém elas causam riscos à saúde dos pacientes devido à alta taxa de toxicidade (KUMAR, ENGWERDA, 2014). Especificamente no Brasil, os medicamentos usados no tratamento da leishmaniose visceral são antimoniatos de meglumina e anfotericina B. Para o tratamento da leishmaniose cutânea são utilizados antimoniatos de megluina, isetionato de pentamidina, anfotericina B e pentoxifilina (CONITEC, 2016). Estudos mostram que a miltefosina tem eficácia parecida com o antimoniatos de meglumina, porém com menores efeitos adversos, assim o CONITEC elaborou um relatório que recomenda a miltefosina para o tratamento da leishmaniose tegumentar (BRASIL, 2016).

2.2 Ciclo de Vida do Parasito

Protozoários do gênero *Leishmania* são parasitas digenéticos, que alternam entre as formas promastigota procíclica, promastigota metacíclica e amastigota em hospedeiros flebotomíneos e vertebrados. No Velho Mundo, os hospedeiros invertebrados são insetos do

gênero *Phlebotomus* e no Novo Mundo, *Lutzomyia*. Os hospedeiros vertebrados incluem cães, roedores, equinos e o homem (NAGLE et al., 2014; MARZOCHI, M., MARZOCHI, K. 1994).

O ciclo no hospedeiro invertebrado se inicia quando a fêmea do vetor ingere formas amastigotas, presentes em macrófagos infectados, durante o repasto sanguíneo. Os amastigotas são liberados e se transformam em formas promastigotas procíclicas no intestino, onde iniciam o processo de divisão celular e se convertem em formas promastigotas metacíclicas (SACKS, NOBEN-TRAUTH, 2002).

As formas metacíclicas infectantes, presentes na saliva do vetor, são inoculadas no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo e são fagocitadas por células fagocíticas do hospedeiro dentre elas macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos e fibroblastos. Esse processo é mediado pela interação com diversos receptores de superfície das células do hospedeiro como CR1, CR3, Fc- γ R (McCONVILLE, NADERER, 2011).

Dentro do fagolisossomo desenvolvem-se em formas aflagelares e arredondadas, denominadas amastigotas (PODINOVISKAIA, DESCOTEAUX, 2015).

A figura 3 mostra o ciclo de vida de *Leishmania major*, em que o parasito alterna entre as formas promastigota e amastigota no hospedeiro invertebrado e vertebrado, respectivamente.

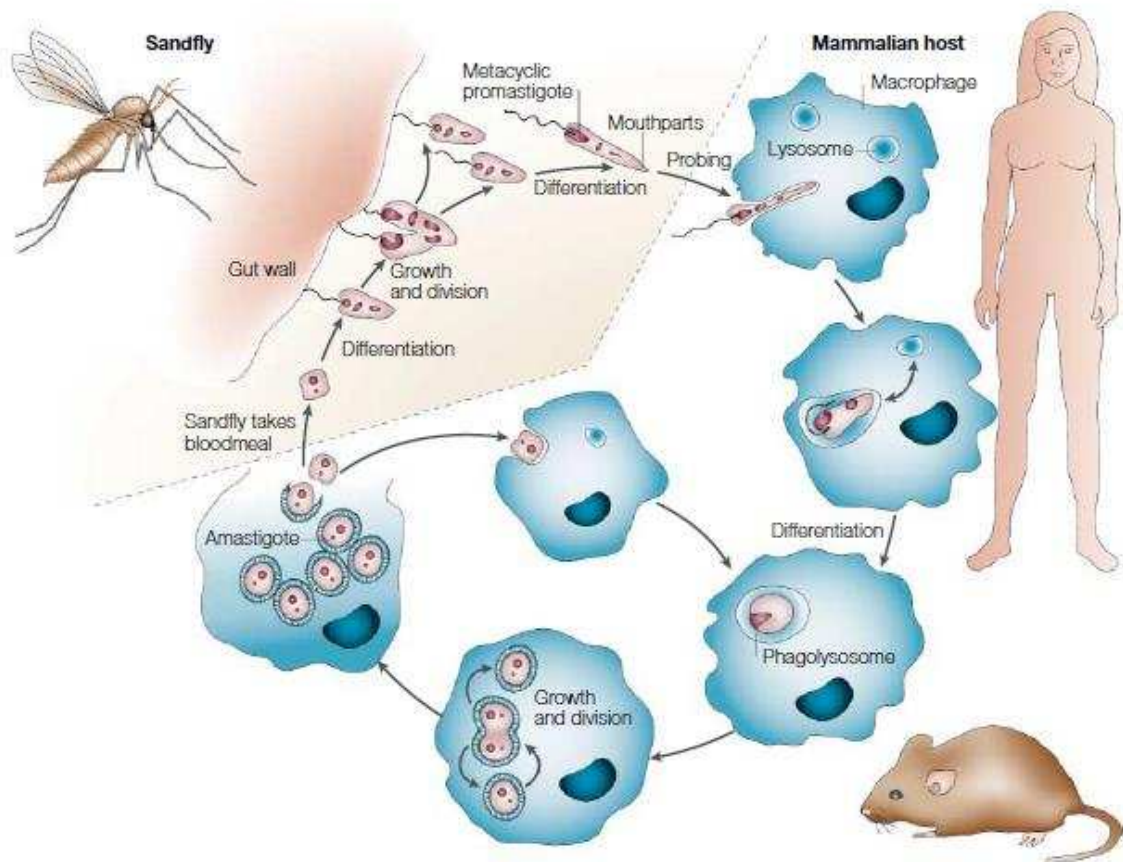


Figura 3: Ciclo de vida de *Leishmania major*. Os parasitos são transmitidos pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas, que injetam as formas promastigotas metacíclicas na pele. Essas formas são internalizadas por macrófagos e se desenvolvem em amastigotas. Durante o repasto sanguíneo, o inseto vetor ingere macrófagos infectados. Os parasitos se desenvolvem em formas promastigotas procíclicas as quais se dividem e aderem ao epitélio intestinal. Ao migrarem para região anterior do intestino, ocorre a diferenciação em promastigotas metacíclicas, que podem ser transmitidas novamente durante o repasto sanguíneo. Fonte: Sacks, Noben-Trauth, 2002, p.847, adaptado.

2.3 NTPDases de mamíferos e a sinalização purinérgica

O papel dos nucleotídeos extracelulares desencadeando respostas celulares têm sido alvo de estudos durante muitos anos. Nesse contexto, moléculas como ATP, adenosina, uridina adenosina tetrafosfato, diadenosina tetrafosfato e UDP agem como moléculas que promovem respostas celulares (PERSSON, 2012).

Os eventos são desencadeados quando nucleotídeos extracelulares se ligam à receptores purinérgicos e pirimidinérgicos. Esses receptores são divididos em dois tipos: P1 e P2. Os receptores do tipo P1 são ativados pela ligação de adenosina e são subdivididos em A1, A2A, A2B e A3. Todos são receptores acoplados à proteína G e atuam na ativação ou inibição da adenilato ciclase. Os receptores do tipo P2 são divididos em P2X e P2Y. Os receptores P2X se

subdividem em P2X₁₋₇ e são receptores do tipo canal que respondem primariamente ao ATP. Os receptores do tipo P2Y são do tipo serpentina e se ligam a uma variedade de nucleotídeos (BOURS et al., 2006; BURNSTOCK, 2007).

Diversos trabalhos mostram a importância de nucleotídeos extracelulares na promoção de resposta celulares. O papel do ATP como molécula sinalizadora foi demonstrado em diferentes locais como no tecido nervoso, bexiga e intestino (BURNSTOCK 1980, 2007). ATP e ADP pericelular estão relacionados à agregação de plaquetas em células endoteliais (MARCUS et al., 1997). O ATP induz linfócitos T a produzirem INF- δ e IL-2, que atuam na resposta inflamatória e proliferação celular, respectivamente (LANGSTON et al., 2003).

Tratando-se especificamente do sistema imune, moléculas como ATP e adenosina têm papel importante na modulação das respostas celulares. Essas moléculas podem contribuir para a regulação da função dos neutrófilos, bem como serem produzidas e liberadas por essas células durante a inflamação. Além disso, o ATP se liga a receptores P2X₇ atuando na regulação da expressão de E-selectinas, favorecendo a adesão de diversos tipos de células imunes. Nucleotídeos extracelulares também são capazes de controlar outros processos na resposta imune incluindo ativação, migração e produção de citocinas (BOURS et al., 2006).

No contexto da sinalização purinérgica é importante ressaltar a importância das NTPDases na hidrólise de nucleotídeos extracelulares, contribuindo para o controle desses processos.

NTPDases são enzimas pertencentes à superfamília de proteínas GDA1_CD39 (apirase, EC 3. 6. 1. 5), à família E-NTPD (ecto-apirase, NTPase, ou E-ATPase), são codificadas por genes ENTPD e estão presentes predominantemente em eucaritotos. Em mamíferos foram identificados 8 tipos, dos quais quatro são enzimas de superfície celular (NTPDase1, NTPDase2, NTPDase3 e NTPDase8) e quatro intracelulares (NTPDase4, NTPDase5, NTPDase6 e NTPDase7), porém formas secretadas de NTPDase 5 e 6 têm sido identificadas. Estão presentes em todos os tecidos, com expressão diferencial de isoformas entre eles. Células endoteliais e células do sistema imune como monócitos, células NK, células dendríticas e linfócitos T expressam NTPDase 1. Outras regiões expressam NTPDase 2, como observado em papilas gustativas, células salivares, epitélio estratificado gastrointestinal e superfície adventícia de vasos sanguíneos. Diferentemente do padrão restrito observado para a maioria das NTPDases, NTPDase 4 é expressa em todos os tecidos (SANSOM, 2012; ZIMMERMANN, 2000; ZIMMERMANN, ZEBISCH, STRÄTER, 2012).

As NTPDases compartilham 5 regiões conservadas de apirase (ACRs), cujas sequências possuem resíduos de aminoácidos essenciais à sua função. São capazes de hidrolisar nucleotídeos extracelulares tri e difosfatados em nucleosídeos monofosfatados, na presença de cátions divalentes, como cálcio e magnésio. Assim, possuem papel importante no organismo, regulando a concentração de nucleotídeos extracelulares, atuando na terminação da sinalização de nucleotídeos e na via de salvação de purinas (ZIMMERMANN, 2000; ZIMMERMANN, ZEBISCH, STRÄTER, 2012).

É importante, também, evidenciar a atuação conjunta de NTPDases com a 5' ectonucleotidase. NTPDases convertem nucleotídeos ATP e ADP em AMP, que serve como substrato para a geração de adenosina pela segunda enzima. A adenosina, por sua vez, pode se ligar à receptores A1, A2A, A2B e A3, gerando diversas respostas (ZIMMERMANN, ZEBISCH, STRÄTER, 2012). Em células T-reguladoras, as enzimas NTPDase 1/CD39 e 5' nucleotidase/CD73 têm um papel importante na geração de adenosina, que pode contribuir para a anergia característica dessas células, como também para supressão da resposta imune em outros conjuntos de linfócitos T (DEAGLIO et al., 2007). Em tripanosomatídeos a adenosina é incorporada na via de salvação de purinas, uma vez que esses parasitos não possuem a via *de novo* de purinas (HAMMOND et al., 1984).

Estruturalmente, as NTPDases se diferenciam com relação à topologia transmembrana e presença de peptídeo sinal, como mostrado na figura 4.

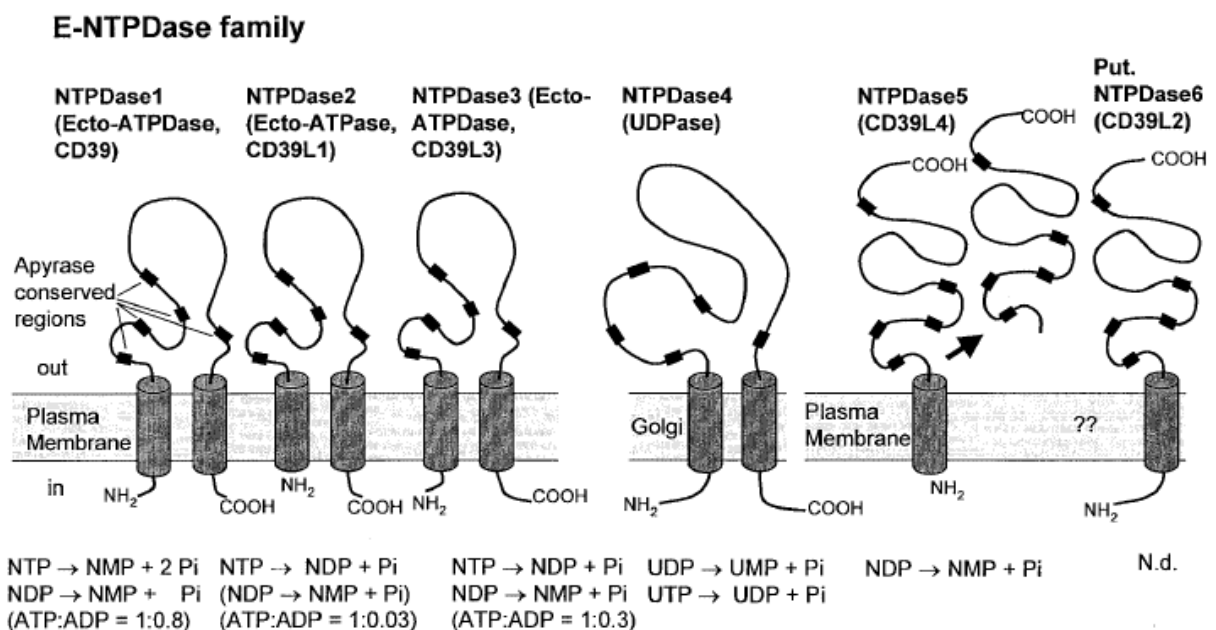


Figura 4: Topografia de membrana predita e propriedades catalíticas de membros da família E-NTPDase. As enzimas podem ocorrer como homomultímeros. NTPDase 5 ocorre como proteína solúvel

(seta). Apenas a estrutura primária da NTPDase 6 putativa é conhecida. Nomes previamente usados estão em parênteses (modificados de Zimmermann, 1996a). Fonte: Zimmermann, 2000, adaptado.

Dados disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB) fornecem informações sobre a estrutura dessas enzimas. A figura 5 mostra a estrutura da NTPDase 2 de *Rattus norvegicus* (RnNTPDase2-3cj) em complexo com cálcio e AMPPNP. A enzima possui 17 alfa-hélices e 17 folhas-beta divididas em dois domínios. O domínio I é menor e compreende os resíduos P36–S161 e K427–F461 e o domínio II é formado pelos resíduos G162–Q426. O sítio ativo se localiza entre os dois domínios e o substrato faz interação com porções de alfa-hélice e folhas-beta nessa região.

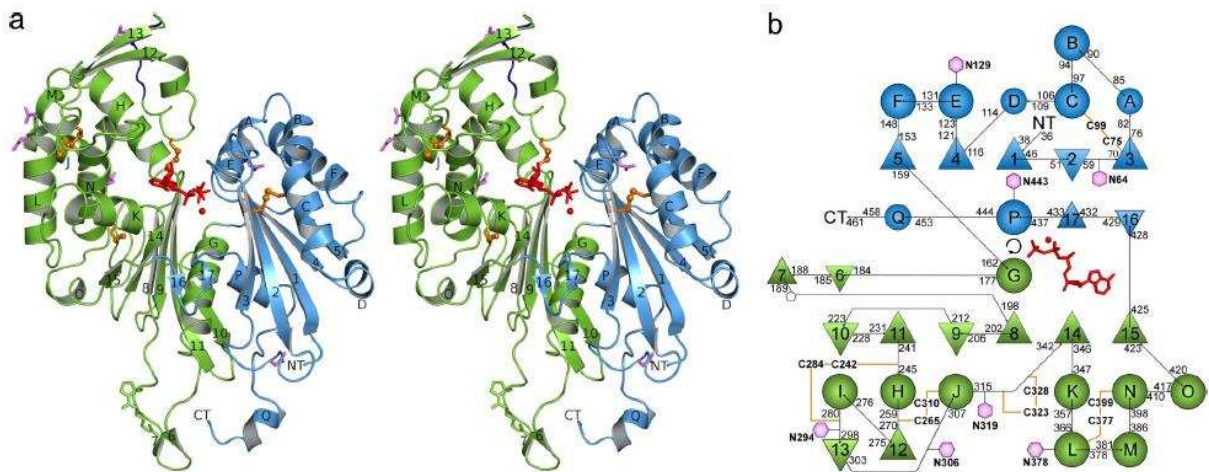


Figura 5: Dobramento do domínio extracelular da NTPDase2 de rato. (a) Diagrama em *cartoon* (Complexo Ca^{+2} x AMPPNP). Os domínios I e II estão coloridos em azul e verde, respectivamente. Um modelo conformacional para o *loop* desordenado (R289-S256) é indicado em azul escuro. Pontes dissulfeto são mostradas em laranja, resíduos Asn para possíveis sítios de glicosilação estão em púrpura e o peptídeo cis R191-P192 está em verde. Folhas-beta estão numeradas de 1 a 17. Segmentos helicoidais estão marcados de A a Q. A, D, e Q são hélices 3^{10} . A hélice Q é para esquerda. Ligantes estão em vermelho. (b) Diagrama de topologia usando o mesmo esquema de cores em a. Folhas-beta estão representadas por triângulos e hélices estão representadas por círculos. Possíveis sítios de N-glicosilação são mostrados como hexágonos e a prolina cis é mostrada como pentágono. O arranjo reflete a simetria interna como mostrado pela superposição dos dois domínios (e.g. α -hélices E e K podem ser superpostas, enquanto a folha- β 10 não possui um equivalente). Os dois ligantes marcam a posição relativa do sítio ativo entre os dois domínios. Fonte: Zebisch, Sträter, 2008, tradução nossa.

2.4 Atividade ectonucleotídica, NTPDases e suas funções na infecção de kinetoplastídeos

Considerando o papel das E-NTPDases na hidrólise de nucleotídeos extracelulares, as funções biológicas destes como sinalizadores celulares em mamíferos capazes de regular a resposta imune e a presença destas enzimas também em alguns patógenos, muitos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de elucidar a importância dessas enzimas em protozoários

patogênicos e nas doenças parasitárias correlacionadas. Neste trabalho, focaremos no estado da arte em relação aos kinetoplastídios como *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania*, causadores da doença de Chagas e Leishmanioses.

Dados disponibilizados no GenBank e diversos estudos mostram a presença de E-NTPDases em *T. cruzi* (NTPDase1) e *Leishmania* (NTPDase1 e NTPDase2) e que essas enzimas se assemelham mais às isoformas de NTPDases 5 e 6 de mamíferos, como mostrado na figura 6 (VASCONCELLOS et al., 2014; SANSOM et al., 2014).

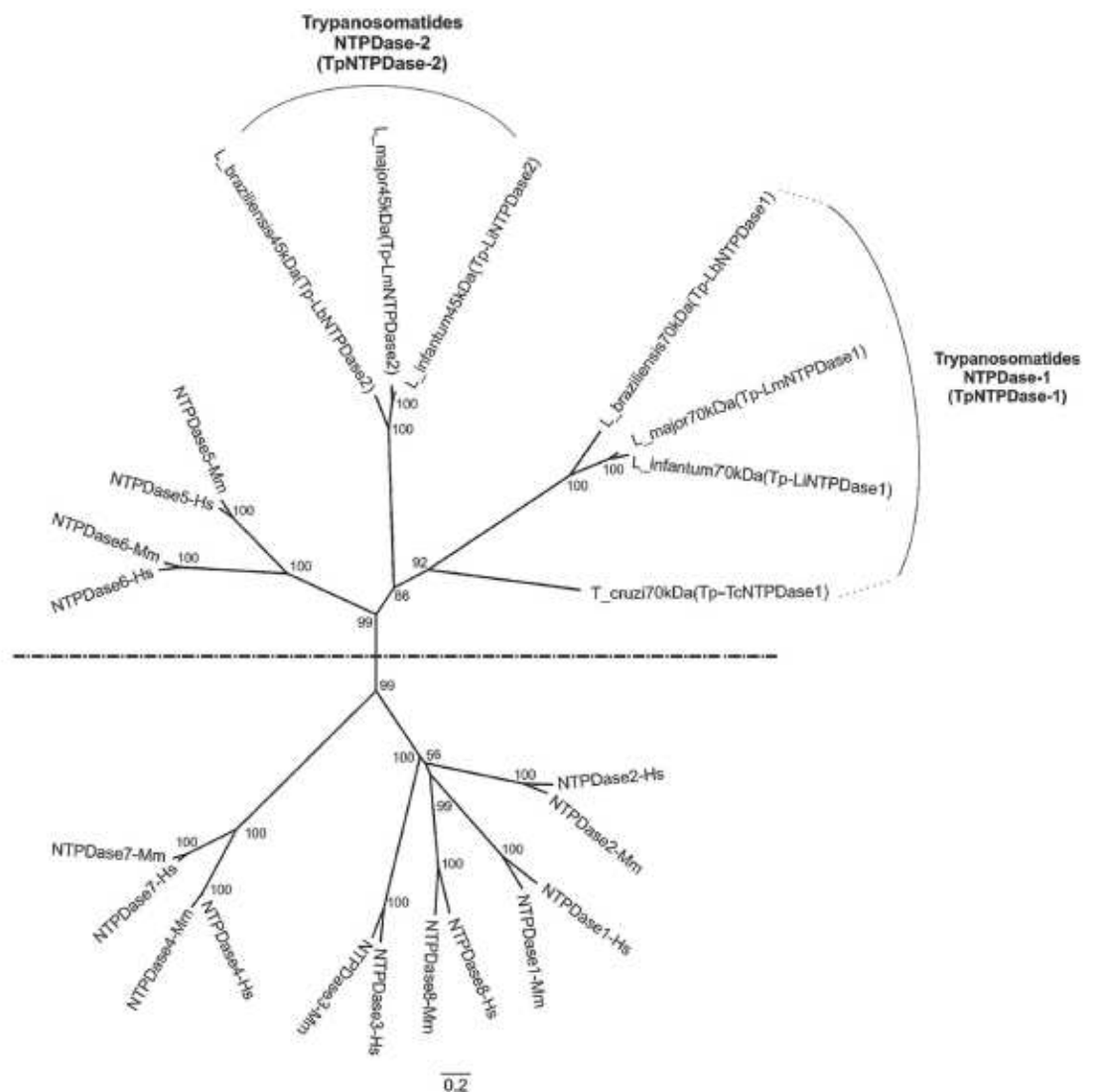


Figura 6: Árvore filogenética usando E-NTPDases de mamíferos e tripanosomatídeos (*Leishmania* e *T. cruzi*). As sequências das NTPDases foram alinhadas no programa CLC worbench e usadas para construir a árvore filogenética usando o método Neighbor Joining com análise *bootstrap* (números nas ramificações). *Mus musculus* (Mm); *Homo sapiens* (Hs). Tripanosomatídeos tem duas ENTPDases com exceção de *T. cruzi*, que tem

apenas uma ENTPDase no banco de dados. ENTPDases de tripanosomatídeos são mais similares às isoformas 5 e 6 de mamíferos e estão agrupadas no ramo superior da árvore. Fonte: Vasconcellos et al., 2014, adaptado.

Estudos com *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, mostram a presença de atividade ecto-ATPásica dependente de magnésio em parasitos vivos e que o uso de inibidores parciais desta ATPase inibiu fortemente a atividade ATPásica, a adesão e a internalização de ambas as formas evolutivas do parasito em macrófagos (BISAGGIO et al., 2003; MEYER-FERNANDES et al., 2004). Outros trabalhos mostram que a relação de hidrólise ATP/ADP é mais alta para as formas infectivas e parece ser importante para a internalização do parasito em células VERO (FIETTO et al., 2004; SANTOS et al., 2009).

Trabalho de 2009 mostra a correlação entre atividade ecto-ATPásica, infecciosidade e virulência em *T. cruzi*. Utilizando a proteína recombinante, previamente caracterizada, verificou que a taxa de inibição da enzima foi próxima ao observado nos ensaios em parasitos vivos, sugerindo que a redução na atividade por suramina esteja relacionada com a Tc-NTPDase1. E ainda, mostrou-se em ensaios *in vivo* em modelo camundongo, uma redução na virulência do parasito quando se utilizava parasitos pré-tratados com drogas que inibem a atividade da enzima (FIETTO et al., 2004; SANTOS et al., 2009). Posteriormente, Mariotini-Moura e colaboradores (2014) mostraram o papel da Tc-NTPDase1 na adesão do parasito em células VERO, com dependência parcial da atividade.

Na mesma linha de ensaios em relação ao possível papel destas enzimas na adesão celular, a enzima NTPDase2 recombinante de *L. infantum chagasi*, causadora de Leishmaniose Visceral, foi capaz de competir com o parasito pela ligação à célula hospedeira, evidenciando o papel dessa enzima na infecção. Além disso, o uso dessa enzima em experimentos com soros de animais com Leishmaniose Visceral Canina (LVC) mostrou alta sensibilidade e especificidade, mostrando seu potencial para diagnóstico (DE SOUZA et al., 2013; VASCONCELLOS et al., 2014).

Em *L. amazonensis*, espécie causadora da forma disseminada de Leishmaniose, foi caracterizada atividade ATPásica na superfície de parasitos vivos e demonstrado que parasitos virulentos hidrolisam mais ATP que avirulentos (BERREDO-PINHO et al., 2001). Trabalho posterior sugeriu a participação dessas enzimas na adesão do parasito à célula hospedeira (PINHEIRO et al., 2006).

Estudos com *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, identificaram maior taxa de hidrólise de AMP para *L. amazonensis*, podendo levar à maior produção de adenosina e consequente

aumento da resposta anti-inflamatória, o que favorece o surgimento de lesões mais graves na infecção por essa espécie (MAIOLI et al., 2004).

Posteriormente, Marques-da-Silva e colaboradores (2008) mostraram para *L. amazonensis* uma maior hidrólise de nucleotídeos extracelulares correlacionada com maior expressão de NTPDase-2 na membrana plasmática, quando comparado com *L. braziliensis* e *L. major*. Avaliaram também o papel da adenosina no estabelecimento da infecção em modelo murino por essas espécies e verificaram que a geração de adenosina está associada a um maior parasitismo, maior tamanho das lesões e atraso na resolução da lesão. Isso sugere que a hidrólise do ATP em adenosina causa um efeito imunomodulatório, favorecendo o estabelecimento da infecção.

Estudo recente demonstrou em *L. amazonensis*, que a atividade ectonucleotidásica está relacionada à modulação de citocinas inflamatórias, levando a uma redução da produção de óxido nítrico, permitindo a continuidade da infecção de macrófagos (GOMES et al., 2015).

Trabalho realizado com *L. braziliensis* mostrou que a isoforma menor por nós denominada NTPDase 2 (por eles denominada NTPDase 1) está localizada não apenas na superfície, mas em outras localizações na célula como núcleo, bolsa flagelar, flagelo, mitocôndria, kinetoplasto e núcleo em divisão. Esse trabalho também mostrou que anticorpos policlonais, produzidos contra epítopos conservados dentro do domínio B da proteína, foram capazes de reduzir a atividade da enzima e a proliferação *in vitro*, apontando sua importância para o crescimento do parasita (PORCINO et al., 2012).

Trabalho de 2014 identificou a localização subcelular e função das NTPDases de *L. major*, espécie causadora de Leishmaniose cutânea no Velho Mundo. O trabalho mostra que a isoforma menor, de cerca de 40 kDa, se localiza no aparelho de Golgi, tendo função relacionada a elongação do LPG, com papel nos estágios iniciais da infecção. Esse trabalho sugere que a enzima atue indiretamente em vias de glicosilação no Golgi levando, por exemplo, a síntese de LPG maiores. Os autores identificaram, também, a secreção da isoforma maior de cerca de 70 kDa, cujo gene deletado não impactou significativamente no curso da infecção em modelo murino, sugerindo que sua função é dispensável para a virulência nesta espécie (SANSOM et al., 2014). Salienta-se que, até então, nenhum trabalho de outros grupos havia demonstrado que, nesta espécie, as NTPDases poderiam ter algum papel importante na infecção, visto que os poucos dados obtidos mostravam muito baixa atividade ectonucleotidásica e nenhuma expressão de NTPDase na superfície deste parasito (MARQUES-DA-SILVA et al., 2008).

Por fim, foi verificado que diferentes cepas de *L. braziliensis*, com virulência diferenciada, apresentam atividade polar de hidrólise de nucleotídeos extracelulares. A alta capacidade de hidrólise de nucleotídeos extracelulares foi associada à maior carga parasitária, atraso na cura e maior tamanho das lesões, relacionando-se ao desenvolvimento da forma clínica (LEITE et al., 2012).

Todos estes dados levam à conclusão de que as NTPDases de *Leishmania* podem ter importância fundamental na infecção destes patógenos, porém esta importância e seus papéis variam entre as espécies e mesmo entre isolados da mesma espécie, sendo aparentemente dependente tanto dos níveis de atividade ecto-nucleotidásica quanto da expressão destas enzimas em cada um dos parasitos. A figura 7 mostra uma visão geral da sinalização purinérgica no sistema imune, mostrando o papel das NTPDases de *Leishmania* no processo de infecção.

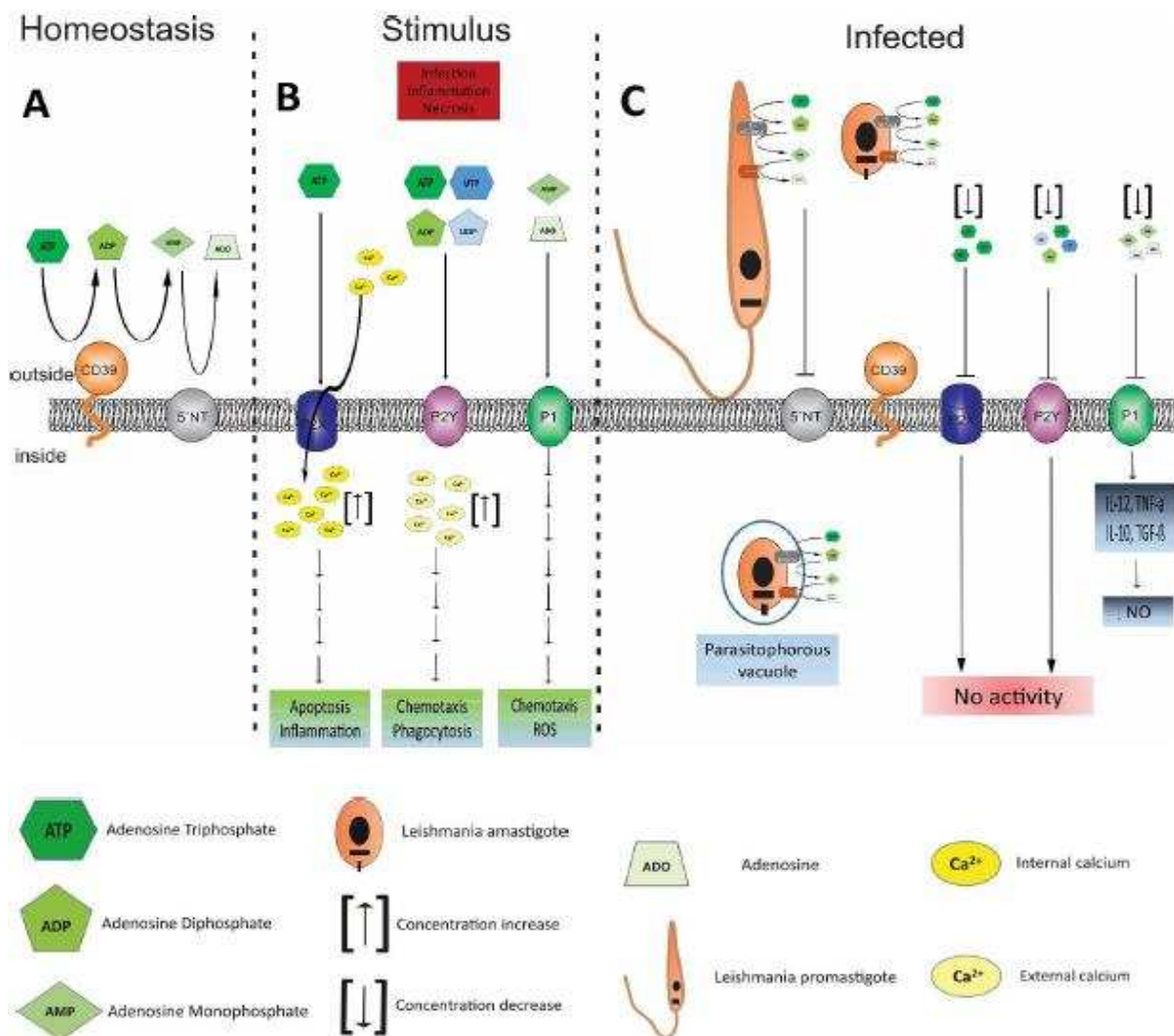


Figura 7: Visão geral da sinalização purinérgica no contexto do sistema imune, durante a homeostase, estímulo de dano ou infecção por *Leishmania*. 1A) Representação resumida da sinalização purinérgica sob condições de homeostase. Durante a homeostase ectonucleotidases do hospedeiro (e.g., ENTPDases

e 5'-NT) mantém baixas concentrações de mediadores da sinalização purinérgica (e.g., ATP, ADP, AMP e ADO) a fim de manter a homeostase dependente de ectonucleotidase do sistema imune inato. 1B) Resumo das mudanças conhecidas na sinalização purinérgica por estímulos de perigo não específicos (e.g., infecção, inflamação e necrose). Depois de um estímulo de perigo, a concentração de mediadores da sinalização purinérgica aumenta, levando à ativação de receptores purinérgicos, que podem culminar em aumento dos níveis de inflamação, apoptose, quimiotaxia, fagocitose e produção de ROS. 1C) Resumo das influências conhecidas na sinalização purinérgica durante a infecção por *Leishmania*. Durante a infecção por *Leishmania*, a ação de ectonucleotidasas do parasita (e.g., ENTPDases e 5'-NT) podem subverter o sistema imune do hospedeiro pela modulação da sinalização purinérgica, levando à inibição da ativação de P2 e induzindo a ativação de P1 pela adenosina. Adicionalmente, ENTPDases de *Leishmania* podem agir como moléculas de adesão para facilitar a infecção de células do parasito (e.g., macrófagos). Fonte: Pimentel et al., 2016, adaptado

2.5 Polimorfismos de base única

SNPs são variantes genéticas comuns, que ocorrem por mudança de um nucleotídeo, ocorrendo com frequência igual ou maior que 1% em uma população. Podem possuir papel importante na compreensão de como variantes genéticas comuns estão relacionadas à diferentes fatores como por exemplo a susceptibilidade a doenças. (CARGILL et al., 1999).

Os SNPs são classificados em categorias de I a VI, sendo os presentes em regiões codificadoras (cSNPs) inclusos nas classes de I a III. Destes, os que levam a alterações não conservativas pertencem ao tipo I, substituições conservativas de aminoácidos ao tipo II, ou substituições sinônimas ao tipo III. Os SNPs de regiões não-codificantes são classificados em região 5'UTR (tipo IV), 3' UTR (tipo V) e outros SNPs não-codificantes (tipo VI) (RISCH et al., 2000).

Como a alteração de uma base pode levar à mudança do aminoácido correspondente, a presença de SNPs pode ser responsável por alteração funcional da proteína em questão. Isso foi mostrado para o receptor TLR3, no qual polimorfismos presentes em sua sequência têm sido associados à redução da atividade (RANJITH-KUMAR et al., 2007).

Polimorfismos também foram usados em estudo de evolução de *Plasmodium falciparum*, identificando uma ancestralidade mais antiga do que se propunha. Isso se correlaciona à diversidade genética observada para esses parasitos e à alta capacidade de evasão do sistema imune (MU et al., 2002).

Estudo realizado na Turquia revela a presença de polimorfismos no gene da enzima N-acetilglicosamina-1-fosfato transferase (NAGT) em diferentes isolados de *L. major*. O isolado II, que possui 4 mutações pontuais, está relacionado tanto à leishmaniose cutânea como visceral, o que não é comum em infecções por *L. major*. Os autores propõem que esse genótipo pode

representar uma forma evolucionária única na espécie, com tropismo cutâneo-visceral (AKMAN et. al., 2000).

Trabalho recente sugere que diferentes cepas de *L. braziliensis* estejam propensas a causar diferentes tipos de Leishmaniose tegumentar americana (LTA) e associa a presença de SNPs à manifestação da forma disseminada da doença na Bahia (QUEIROZ et al., 2012).

Leite e colaboradores (2012) estudaram diferentes isolados de *L. braziliensis* e relacionaram a alta capacidade de hidrólise de nucleotídeos extracelulares à maior carga parasitária, atraso na cura, maior tamanho das lesões e maior capacidade de evadir da resposta imune. Interessantemente, isolados com maior hidrólise de nucleotídeos de adenina foram associados à forma mucosa/mucocutânea. SNPs foram encontrados na sequência da NTPDase 2, enzima que hidrolisa nucleotídeos extracelulares, porém a influência desses polimorfismos na diferença de hidrólise e desenvolvimento da forma clínica não foi observada. Dentre as cepas estudadas nesse trabalho estão as cepas ET e NSL, que provém de isolados de biópsias de lesões humanos confirmados com leishmaniose tegumentar no Centro de Referência e Treinamento em leishmanioses do Centro de pesquisa René Rachou. Em seguida, elas foram passadas para o professor Dr. Luís Carlos Crocco Afonso da Universidade Federal de Ouro Preto, onde foram avaliadas quanto à atividade ectonucleotidásica e infecciosidade em modelo murino (SANTOS, 2012).

Foi observado que as cepas ET e NSL diferem quanto à infecciosidade e virulência e que isso se correlaciona com atividade polar de hidrólise de nucleotídeos extracelulares. Além disso, foi observada a presença de polimorfismos no gene da NTPDase 2, enzima que participa da hidrólise de nucleotídeos extracelulares. Assim nosso grupo de pesquisa se propôs a avaliar mais especificamente a relação desses polimorfismos com a enzima NTPDase 2 dessas duas cepas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Clonagem, avaliação de SNPs e expressão heteróloga da proteína NTPDase 2, buscando elucidar diferenças moleculares e bioquímicas relativas a essa enzima nas cepas ET e NSL de *L. (Viannia) braziliensis*.

3.2. Objetivos específicos

- Analisar a presença de *Single-nucleotide polymorphisms* (SNPs) na sequência do ectodomínio da NTPDase 2, em clones no vetor pJET1.2 para ambas as cepas.
- Analisar a presença de domínio transmembrana, peptídeo sinal e localização celular por bioinformática.
- Obter modelo 3D para a proteína de ambas as cepas para identificação da localização das mutações na estrutura tridimensional da enzima.
- A partir do modelo 3D prever os aminoácidos importantes para a atividade da enzima.
- Clonar em vetor de expressão a região que codifica para o ectodomínio da NTPDase 2 de ambas as cepas.
- Expressar as enzimas recombinantes de ambas as cepas em sistema bacteriano.
- Purificar as enzimas por cromatografia de afinidade.

4. METODOLOGIA

Análises de Bioinformática

4.1. Extração de DNA plasmidial, sequenciamento e análise de polimorfismos.

Durante a pesquisa realizada na graduação, como parte das exigências do Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica, Convênio PIBIC/CNPq/UFV, nós obtivemos clones em vetor bacteriano (pJET1.2/blunt), referentes ao ectodomínio da NTPDase 2 das cepas ET e NSL de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Nesse trabalho obtivemos 5 clones ET e 6 clones NSL, confirmados por PCR e digestão com as enzimas *Hind III* e *Nde I*, incorporadas nas sequências dos *primers* utilizados (Tabela 1).

Tabela 1: *Primers* utilizados na clonagem da região codificante do ectodomínio da enzima NTPDase 2 no vetor pJET1.2/blunt.

<i>Foward Primer</i>	5'ata catat gatgtctccttgaactcg 3'	TM: 69 °C	28 bases
<i>Reverse Primer</i>	5' tata aagctt tccatcttgagcacgaag 3'	TM: 67 °C	26 bases.

Na presente pesquisa, procedemos à extração dos DNAs plasmidiais e as amostras foram sequenciadas no Centro de Pesquisa René Rachou em Belo Horizonte, MG.

A extração de DNA plasmidial foi feita utilizando o Kit ilustraTM plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare) de acordo com o manual do fabricante, com algumas modificações para aumentar o rendimento do produto, a fim de obter a concentração necessária (150 ng/μl 300 ng/μl) para o sequenciamento. Inicialmente, uma alíquota da cultura armazenada à - 80 °C foi inoculada em 15 mL meio Luria Bertani líquido, com ampicilina na concentração de 50 mg/mL e crescida a 37 °C, 180 rpm, *overnight*. Durante os passos iniciais do protocolo do Kit, os volumes das soluções foram ajustados para o volume de cultura utilizado. Os sobrenadantes correspondentes ao mesmo clone, foram adicionados a apenas uma coluna e eluídos em três passos consecutivos de 25 μl de água milliQ estéril e armazenados a -20 °C.

As amostras obtidas foram sequenciadas e posteriormente analisadas para confirmação da clonagem e análise da presença de polimorfismos de base única (*Single-nucleotide polymorphisms*-SNPs). Para isso, utilizamos o programa Geneius 6.0.6, no qual os resultados foram alinhados com a sequência da ATP Difosfohidrolase2 de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 (LbrM.15.0030), disponível no NCBI.

4.2. Predição de localização celular.

As predições de localização celular foram feitas nos programas Signal P 4.1 Server e Target P 1.1 Server, respetivamente (EMANUELSSON et al., 2007).

4.3. Predição de ponto isoelétrico e massa molecular.

O ponto isoelétrico e a massa molecular teóricos foram obtidos utilizando a ferramenta *Compute PI/MW* disponível através do *ExpPASy World Wide Web server* (GASTEIGER et al., 2005).

4.4. Construção do modelo tridimensional

A estrutura 3D das proteínas foi obtida por Modelagem Molecular no programa I-TASSER, que utiliza estruturas de proteínas cristalizadas depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) (ROY, KUCUKURAL, ZHANG, 2010).

Os modelos com maior C-score foram submetidos à minimização de energia pelo programa Yasara e validados nos programas ProSA, RAMPAGE, Verify 3D e Errat (BOWIE, LÜTHY, EISENBERG, 1991; COLOVOS, YEATES, 1993; KRIEGER et al., 2009; WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J., 2007).

Utilizando o programa Pymol v.1.7.4.5, o modelo foi alinhado com a estrutura da RnNTPDase2 de *Rattus norvegicus* (3cj1), *template* de maior identidade e significância para identificação da posição das mutações na estrutura tridimensional da enzima.

Clonagem e expressão heteróloga

4.5. Clonagem no vetor de expressão pET21b.

Como exposto anteriormente (secção 4.1), dos clones ET e NSL-pJET obtidos, um de cada cepa foi escolhido, aleatoriamente, para o início dos experimentos de clonagem no vetor de expressão pET21b. A escolha aleatória ocorreu porque não havíamos conseguido obter amostras de DNA plasmidial na concentração necessária para o sequenciamento, assim os experimentos de clonagem foram realizados simultaneamente a esse processo.

As extrações de DNA plasmidial dos clones escolhidos e do vetor pET21b foram feitas utilizando o Kit ilustraTM plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare) de acordo com o manual do fabricante.

O vetor pET21b utilizado continha a sequência do ectodomínio NTPDase1 (1770 bp) de *T. cruzi* (MARIOTINI-MOURA, 2010). Essa estratégia foi utilizada para garantir que a

“banda” correspondente à digestão do vetor fosse corretamente selecionada, uma vez que a distância entre os sítios de restrição escolhidos é de apenas 61 pb, liberando um segmento de DNA pequeno, não visualizado no gel, cuja remoção não promove diferença clara no tamanho do vetor. Como o clone cedido havia conservação dos sítios de restrição das enzimas *Nde I* e *Hind III* antes e depois do inserto, a sua digestão gera um padrão de bandas no gel, que permite a determinação clara do fragmento do pET21b de interesse.

A figura 8 mostra o mapa do sistema pET-21a-d (+) utilizado. O pET21b difere do pET21a apenas pela remoção de 1 pb antes do sítio de *BamH I*.

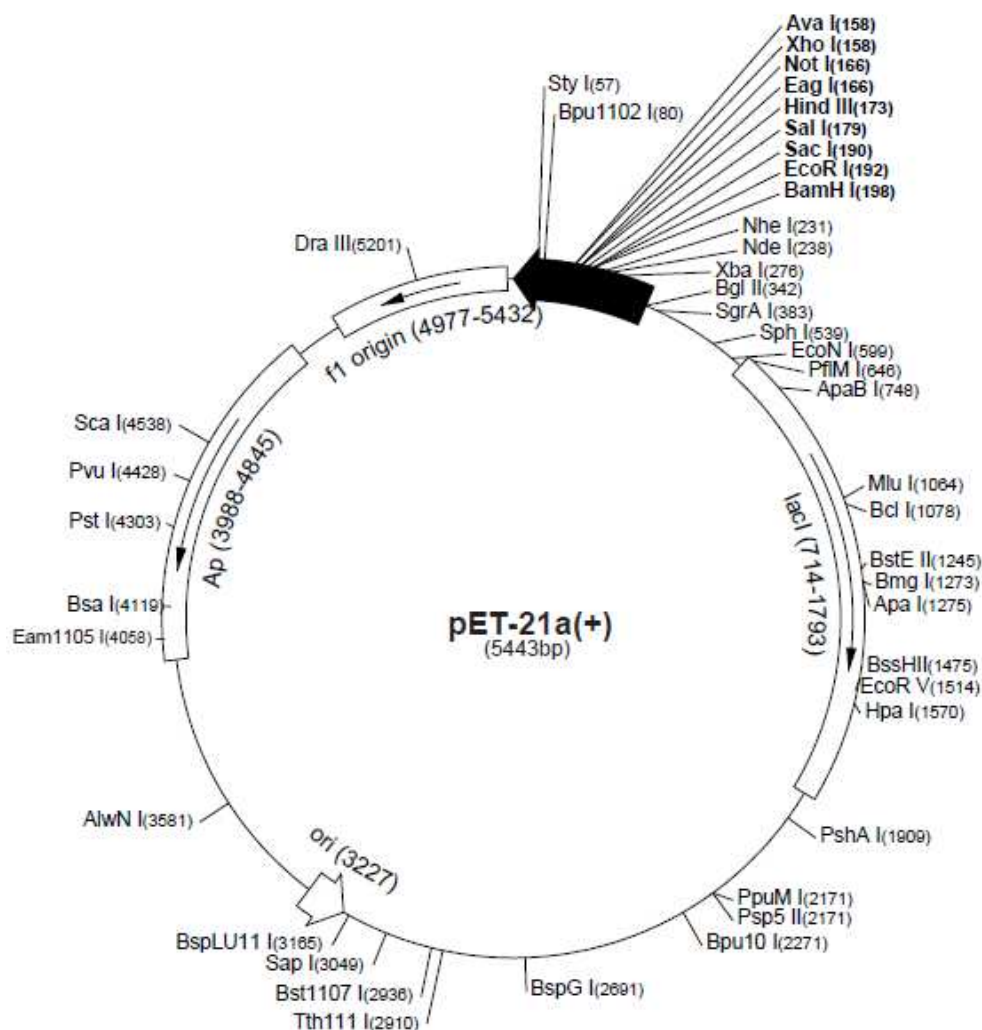


Figura 8: Mapa do sistema pET-21a-d (+) (NOVAGEN). Os vetores desse sistema possuem uma Tag T7 N-terminal e uma sequência HisTag C-terminal. Esses vetores diferem da série pET-24 a-d (+) apenas pela marca de seleção (ampicilina vs kanamicina).

Para as reações de digestão, inicialmente o tampão, água e o DNA (inserto ou vetor) foram adicionados e ambientados à 37 °C por 10 min. Em seguida, foram adicionadas as

enzimas e a digestão ocorreu por 20 min à 37 °C. Após esse tempo foi adicionada fosfatase alcalina, apenas na reação contendo o vetor pET21b para evitar a recircularização. As enzimas foram inativadas à 80 °C por 10 min e as reações acondicionadas à 4 °C.

As reações foram feitas no termociclador (Veriti Thermo Cycler- Applied Biosystems), para garantir o controle das temperaturas e tempo de reação e estão sumarizadas nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Reação de digestão das construções ET e NSL-pJET e do vetor pET21b.

Componentes	Volume
Fast Digest Green Buffer 10x (Thermo Scientific)	2 µL
ET/pJET ou NSL/pJET ou pET21b*	1 µL
Nuclease-Free Water	14 µL
Fast Digest <i>Hind III</i> (Thermo Scientific- #FD0504)	1,5 µL
Fast Digest <i>Nde I</i> (Thermo Scientific- #FD0583)	1,5 µL
<i>FastAP</i> (Thermo Scientific- #EF0651)**	1 µL

*As reações foram feitas separadamente.

** FastAP (fosfatase alcalina) foi adicionada somente à reação do vetor para evitar a circularização.

Controle da reação: Tampão-2 µL; Água-17 µL; DNA-1 µL.

Tabela 3: Estágios de digestão utilizados no termociclador.

Estágio	Temperatura	Tempo
Ambientação	37 °C	10 min
Digestão	37 °C	20 min
Desfosforilação *	37 °C	20 min
Inativação	80 °C	10 min
Acondicionamento	4 °C	∞

*Fosfatase alcalina foi adicionada à reação contendo o vetor pET21b previamente digerido.

Os produtos de digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1 %, a partir do qual os fragmentos de interesse do vetor (4,5 pb) e dos insertos (1158 pb) foram purificados utilizando o Kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) de acordo com o manual do fabricante, exceto pelas eluições que foram feitas em três passos de 20 µL, para evitar a diluição do material purificado.

Os insertos e o vetor purificados foram utilizados na reação de ligação, como mostra a tabela 4. Todos os componentes foram adicionados e a reação ocorreu à 16 °C *overnight*.

Tabela 4: Reação de ligação.

Componentes	Volume
Rapid Ligation Buffer 5x (Thermo Scientific- #K1423)	4 µL
pET21b	1 µL
Inserto *	3 µL
Nuclease-Free Water	10 µL
25 mM ATP	1 µL
T4 DNA Ligase (Thermo Scientific- #K1423)	1 µL

* O inserto corresponde à sequência do ectodomínio da enzima NTPDase 2 clonado no vetor pJET e obtido por digestão. As reações usando o inserto de cada cepa foram feitas separadamente.

4.6. Preparação de células *Escherichia coli* DH5-Alpha competentes.

O pré-inóculo foi crescido em meio LB líquido, sem antibiótico, a 37 °C, 180 rpm por 16 h. No dia seguinte uma diluição 1:100 da cultura foi feita em LB líquido, sem antibiótico e crescida a 37 °C, 200 rpm até DO₆₀₀ entre 0,4 e 0,5. A cultura foi transferida pra falcons e centrifugada a 3000 g por 10 min à 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* foram ressuspensos em 1/5 do volume inicial em tampão CaCl₂ 0,1 M estéril, gelado. Foi feita uma nova centrifugação e os sobrenadantes foram descartados. Os *pellets* foram ressuspensos em 1/5 do volume inicial em tampão CaCl₂ 0,1 M estéril, gelado e deixados no gelo por 30 min. Em seguida foram centrifugados à 3000 g por 5 min à 4 °C, descartados os sobrenadantes e os *pellets* ressuspensos cuidadosamente em 1/40 do volume inicial com tampão CaCl₂ 0,1 M com glicerol 15 % estéril, gelado. Alíquotas de 100 µL foram feitas e estocadas à -80 °C.

4.7. Transformação.

Metade do volume da reação de ligação foi adicionada à 100 µL de *E. coli* DH5-Alpha competentes. Para o controle positivo 1 µL do vetor pET21b fechado e vazio foi adicionado à 100 µL de células competentes e o controle negativo correspondeu apenas às células competentes. Os tubos foram nomeados como ligação, C+ (controle positivo) e C- (controle negativo), homogeneizados e deixados no gelo por 30 min. Em seguida, as amostras foram submetidas a choque térmico à 42 °C por 45 s e deixados no gelo por 2 min. Aos tubos foram adicionados 900 µL de LB líquido e as amostras foram crescidas à 37 °C, sob rotação de 180

rpm por 45 min. Posteriormente as amostras foram centrifugadas à 14.000 g por 1 min, à temperatura de 25 °C e 900 µL do sobrenadante foram descartados. Os 100 µL de sobrenadante restantes foram usados para ressuspender o *pellet*. As ressuspensões correspondentes a cada amostra (ligação; C+; C-) foram plaqueadas em meio LB sólido com ampicilina na concentração final de 50 mg/mL. As colônias obtidas em placa foram inoculadas na reação de PCR para confirmação por PCR de colônia e em LB líquido com ampicilina na concentração final 50 mg/mL, crescidas à 37 °C, 180 rpm, *overnight* e armazenadas com glicerol 20 % à - 80 °C.

4.8. Confirmação por PCR, digestão e sequenciamento.

As colônias obtidas foram inoculadas nas reações de PCR previamente preparadas, como mostrado na tabela 5, utilizando os *primers* do vetor segundo manual do fabricante. À reação controle foi adicionado 1 µL da construção pET21b-NTPDase1 de *T. cruzi* (tabela 6). O controle negativo consistiu de todos os reagentes com exceção do DNA.

Tabela 5: Reação de PCR de colônia.

Componentes	Volume
GoTaq® Green Master Mix (Promega)	10 µL
T7 Forward Primer	1 µL
T7 Reverse Primer	1 µL
Nuclease-Free Water	8 µL

Tabela 6: Reação de PCR controle positivo.

Componentes	Volume
GoTaq® Green Master Mix (Promega)	10 µL
T7 Forward Primer	1 µL
T7 Reverse Primer	1 µL
Nuclease-Free Water	7 µL
pET21b-NTPDase1	1 µL

A Tabela 7 mostra os estágios da PCR de colônia.

Tabela 7: Estágios da PCR de colônia.

Estagio 1 (1 ciclo)	Estagio 2 (35 ciclos)			Estagio 3 (1 ciclo)	Estagio 4 (1 ciclo)
95 °C	95 °C	60 °C	72 °C	72 °C	4 °C
11 min	2 min	30 s	2:30 min	7 min	∞

Após a amplificação as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%.

A extração de DNA plasmidial dos transformantes obtidos e a reação de digestão foi realizada como descrito previamente. As amostras foram enviadas para o sequenciamento no Centro de Pesquisa René Rachou em Belo Horizonte, MG.

As sequências foram analisadas quanto à similaridade com sequências disponibilizadas no NCBI, utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment* (BLAST) e no Programa Geneious 6.0.6 para verificação da integridade das sequências, *frame*, tradução e análise de possíveis polimorfismos.

4.9. Preparação de células *Escherichia coli* BL21 (DE3) e pRARE competentes.

Células *Escherichia coli* BL21 (DE3) e pRARE competentes foram preparadas como descrito para DH5-Alpha na seção 4.6.

4.10. Extração de DNA plasmidial e Transformação.

A extração de DNA plasmidial das construções ET-pET21b e NSL-pET21b foram feitas utilizando o kit ilustraTM plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare), de acordo com o manual do fabricante e utilizadas para transformar células *Escherichia coli* BL21 (DE3) e pRARE competentes para avaliação da expressão.

4.11. Expressão heteróloga- Testes de indução.

Inicialmente foi feita uma indução em *E. coli* pRARE com 0,5 mM IPTG nos tempos de 1 h a 6 h e 21 h. O pré-inóculo foi crescido em LB líquido com ampicilina na concentração de 50 mg/mL, 37 °C, 180 rpm *overnight*. No dia seguinte 2 % do pré- inóculo foram inoculados em 100 mL de meio LB líquido, sem ampicilina e a cultura foi crescida 37 °C, 180 rpm até a DO₆₀₀ entre 0,6 e 0,8. Um volume de 10 mL foi coletado correspondendo ao tempo de 0 h de indução, centrifugado à 3000 g, por 5 min, descartado o sobrenadante e armazenado à -80 °C.

O indutor foi adicionado na concentração final de 0,5 mM e a indução foi feita à 37 °C, 180 rpm de 1h à 21 h. Alíquotas de 10 mL foram coletadas em 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h e 21h de indução, centrifugadas e armazenadas da mesma forma. Os pellets correspondentes a cada hora de indução foram processados (como descrito na secção 4.12) e armazenados para análises de SDS-PAGE e Western Blotting. O melhor tempo foi escolhido para a padronização da expressão, na qual foi variada a concentração do indutor e a cepa de expressão.

As induções em *E. coli* BL21 (DE3) foram feitas por 2 h, utilizando as seguintes concentrações de indutor: 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM, 0,8 mM e 1 mM. As induções em pRARE foram feitas por 2 h, utilizando as seguintes concentrações de indutor: 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM, 0,8 mM. Para todas as induções, foi feita a transformação prévia da construção ET-pET21b na cepa de expressão, metade do volume crescido (500 µL) foi adicionado em 5 mL meio LB líquido, com ampicilina, para crescimento do pré-inóculo e a outra metade foi centrifugada à 14.000 g por 1 min, descartados 400 µL do sobrenadante e o pellet foi ressuspendido nos 100 µL restantes, plaqueado em LB sólido, com ampicilina na concentração final de 50 mg/mL, para confirmação da transformação.

No dia seguinte, foram adicionados 2 % de pré-inóculo em 100 mL de LB líquido, sem ampicilina e a cultura foi crescida até DO₆₀₀ entre 0,6 e 0,8. Um volume de 50 mL foi coletado correspondente ao tempo 0 h, centrifugado a 3000 g e armazenado como previamente descrito. O indutor foi adicionado no volume restante, calculando-se as concentrações finais de acordo com as concentrações de IPTG estabelecidas. A indução foi feita por 2 h à 37 °C e 180 rpm. Um volume de 50 mL foi coletado correspondendo ao tempo de 2 h de indução, centrifugado e armazenado à -80 °C. Os pellets correspondentes à 0h e 2 h de indução, para cada concentração de indutor e cepa de expressão foram processados (como descrito da secção 4.12) e analisados por SDS-PAGE e Western Blotting.

4.12. Pré-Purificação

Os pellets obtidos nas induções descritas na secção anterior foram lisados, lavados e os corpos de inclusão foram solubilizados num processo que denominamos “pré-purificação” como segue. Os pellets foram ressuspendidos em “Tampão de Lise” (anexo) e em seguida foram adicionados os inibidores de protease aprotinina, leupetina e pepstatina nas concentrações finais de 2 µg/mL, 2µg/mL e 1µg/mL, respectivamente. Ao homogeneizado foi adicionada lisozima na concentração final de 1 mg/mL e as amostras foram homogeneizadas e deixadas no gelo por 30 min. Em seguida, foram sonicadas 6 vezes, com amplitude de 20 por 1 min para rompimento

das células. As amostras foram centrifugadas à 12.000 g por 15 min e os sobrenadantes foram nomeados como “Lise” e armazenados à -20 °C. Os pellets foram ressuspensos em 1 mL de “Tampão de Lavagem” (anexo) centrifugado à 12.000 g por 15 min e os sobrenadantes foram descartados. A lavagem foi realizada por mais uma vez da mesma forma descrita. Por fim, o pellet foi ressuspensionado em 500 µL (ou mais caso necessário) de “Tampão de Solubilização” (anexo), aquecido à 55 °C por 20 min, centrifugado à 14.000 g por 15 min e o sobrenadante foi nomeado como “Solubilização” e armazenado à -20 °C.

As “lises” e as “solubilizações” dosadas (secção 4.13), e analisadas por SDS-PAGE e Western Blotting para avaliação da presença da proteína nas frações solúvel ou nos corpos de inclusão.

4.13. Dosagem de proteínas.

A concentração das amostras pré-purificadas foi avaliada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando microplaca de 96 poços. Para curva padrão foi utilizada soro albumina bovina (BSA).

4.14. SDS-PAGE e Western Blotting.

As amostras foram dosadas para aplicação de 30 µg ou 40 µg de proteína total em cada canaleta, com exceção de alguns casos, nos quais o volume para tais concentrações não caberia na canaleta do gel. A eletroforese foi feita em gel de poliacrilamida 10 % a 120 V e o gel foi corado em Comassie. Cada gel possuiu uma réplica, que foi utilizada para o Western Blotting.

A transferência para o Western Blotting ocorreu à 250 mA, 4 °C, por 2 h e as membranas de nitrocelulose foram lavadas com água destilada e coradas com Ponceau, para verificação da transferência. Posteriormente, foram lavadas com água destilada para retirada do Ponceau, e incubadas com solução de bloqueio (leite em pó diluído em tampão PBS-t 1x), *over night*, sob agitação. No dia seguinte, as membranas nitrocelulose foram lavadas com PBS-t 1X por 5 min sob agitação, passo que foi repetido por mais 2 vezes. Em seguida, as membranas foram incubadas com soro policlonal anti-NTPDase 2 de *L. infantum chagasi* (VASCONCELLOS et al., 2014), diluído 1:2000 em tampão PBS-t 1x e incubadas por 2 h, sob agitação. Após esse tempo, as membranas foram lavadas com tampão PBS-t 1x, como descrito anteriormente, e incubadas por 2 h, com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho acoplado à peroxidase (Sigma-A0545), diluído 1:15.000 em tampão PBS-t 1x. Em seguida, as membranas foram

lavadas com tampão PBS-t 1x como descrito e a revelação foi realizada no escuro, utilizando o reagente DAB (Sigma), água oxigenada diluídos em tampão Tris 50 mM pH 7,6.

4.15. Purificação da ET/NSL-NTPDase2 por *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC).

A amostra utilizada na purificação corresponde a indução em *E. coli* pRARE com 0,6 mM de IPTG por 2 h. O processamento ocorreu como descrito na secção 4.12 e a solubilização dos corpos de inclusão foi filtrada em filtro 0,45 µm e utilizada na purificação. O etanol 20 %, a água e os tampões foram previamente filtrados e sonificados antes de sua utilização no sistema. A etapa de purificação foi feita com 100 % de tampão B e utilizou o sistema FPLC-AKTA, a coluna de afinidade com níquel e os tampões A pH 8,3 para injeção da amostra e B pH 8,3 para eluição, usando fluxo de 5 mL/min. As alíquotas coletadas foram analisadas por SDS-PAGE e Western Blotting.

4.16. SDS-PAGE e Western Blotting.

A eletroforese foi feita em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10 % à 120 V e o gel foi corado em Comassie. As réplicas, foram utilizadas para Western Blotting em sistema semi-seco. A transferência ocorreu à 400 mA por 1 h e em seguida as membranas foram coradas com Ponceau para verificação da transferência, lavadas com água destilada e incubadas com solução de bloqueio (leite em pó diluído em tampão PBS-t 1x) *overnight*, sob agitação.

No dia seguinte, as membranas foram lavadas com PBS-t 1X por 5 min sob agitação, passo que foi repetido por mais 2 vezes. Em seguida, as membranas foram incubadas com soro policlonal anti-NTPDase 2 de *L. infantum chagasi* (VASCONCELLOS et al., 2014), diluído 1:2000 em tampão PBS-t 1x e incubadas por 2 h, sob agitação. Após esse tempo, as membranas foram lavadas com tampão PBS-t 1x, como descrito anteriormente, e incubadas por 2 h, com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho acoplado à peroxidase, diluído 1:15.000 em tampão PBS-t 1x. Em seguida, as membranas foram lavadas com tampão PBS-t 1x como descrito e a revelação foi realizada no escuro, utilizando o reagente DAB (Sigma) e água oxigenada diluídos em tampão Tris 50 mM pH 7,6.

5 RESULTADOS

Análises de Bioinformática

5.1. Análises de polimorfismos

Como exposto na secção 4.1, foram obtidos 5 clones ET e 6 clones NSL. O resultado do sequenciamento foi alinhado à sequência referência da ATP Difosfohidrolase 2 de *L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 (LbrM.15.0030), disponível no NCBI.

Foram observadas duas sequências distintas para os clones NSL e apenas uma sequência idêntica para todos os clones ET. Em todos os clones ET foram encontrados SNPs silenciosos nas posições 861 e 879. Essas mesmas mutações foram encontradas em dois clones NSL, porém os demais clones apresentaram SNPs silenciosos na posição 213 e não silenciosos nas posições 296, 377, 554 e 1126 (Tabela 8). Para o clone NSL 3 não foi possível determinar a presença dos SNPs nas posições 876, 879 e 1126, pois a construção possui um inserto menor, que parece resultar de um fragmento não amplificado completamente ou degradado.

A tradução mostra que não há alteração nas sequências com SNPs nas posições 861 e 879. Diferentemente, os clones NSL com mutações nas posições 296, 377, 554 e 1126 apresentam mudança na sequência de aminoácidos nas posições 99, 126, 185 e 376 (Tabela 9).

As mutações nas posições 99, 126 e 376 alteram a característica bioquímica dos aminoácidos, sendo, portanto, mutações não conservativas. A mutação na posição 99 substitui uma glutamina (Q), aminoácido com cadeia lateral polar, por uma prolina (P), cuja cadeia lateral é apolar cíclica. A mutação na posição 126 substitui uma serina (S), polar, por uma fenilalanina (F) relativamente apolar. A mutação 376 substitui uma treonina (T), aminoácido polar, por alanina (A) apolar. A mutação 185 substitui uma asparagina (N) por uma serina (S), não havendo mudança na polaridade.

A fim de observar se as mutações se encontravam em regiões importantes para a atividade catalítica, as anotações das ACRs foram feitas com base em informações descritas na literatura (SANSOM, 2012). Assim observamos que a maioria das mutações se localiza fora das regiões de ACRs, com exceção da mutação S126F que se localiza no início da ACR2.

Tabela 8: Distribuição de polimorfismos na sequência de DNA codificante da NTPDase2 das cepas ET e NSL de *L. braziliensis*.

CLONES	213C	296A	377C	554A	861G	879A	1126A
NSL1	T	C	T	G			G
NSL2					A	G	
NSL3	T	C	T	G			
NSL4	T	C	T	G			G
NSL5	T	C	T	G			G
NSL6					A	G	
ET3					A	G	
ET4					A	G	
ET6					A	G	
ET8					A	G	
ET9					A	G	

Tabela 9: Distribuição de mutações na sequência de aminoácidos da NTPDase2 das cepas ET e NSL de *L. braziliensis*.

CLONES	99Q	126S	376T	185N
NSL1	P	F	A	S
NSL2				
NSL3	P	F	A	
NSL4	P	F	A	S
NSL5	P	F	A	S
NSL6				
ET3				
ET4				
ET6				
ET8				
ET9				

A Figura 9 mostra a sequência mutada de NSL e as anotações das ACRs feitas no programa Geneious.

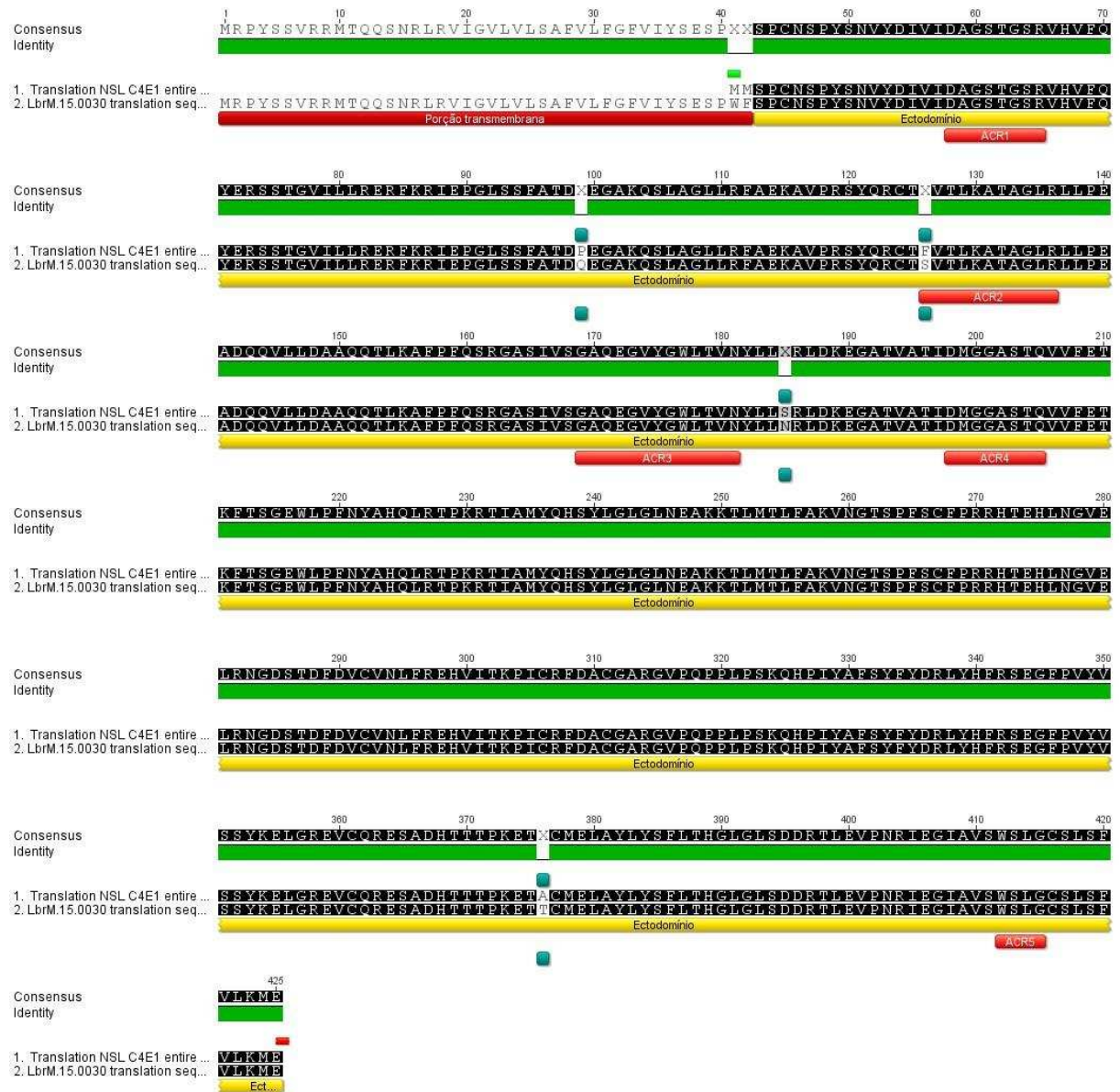


Figura 9: Sequência de aminoácidos da NSL-NTPDase2 alinhada com a sequência referência. Em vermelho estão anotadas as ACRs e em azul as mutações.

5.2. Predição de localização celular.

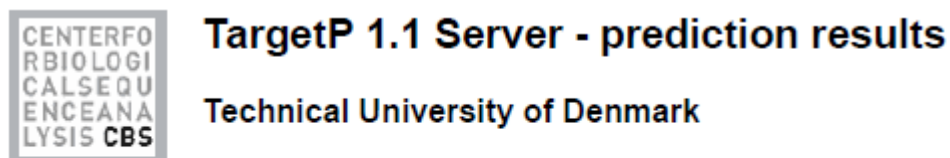
Para melhor entendimento, a partir de agora iremos nos referir à sequência não mutada como ET/NSL-NTPDase 2 e à sequência mutada como NSL-NTPDase 2.

As sequências foram avaliadas quanto à localização celular no programa Target P, com objetivo de verificar se as mutações alteram a localização das proteínas.

O Target P informa uma pontuação de predição para cada um dos possíveis destinos: secreção (SP), mitocôndria (mTP), cloroplasto (cTP) e outra (other), a partir dos quais atribui uma predição de localização celular em “Loc” (M-mitocôndria; C-cloroplasto; S- peptídeo sinal; outra “_”). Baseado nos scores o programa gera um coeficiente de confiabilidade (RC), que mensura o quão confiável é a predição. O RC vai de 1 (muito confiável) à 5 (pouco confiável). Se a escolha incluir predição de sítios de clivagem a coluna “TPlen” mostra a predição do tamanho da pré-sequência de aminoácidos (EMANUELSSON et al., 2007).

Os valores de score variam muito pouco entre as sequências. Ambas foram preditas para serem secretadas e o tamanho da pré-sequência foi predito com 32 aminoácidos, porém a confiabilidade do resultado foi baixa (RC=4).

As figuras 10 e 11 mostram os resultados para as enzimas ET/NSL e NSL, respectivamente.



```
### targetp v1.1 prediction results #####
Number of query sequences: 1
Cleavage site predictions included.
Using NON-PLANT networks.
```

Name	Len	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen
ET_NSL	425	0.373	0.678	0.026	S	4	32
cutoff		0.000	0.000	0.000			

Figura 10: Predição de localização celular para ET/NSL-NTPDase2 no Target P.



TargetP 1.1 Server - prediction results

Technical University of Denmark

```

### targetp v1.1 prediction results #####
Number of query sequences: 1
Cleavage site predictions included.
Using NON-PLANT networks.

Name           Len           mTP      SP  other  Loc  RC  TPlen
-----
NSL            425         0.376  0.687  0.025   5   4   32
-----
cutoff                0.000  0.000  0.000
  
```

Figura 11: Predição de localização celular para NSL-NTPDase2 no Target P.

5.3. Construção do modelo tridimensional

A fim de avaliar a localização das mutações na estrutura tridimensional da enzima, foram contruídos modelos no programa I-TASSER. As tabelas 10 e 11 mostram os 10 tmoldes com maior Z-score, usados pelo programa para a construção dos modelos NSL-NTPDase2 e ET/NSL-NTPDase2, respectivamente.

Tabela 10: *Templates* utilizados para construção do modelo NSL-NTPDase2 no I-TASSER.

<u>RANK</u>	<u>PDB Hit</u>	<u>Iden1</u>	<u>Iden2</u>	<u>Cov.</u>	<u>Norm. Z score</u>
1	3cj9A	0.29	0.32	0.96	2.23
2	3cj1A	0.27	0.32	0.94	4.09
3	3cj1A	0.29	0.32	0.96	2.24
4	3cj1A	0.29	0.32	0.95	6.09
5	4a57A	0.21	0.29	0.99	4.55
6	3zx0A	0.26	0.29	0.92	3.70
7	4a57A	0.21	0.29	0.98	6.76
8	3zx3A	0.28	0.31	0.94	5.26
9	3cj9A	0.29	0.32	0.96	2.52
10	4cd1A	0.00	0.32	0.95	1.97

Tabela 11: *Templates* utilizados para construção do modelo ET/NSL-NTPDase2 no I-TASSER.

<u>RANK</u>	<u>PDB Hit</u>	<u>Iden1</u>	<u>Iden2</u>	<u>Cov.</u>	<u>Norm. Z score</u>
1	3cj9A	0.29	0.32	0.96	2.27
2	3cj1A	0.27	0.32	0.94	4.24
3	3zx0A	0.27	0.29	0.92	2.31
4	3cj1A	0.29	0.32	0.95	6.06
5	4a57A	0.21	0.29	0.99	4.53
6	3cj9A	0.29	0.32	0.95	3.72
7	4a57A	0.21	0.29	0.98	6.73
8	3zx3A	0.29	0.31	0.94	5.48
9	3cj9A	0.28	0.32	0.96	2.49
10	4cd1A	0.00	0.32	0.95	1.96

Iden1: é a porcentagem de identidade de sequência dos *templates* na região de alinhamento *threading* com a sequência de interesse.

Iden2: é a porcentagem de identidade de toda a cadeia do *template* com a sequência de interesse.

Cov: representa a cobertura do alinhamento e é igual ao número de resíduos alinhados dividido pelo tamanho da proteína de interesse.

Norm. Z score: é o Z-score normalizado dos alinhamentos. Um valor >1 significa um bom alinhamento.

O programa I-TASSER inicia o modelamento a partir de estruturas identificadas no PDB pelo servidor LOMETS. LOMETS é um meta-servidor composto de vários programas que utilizam a abordagem *threading* (encadeamento) para gerar os modelos. O programa I-TASSER usa apenas os *templates* com maior significância (Z-score) gerados pelos alinhamentos *threading* e a partir desses *templates* o programa gera 5 modelos.

Destes, o modelo com maior C-score (que indica maior confiança) foi escolhido, submetido à minimização de energia (anexo), validado (anexo) e analisado no programa Pymol para identificação das localizações das mutações.

As figuras 12 e 13 mostram os resultados, indicando que as ACRs estão em regiões de alfa hélices e folhas beta, no interior da estrutura e que a maioria das mutações em NSL-NTPDase 2 está na superfície da enzima.

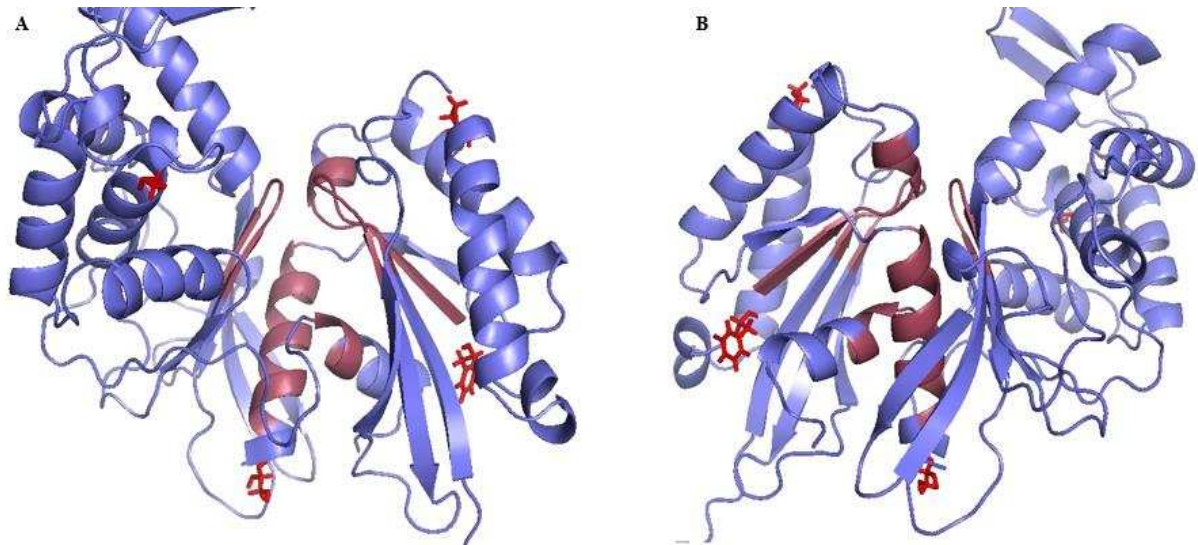


Figura 12: Representação em *cartoon* do modelo 3D da NSL-NTPDase 2. (A) As regiões de ACR estão coloridas em rosa e as mutações estão representadas em vermelho. (B) Rotação de 180° da estrutura mostrada em A.

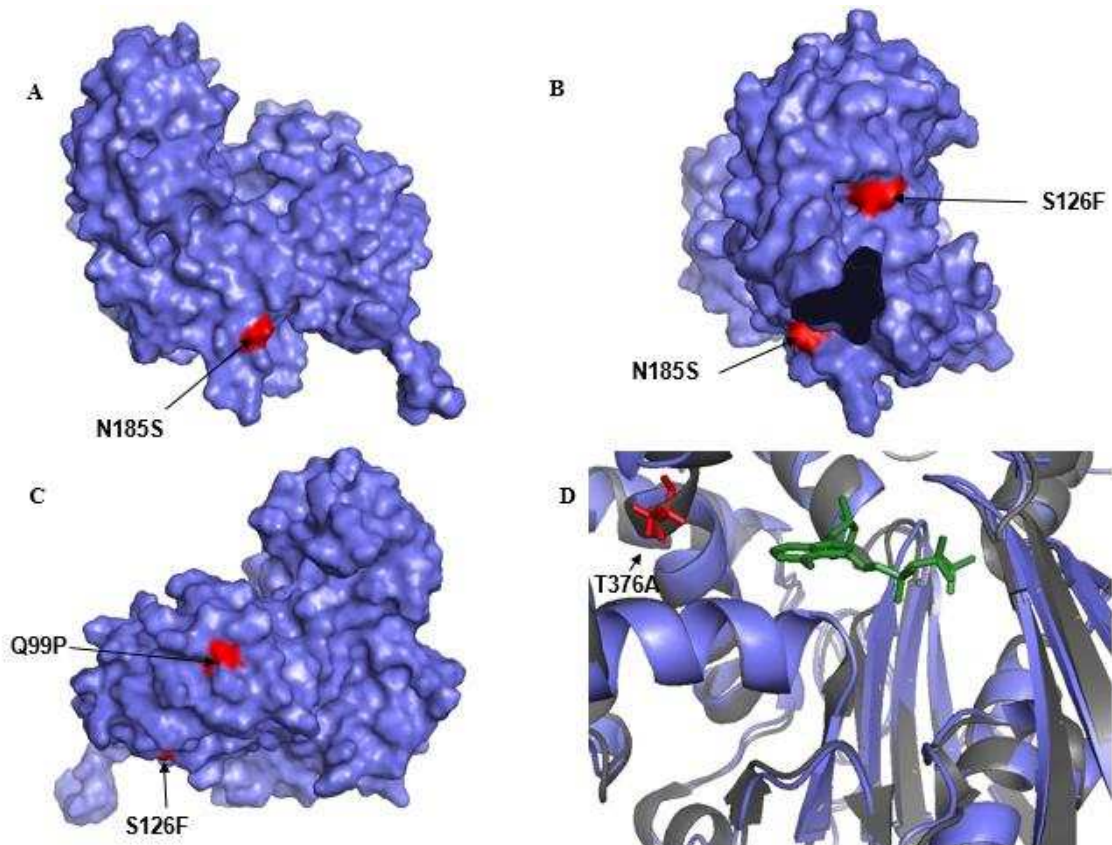


Figura 13: Representação em superfície e *cartoon* do modelo NSL-NTPDase 2. (A) Mutações N185S (B) Mutações S126F (rotação de 90°) (C) Mutações Q99P (rotação de 180° em relação à estrutura em A) (D) Alinhamento do modelo NSL-NTPDase 2 (azul) com a estrutura cristalina da Rn-NTPDase 2 (3cj1A), disponível no PDB (cinza). Mutações T376A (vermelho) próximas à região de ligação à base do nucleotídeo.

As mutações Q99P, S126F e N185S se localizam na superfície da enzima e a mutação 376 é interna e próxima à região de ligação à base do substrato (figura 13). A mutação 126 está presente externamente à enzima, no início da ACR2, região que corresponde à folha beta 4 e alfa hélice E na enzima de rato. A mutação N185S é adjacente à alfa hélice G onde a ACR3 está localizada.

Em seguida o modelo foi alinhado com a estrutura da NTPDase2 de *Rattus norvegicus* (Rn-NTPDase2-3cj1A), template de maior significância (Z-score) e identidade, a fim de verificar quais seriam os aminoácidos importantes para interação com substrato, água nucleofílica e co-fator.

Numa primeira análise, observamos que a mutação interna T376A se alinhou a um resíduo de tirosina (Y398), predito como importante para interação com a base nitrogenada do substrato. Assim, a enzima NSL-NTPDase2 teria uma alanina nessa região e a enzima ET/NSL-NTPDase2 teria uma treonina (Figura 14).

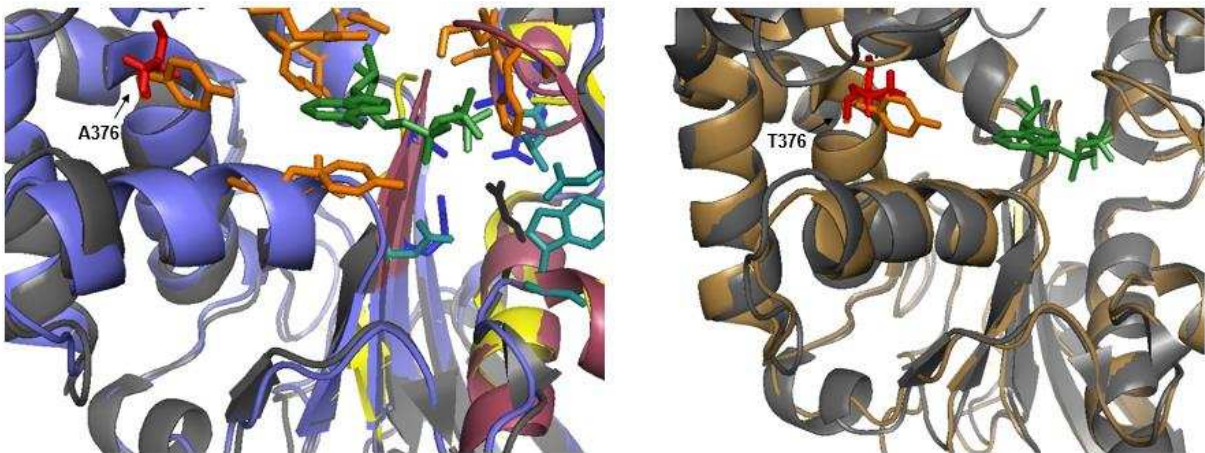


Figura 14: Alinhamento dos modelos NSL-NTPDase 2 e ET/NSL-NTPDase 2 com Rn-NTPDase 2. Alinhamento do modelo NSL-NTPDase 2 (azul) com Rn-NTPDase 2 (cinza) à esquerda, mostrando resíduos na enzima de rato importantes para ligação ao substrato (laranja), posicionamento da água nucleofílica (azul), coordenação do cálcio (ciano) e o resíduo catalítico E165 (preto). Resíduo de alanina da enzima de NSL (vermelho) alinhado com Y398 da enzima de rato (laranja). À direita o modelo ET/NSL-NTPDase 2 (marrom) alinhado à Rn-NTPDase 2 (cinza), mostrando o resíduo de treonina alinhado com Y398 da enzima de rato.

Utilizando o alinhamento selecionamos, na enzima de rato, os resíduos preditos como importantes para ligação ao substrato (laranja), posicionamento da água nucleofílica (azul), coordenação do cálcio (ciano), resíduo catalítico E165 (preto) de acordo com o descrito na literatura (ZEBISCH, STRÄTER, 2008) (Figura 14). Assim, identificamos quais resíduos nas

enzimas de ET/NSL e NSL seriam preditos como responsáveis por essas mesmas funções (tabela 12).

Tabela 12: Resíduos na estrutura 3D de ET/NSL e NSL-NTPDase2 identificados como importantes para atividade pelo alinhamento com RnNTPDase2.

<u>Função</u>	<u>ET e NSL-NTPDase2</u>	<u>RnNTPDase2</u>
Coordenação do co-fator	D58, W411, D198, T132, E172	D45, W436, D201, T122, E165
Interação com substrato	S61, T62, G63, T132, G201, A202, S203 L245, N246, Y333, D336, T376A	S48, S49, H50, T122, G204 A205, S206, R245, D246, A347, Y350, Y398
Posicionamento da água nucleofílica e resíduo catalítico	A133, R136, S203, Q205	A123, R126, S206, Q208
Resíduo catalítico	E172	E165

Os resíduos D58, W411, D198, T132, E172 se alinham, respectivamente, com os resíduos D45, W436, D201, T122 e E165 da enzima de rato, os quais atuam na coordenação do co-fator, sugerindo que os resíduos nas enzimas ET/NSL e NSL tenham a mesma função.

Os resíduos S61, T62, G63, T132, G201, A202, S203, L245, N246, Y333, D336, T376A foram preditos para interagir com o substrato, pois se alinham, respectivamente, com os resíduos S48, S49, H50, T122, G204, A205, S206, R245, D246, A347, Y350, Y398 da enzima de rato que possuem essa função. Destacamos que aminoácidos que interagem com Y398 diferem nas enzimas de ET/NSL (T376) e NSL (A376) como mostrado anteriormente.

Os resíduos A133, R136, S203, Q205 foram preditos como importantes para o posicionamento de E165 e da água nucleofílica, pois se alinham, respectivamente, com os resíduos A123, R126, S206, Q208 da enzima de rato que possuem essas funções

Clonagem e expressão heteróloga

5.4. Clonagem

Dos clones obtidos no vetor de clonagem pJET, um de cada cepa foi escolhido para os experimentos de subclonagem no vetor de expressão. O vetor pET21b e as construções ET-pET21b e NSL-pET21b foram digeridos, purificados a partir de gel de agarose 1% e ligados. Após a transformação foram obtidas muitas colônias e algumas foram selecionadas para

confirmação. As figuras 15 e 16 mostram as confirmações da clonagem feitas por PCR de colônia e digestão para os transformantes obtidos em placa.

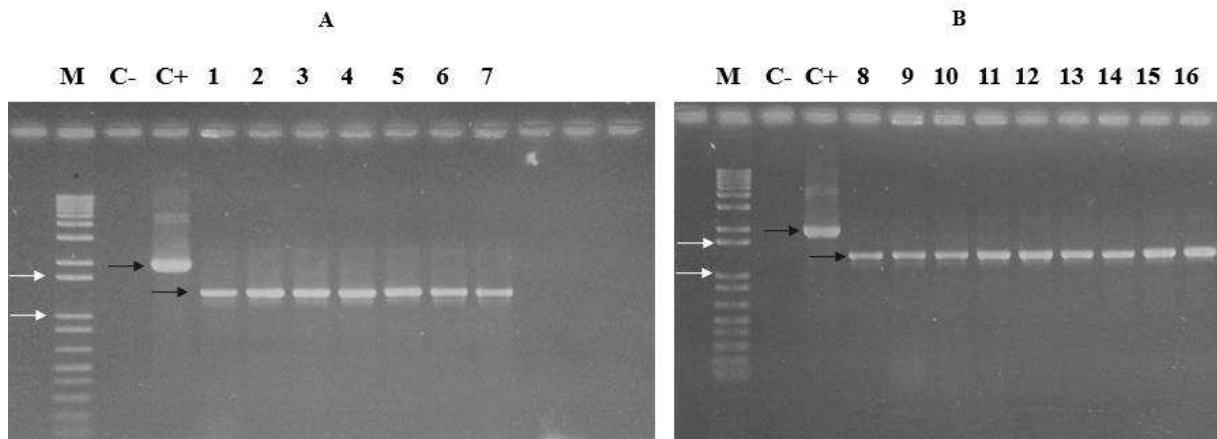


Figura 15: Confirmação por PCR de colônia. (A) Clones ET (B) Clones NSL. M: Marcador. C-: controle negativo. C+: controle positivo NTPDase1 de *T. cruzi*. As setas brancas indicam as bandas de 1000 pb e 1650 pb do marcador. As setas pretas indicam os fragmentos amplificados na PCR. Em C+ 1170 pb correspondente ao ectodomínio da TcNTPDase 1 e de 1 a 16 fragmento de 1158 pb correspondente ao ectodomínio da NTPDase 2 de *L. braziliensis*.

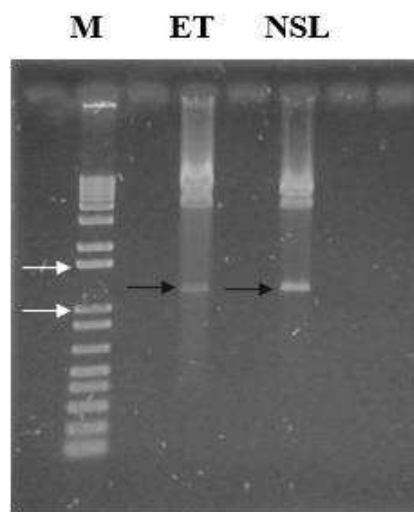


Figura 16: Confirmação por digestão dos clones obtidos no vetor pET21b. M: Marcador. As setas indicam as bandas de 1000 pb e 1650 pb do marcador.

A região correspondente ao ectodomínio possui 1158 pb e como mostrado na figura 15, a PCR de colônia amplificou fragmentos de tamanhos similares ao esperado para o inserto. Nesse caso, como a amplificação foi feita com o primer T7, deve-se considerar a adição dos pares de bases, correspondentes às distâncias dos sítios de anelamento dos *primers* em relação ao local de inserção da sequência clonada. Como o esperado, um fragmento com tamanho entre 1000 pb e 1650 pb foi amplificada em todos os clones ET e NSL testados.

O controle positivo (TcNTPDase1-pET21b) amplificou um fragmento de tamanho maior como esperado para ectodomínio da NTPDase 1 de *T. cruzi* (1770 bp) e na reação do controle negativo não houve amplificação, demonstrando que não houve contaminação durante o processo.

Similarmente, a digestão das construções no vetor pET21b com as enzimas *Nde I* e *Hind III* liberou um fragmento correspondente ao tamanho esperado (Figura 16).

Os clones foram sequenciados e analisados quanto à similaridade com sequências disponibilizadas no NCBI, utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment* (BLAST).

Para o clone NSL houve 93 % de identidade com a ATP difosfohidrolase de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904, com 93 % de cobertura e E-value igual a zero. Para o clone ET houve 97 % de identidade com a ATP difosfohidrolase de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904, com 88 % de cobertura e E-value igual a zero. As tabelas 13 e 14 mostram alguns dos resultados obtidos por BLAST. Mais algumas informações estão disponíveis em anexo.

Tabela 13: *Basic Local Alignment* para o clone NSL.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 Complete genome, chromosome 15	1664	1664	93%	0.0	96%	FR798989.1
Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 ATP diphosphohydrolase partial mRNA	1664	1664	93%	0.0	96%	XM_001562128.1
Leishmania peruviana Genome assembly Leishmania peruviana PAB4377_V1, chromosome : 15	1653	1653	93%	0.0	95%	LN609238.1
Leishmania panamensis ATP diphosphohydrolase partial mRNA	1615	1615	93%	0.0	95%	XM_010699079.1

Tabela 14: *Basic Local Alignment* para o clone ET.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Leishmania braziliensis..... MHOM/BR/75/M2904 Complete genome, chromosome 15	1626.....	1626.....	91%.....	0.0.....	96%.....	FR798989.1
Leishmania braziliensis..... MHOM/BR/75/M2904 ATP diphosphohydrolase partial mRNA	1626.....	1626.....	91%.....	0.0.....	96%.....	XM_001562128.1
Leishmania peruviana..... Genome assembly Leishmania peruviana PAB4377_V1, chromosome : 15	1615.....	1615.....	91%.....	0.0.....	95%.....	LN609238.1
Leishmania panamensis..... ATP diphosphohydrolase partial mRNA	1580.....	1580.....	88%.....	0.0.....	96%.....	XM_010699079.1

Em seguida o sequenciamento foi analisado no programa Geneious 6.0.6 para confirmação da sequência, *frame*, tradução e análise de possíveis polimorfismos. Os resultados foram alinhados com a sequência da ATP difosfohidrolase de *L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 como referência e confirmaram a clonagem no vetor entre os sítios de restrição escolhidos (Figuras 17 e 18), porém os clones obtidos apresentaram sequências idênticas. Dois SNPs silenciosos estão presentes nas posições 861 (G→A) e 879 (A→G) em ambos clones, como mostrado na figura 19. Assim, a proteína recombinante será chamada de ET/NSL-NTPDase2.

A tradução da sequência confirma a clonagem em *frame* e a presença de cauda de hexa-histidina carboxi-terminal, como mostrado nas figuras 20 e 21.

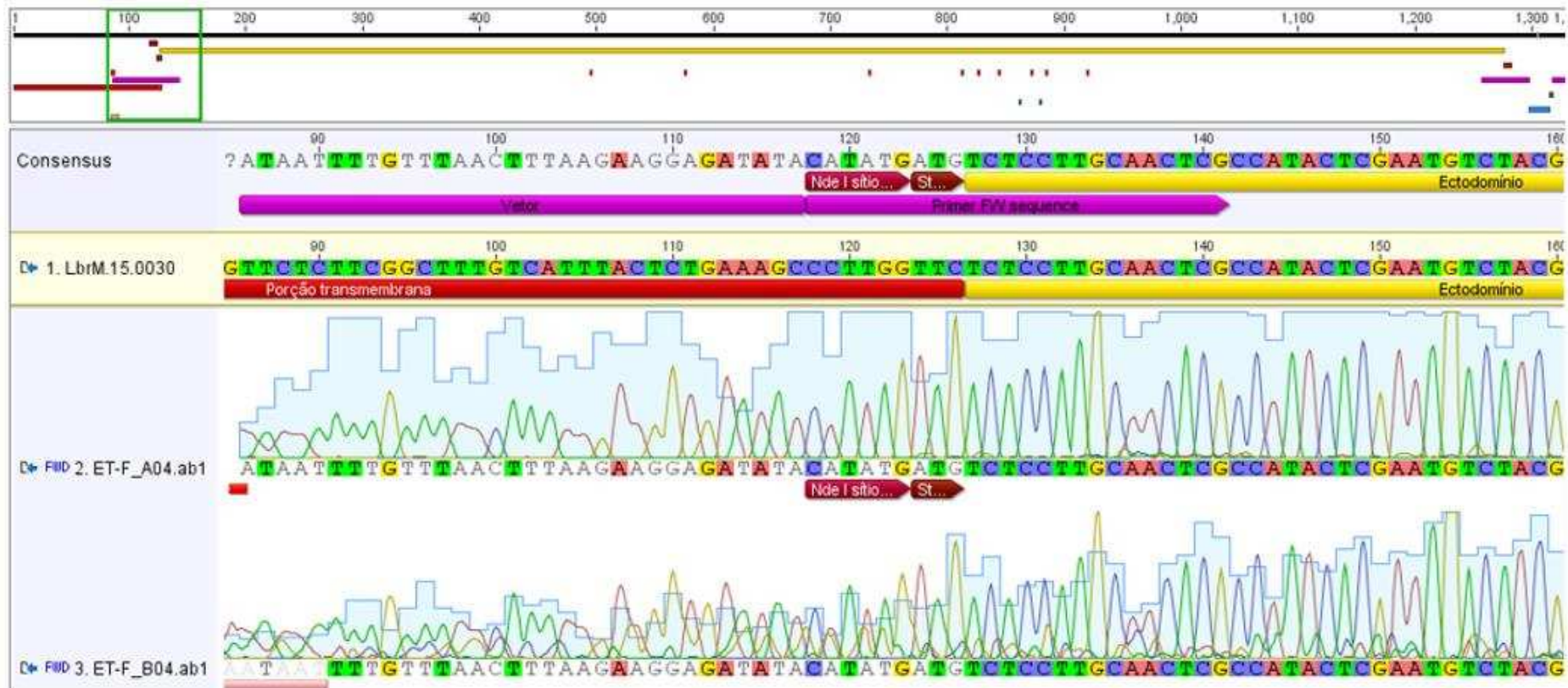


Figura 17: Confirmação da clonagem da ET/NSL-NTPDase2 por sequenciamento. A posição 118 marca o início do sítio de restrição da enzima NdeI, seguida do códon de iniciação (ATG) adicionado no primer foward e do ectodomínio clonado. A sequência que antecede o sítio de restrição coincide com a sequência do vetor pET21b.



Figura 18: Confirmação da clonagem da ET/NSL-NTPDase2 por sequenciamento. A posição 1281 marca o final do sítio de restrição da enzima HindIII, substituindo o códon de parada (TGA) da sequência original. A sequência que sucede o sítio de restrição coincide com a sequência do vetor pET21b, que codifica para a cauda de hexa-histidina e códon de parada.

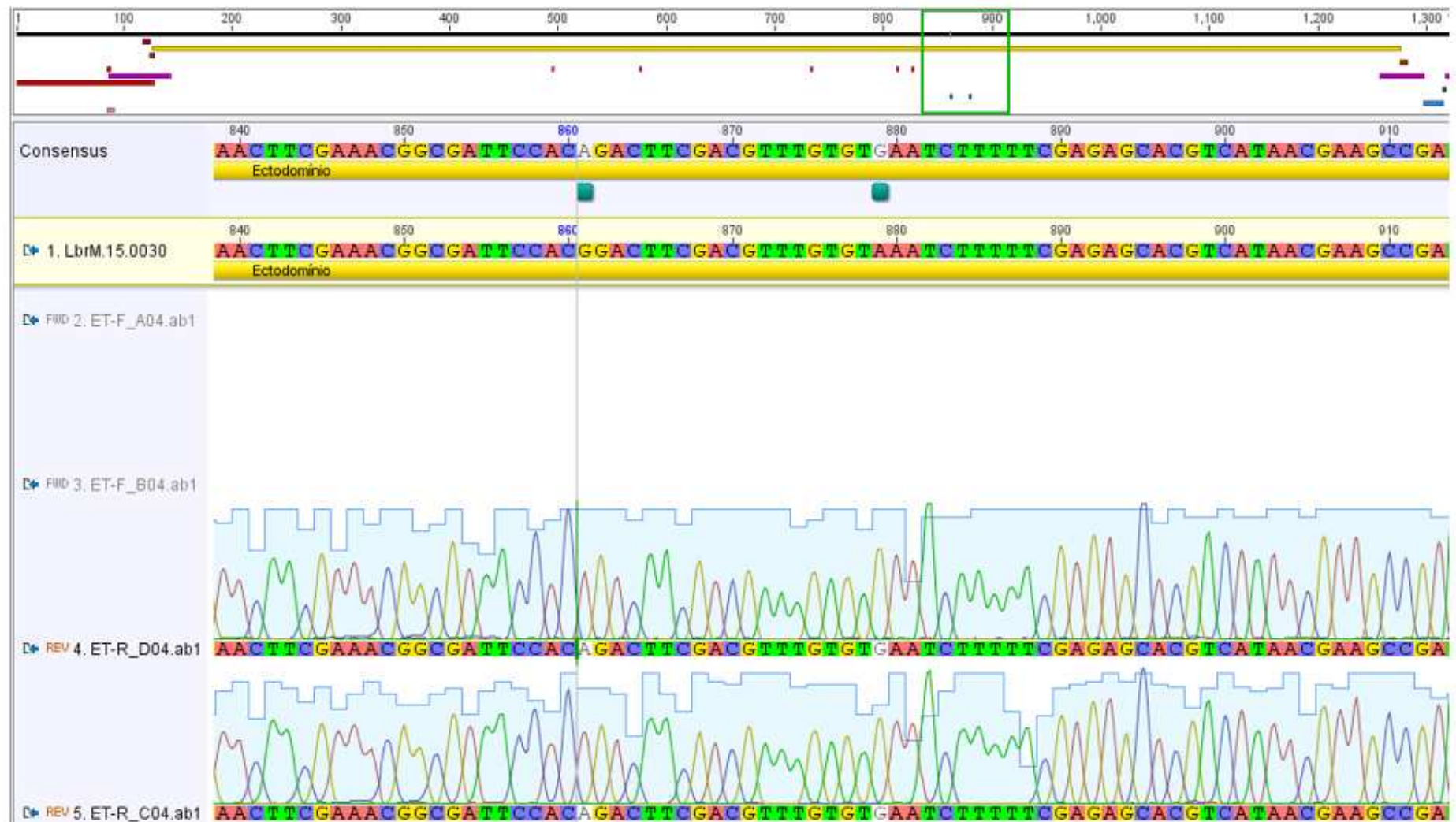


Figura 19: Análise de polimorfismos no clone ET. O cromatograma mostra um alto sinal para base A na posição 861 e para G na posição 879. Na sequência referência G e A aparecem nessas posições, respectivamente.

5.5. Predição de massa molecular e ponto isoelétrico.

A sequência utilizada corresponde à sequência do ectodomínio, acrescida de duas metioninas iniciais, dos resíduos codificados pelo vetor após o sítio de *Hind III* e as seis histidinas que compõem a his-tag. Os resultados mostram que a massa molecular e ponto isoelétrico teóricos são 44,4 KDa e 8.29, respectivamente.

Compute pI/Mw

Theoretical pI/Mw (average) for the user-entered sequence:

```

10      20      30      40      50      60
MMSPCNSPYS NVYDIVIDAG STGSRVHV FQ YERSSTGVIL LRERFKRIEP GLSSFATDQE

70      80      90      100     110     120
GAKQSLAGLL RFAEKAVPRS YQRCTSVTLK ATAGLRLLPE ADQQVLLDAA QQTLKAFP FQ

130     140     150     160     170     180
SRGASIVSGA QEGVYGWLT V NYLLNRLDKE GATVATIDMG GASTQVVFET KFTSGEWL PF

190     200     210     220     230     240
NYAHLRTPK RTIAMYQHS Y LGLGLNEAKK TLMTLFAKVN GTSPFSCFPR RHEHLNGVE

250     260     270     280     290     300
LRNGDSTDFD VCVNLFREHV ITKPICRFDA CGARGVPQPP LPSKQHP IYA FSYFYDRLYH

310     320     330     340     350     360
FRSEGFVYV SSYKELGRE V CQRESADHTT TPKETTCMEL AYLYSFL THG LGLSDDRTLE

370     380     390
VPNRIEGIAV SWSLGC SLSF VLKMEK LAAA LEHHHHH

```

Theoretical pI/Mw: 8.29 / 44413.50

Figura 18: Predição de ponto isoelétrico e massa molecular para a enzima recombinante ET/NSL-NTPDase 2.

5.6 Expressão heteróloga e purificação da enzima ET/NSL-NTPDase 2.

Obtivemos clones no vetor pET21b para ambas as cepas, porém como os clones ET e NSL-pJET haviam sido aleatoriamente escolhidos para subclonagem, ambas as construções apresentaram sequências idênticas da enzima. Após o sequenciamento dos clones ET e NSL-pJET, observamos que alguns clones NSL exibiram SNPs não silenciosos, portanto um clone específico para essa cepa foi selecionado para a realização da clonagem no vetor pET21b (em andamento). Por esse motivo, procedemos aos experimentos de expressão heteróloga apenas com o clone denominado ET/NSL-pET21b, devido ao fato da sequência possuir apenas SNPs silenciosos, característica de todos os clones ET e de alguns NSL.

A figura 23 mostra os resultados para os testes de indução:

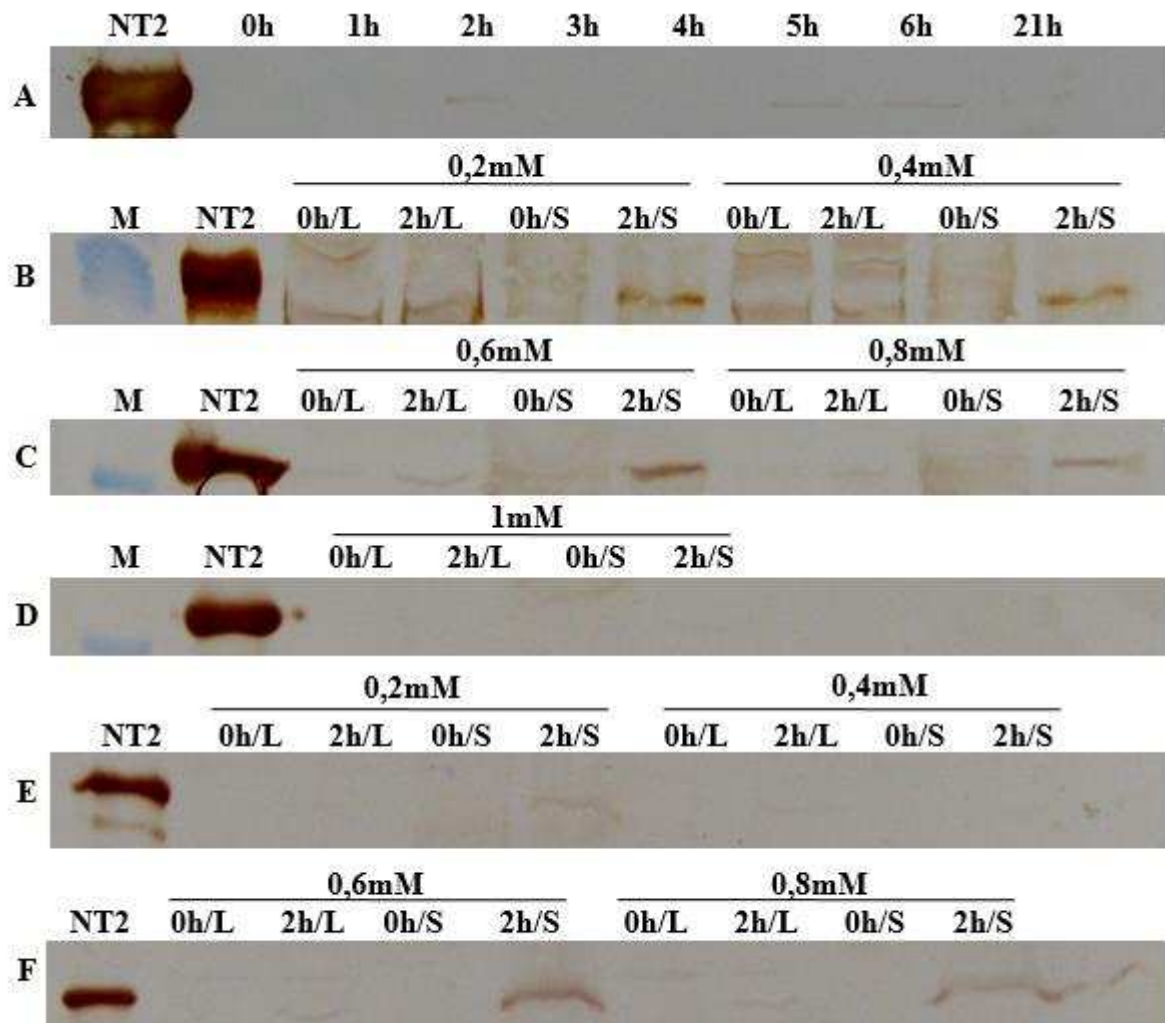


Figura 19: Testes de indução. Lisado da indução em pRARE com 0,5mM de IPTG nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 21h (A). Indução em BL21(DE3) com 0,2 mM e 0,4 mM de IPTG (B), 0,6 mM e 0,8 mM de IPTG (C) e 1 mM de IPTG (D). Indução em pRARE com 0,2 mM e 0,4 mM de IPTG (E) 0,6 mM e 0,8 mM de IPTG (F). M-Marcador; NT2-NTPDase 2 recombinante purificada de *L. infantum chagasi*; L-lise/fração solúvel; S- solubilização dos corpos de inclusão.

Como não foi possível diferenciar a proteína de interesse no gel de poliacrilamida, todos os testes foram submetidos a western blotting, após a eletroforese.

O teste inicial mostrou que a proteína é expressa nos tempos 2h, 5h, 6h e 21h na indução realizada com 0,5 mM de IPTG. Escolhemos, portanto, o tempo de 2 h de indução e variamos as concentrações de indutor e a cepa de expressão.

De todos os testes feitos a indução em pRARE com 0,6 mM de IPTG foi a considerada a melhor condição, indicando a presença da proteína em corpos de inclusão.

Em seguida, fizemos uma nova indução e processamos como descrito na secção 4.12 para obtenção dos corpos de inclusão solubilizados, para purificação por cromatografia de afinidade. As figuras 24 e 25 mostram esses resultados:

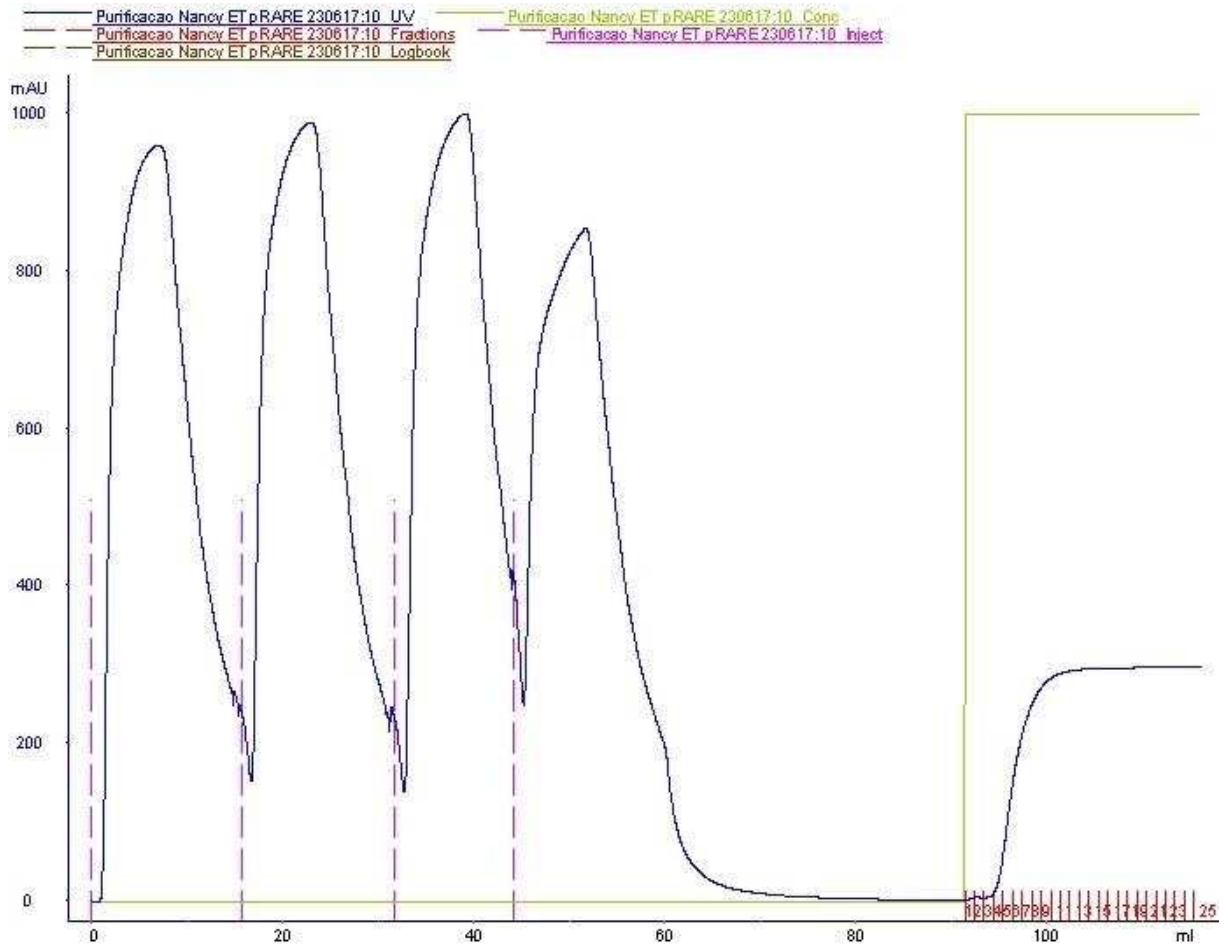


Figura 20: Gráfico da purificação em FPLC. A linha azul indica absorção na faixa de 280 nm. Os quatro picos iniciais indicam a aplicação da amostra e o pico final indica a eluição. A linha verde refere-se à porcentagem de tampão B para eluição da amostra. As frações coletadas estão indicadas por números em vermelho.

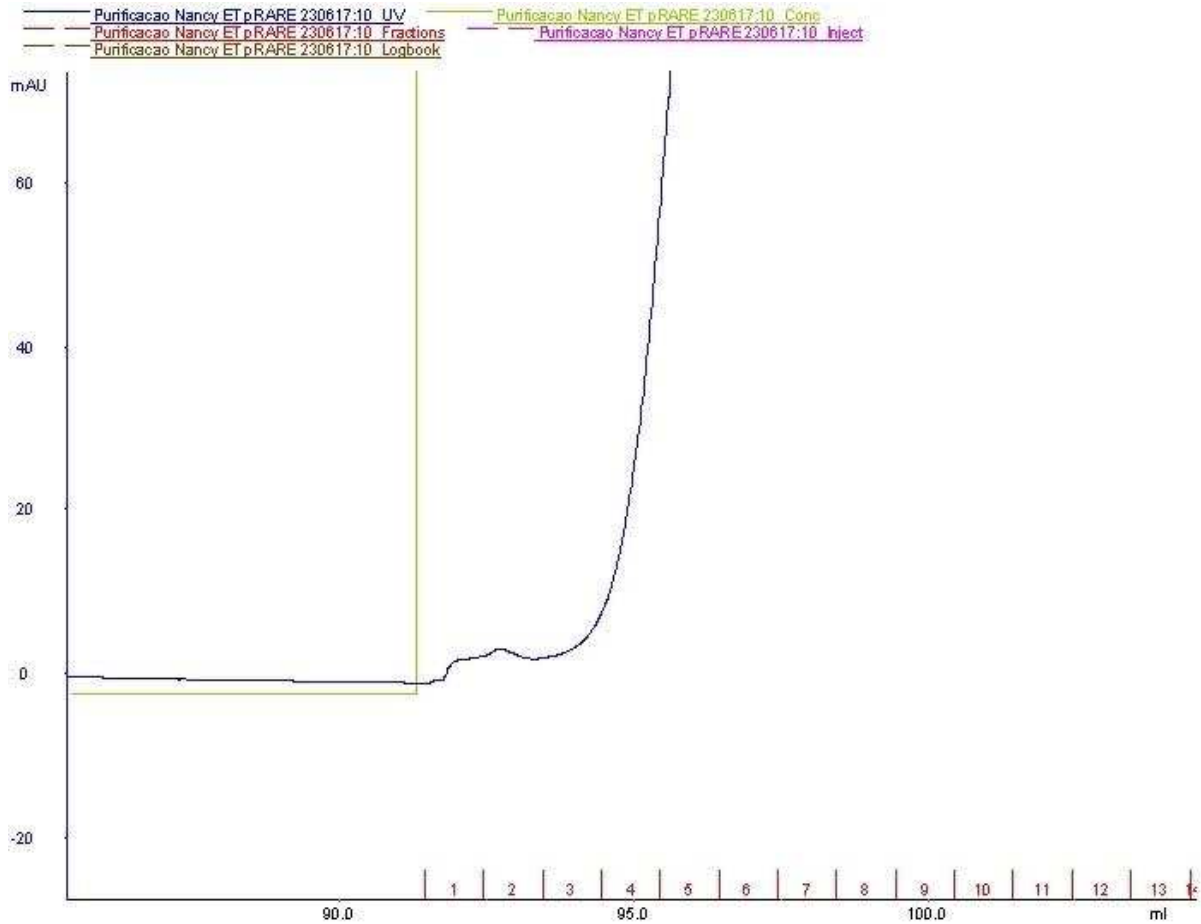


Figura 21: Aumento do gráfico da purificação na região das frações coletadas. Nas frações 1 e 2 são detectados 2 picos de absorção de UV.

Como mostrado na figura 25, dois picos pequenos foram observados no início da eluição, porém análises de eletroforese microcapilar (dados não mostrados) indicam que não há proteína nessas frações. Assim as alíquotas de 4 a 11 foram escolhidas para serem avaliadas por eletroforese e western blotting.

A figura 26 mostra os resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida referentes às frações 4 a 11 obtidas na purificação.

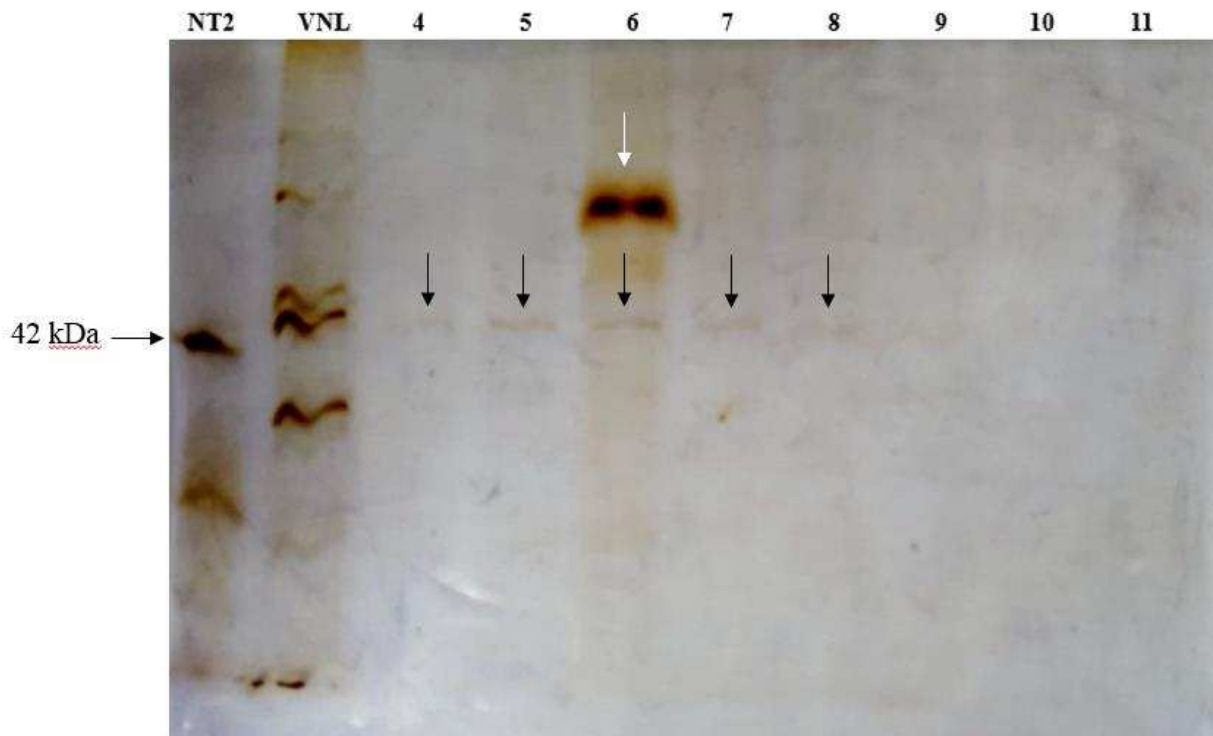


Figura 22: SDS-PAGE das frações 4 a 11 obtidas na purificação em FPLC. NT2-NTPDase 2 recombinante de *L. infantum chagasi* purificada. VNL-Volume não ligado. 4-11- frações.

Observa-se, na maioria das frações, uma banda de tamanho maior ao controle (42 kDa). Além desta banda, a fração 6 contém uma proteína maior, cuja banda aparece bem acima no gel.

Em seguida, foi feito western blotting, utilizando soro policlonal anti-NTPDase de *L. infantum* como anticorpo primário. Os resultados mostram que a banda menor, resultante da purificação, foi marcada. Apesar de haver marcação inespecífica, isso pode significar a necessidade de diluição maior dos anticorpos usados. No controle a marcação inespecífica pode representar uma possível degradação.

A figura 27 mostra os resultados do Western blotting, veja a seguir:

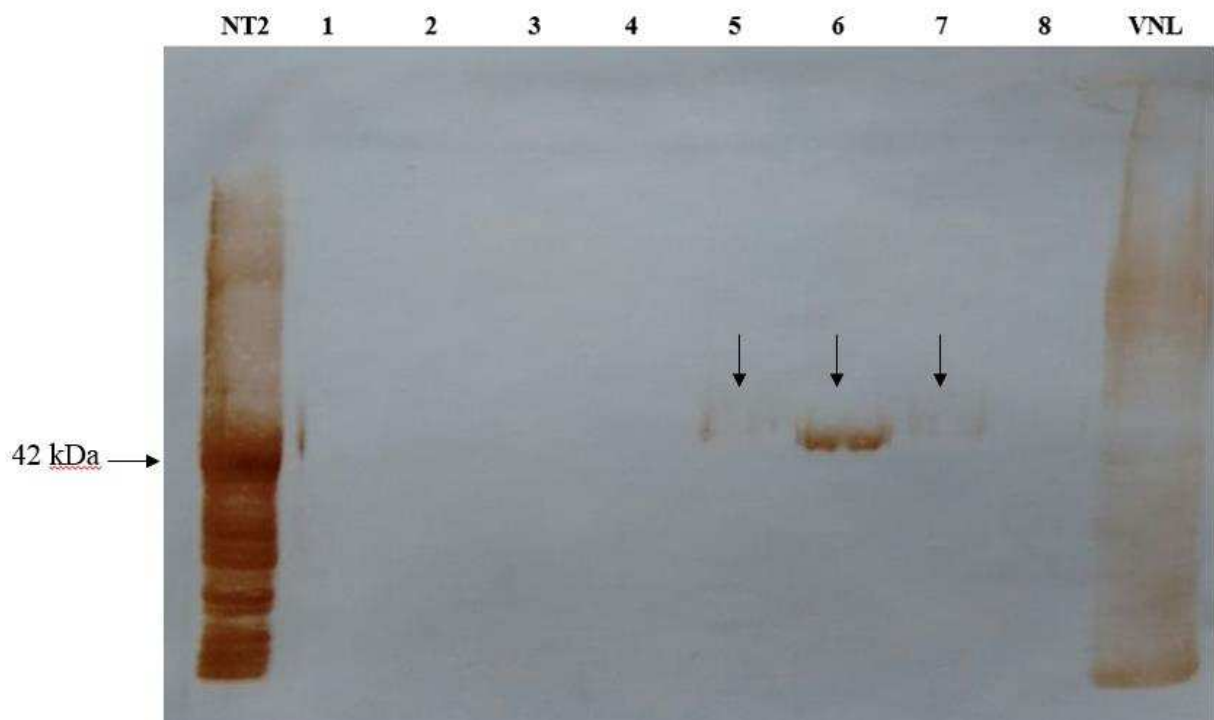


Figura 23: Western blotting das frações 1 a 8 obtidas na purificação em FPLC. NT2: NTPDase2 de *L. infantum chagasi* usada como controle. Números de 1 a 8 indicam as frações coletadas na purificação. VNL: volume não ligado. Soro policlonal anti-NTPDase2 de *L. infantum chagasi* na diluição 1:2.000 foi usada como anticorpo primário. Anti-IgG de coelho acoplado à peroxidase na diluição 1: 15.000 foi usado como anticorpo secundário.

6. DISCUSSÃO

Estudos indicam que *L. braziliensis* possui uma diversidade intra-espécie e que diferentes cepas estão relacionadas a diferenças na virulência, podendo influenciar o desenvolvimento de diferentes formas clínicas (LEITE et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2004).

Os isolados ET e NSL apresentam características polares quanto à virulência e infectividade em modelo murino (SANTOS, 2012). Além disso, foi observado que essas cepas diferem na hidrólise de nucleotídeos extracelulares e que a alta taxa de hidrólise de ATP se correlaciona com a cepa NSL, de maior virulência. O mesmo trabalho identificou a presença de SNPs não silenciosos na sequência da NTPDase 2 de NSL, mas nenhuma correlação com a atividade de hidrólise de nucleotídeos, virulência e infectividade foi observada (LEITE, 2012). Assim, nosso grupo de pesquisa iniciou trabalhos para investigar a relação desses polimorfismos com a atividade da enzima e a virulência dessas cepas.

No presente trabalho, a sequência correspondente ao ectodomínio da NTPDase2, de ambas as cepas, foi isolada e clonada em vetor bacteriano. Nossos resultados mostram que os clones ET obtidos apresentam apenas polimorfismos silenciosos e que, diferentemente, alguns clones NSL possuem sequência igual à observada para a cepa ET e outros clones possuem mutações nas posições Q99P, S126F, N185S e T376A. Nossos resultados confirmam o observado previamente para essas cepas, porém trabalho realizado por Leite e colaboradores (2012) identificou duas mutações adicionais (D54G e F386L) em dois diferentes clones da cepa NSL (LEITE, 2012; VALIATE, 2012).

As duas sequências obtidas (ET/NSL-NTPDase2 e NSL-NTPDase2) foram analisadas no programa Target P com o objetivo de avaliar a localização celular. Os resultados indicam que as proteínas possuem uma baixa probabilidade de serem secretadas e de estarem ancoradas à membrana mitocondrial. Trabalho realizado com a cepa M2904 de *L. braziliensis* mostrou que a NTPDase 2 se localiza na superfície, núcleo, bolsa flagelar, flagelo, mitocôndria, kinetoplasto e núcleo em divisão (PORCINO et al., 2012). Apesar da NTPDase2 da cepa ET possuir sequência de aminoácidos idêntica à sequência de cepa M2904, as predições mostram uma baixa probabilidade de existência da enzima na mitocôndria. Além disso, a sequência clonada corresponde apenas ao ectodomínio e a existência de mutações na região transmembrana não foi avaliada. Nesse contexto, é importante ressaltar que as predições são probabilidades de ocorrência e que os verdadeiros locais onde a proteína se encontra devem ser confirmados experimentalmente.

A fim de identificar a posição das mutações na estrutura tridimensional das enzimas, modelos foram construídos no programa I-TASSER. Os modelos com maior C-score foram escolhidos e possuem RMSD igual a 4.4Å (modelo NSL-NTPDase2) e 4.7Å (modelo ET/NSL-NTPDase2). Com base nessas informações, concluímos que os modelos permitem a predição da localização dessas mutações, bem como dos aminoácidos importantes para atividade da enzima (ROY, KUCUKURAL, ZHANG, 2010).

Nossos resultados mostram que as mutações Q99P, S126F, N185S se localizam na superfície da enzima e que a mutação T376A se localiza internamente e próximo a região de localização do substrato. A mutação S126F se localiza na ACR2, porém distante do sítio de interação com o substrato. A substituição de uma serina por uma fenilalanina, que possui um anel aromático e característica apolar, devem ser considerados como fatores que podem influenciar a estrutura da enzima, afetando indiretamente a atividade enzimática. O mesmo deve ser observado para as outras mutações externas (Q99P e N185S), apesar de não estarem em ACRs.

Adicionalmente, diversos trabalhos mostram o papel de ectonucleotidases na adesão do parasito à célula hospedeira e na formação de oligômeros (FAILER et al., 2003; KNOWLES, 2009; MARIOTINI-MOURA et al., 2014; VASCONCELLOS et al., 2014;). Assim, não podemos excluir que as mutações externas possam ter influência nesses processos, bem como na alteração indireta da atividade enzimática. Contudo, devemos considerar que os modelos construídos são estruturas rígidas que não permitem tal avaliação, sendo necessários experimentos de dinâmica molecular para avaliar o papel das mutações nesses processos associados à caracterização enzimática.

O alinhamento dos modelos com a estrutura da Rn-NTPDase2 mostra que a mutação T376A se alinha com um resíduo predito como importante para interação com o substrato na enzima de rato, sugerindo que os aminoácidos treonina e alanina tenham a mesma função nas enzimas de ET e NSL, respectivamente. Considerando a diferença no tamanho e polaridade desses resíduos, sugerimos que a mudança de polaridade nessa região, na enzima de NSL, demande a existência de interações hidrofóbicas ao invés de ligações de hidrogênio. E ainda, a existência de um grupo R menor (alanina), permite-nos sugerir a preferência de ligação a um substrato maior, como um nucleotídeo trifosfatado em detrimento do difosfatado.

Trabalho anterior mostra uma clara diferença na hidrólise de ATP, com a cepa NSL apresentando maior taxa de hidrólise de ATP comparado à cepa ET (LEITE et al., 2012). Tal fato nos leva a questionar se a alanina presente em NSL poderia ser responsável por uma alta

afinidade pelo ATP e conseqüentemente pela alta hidrólise e virulência já observados. Assim pretendemos realizar experimentos de atividade enzimática *in vitro*, utilizando clones isolados dos parasitos, bem como avaliar a atividade das enzimas recombinantes quanto à preferência por substrato a fim de avaliar o impacto dessas mutações na atividade.

Os modelos nos permitem prever os resíduos importantes para ligação ao substrato, interação com co-fator e água nucleofílica. O alinhamento prediz que os resíduos D58, W411, D198, T132, E172 atuam na coordenação do co-fator, os resíduos S61, T62, G63, T132, G201, A202, S203, L245, N246, Y333, D336, T376A interagem com o substrato e que os resíduos A133, R136, S203, Q205 atuam no posicionamento de E165 e da água nucleofílica. Contudo, somente experimentos de cristalografia podem confirmar essas predições.

Como a clonagem no vetor de expressão resultou em duas seqüências idênticas para a enzima, sem mutações, denominamos a enzima recombinante como ET/NSL-NTPDase 2, pelo fato da seqüência ser encontrada em clones de ambas as cepas.

A expressão da enzima não produziu, em nenhuma das condições testadas, uma banda discernível em gel de poliacrilamida. Por este motivo, todos os testes foram submetidos à western blotting, utilizando o soro policlonal anti-NTPDase2 de *L. infantum chagasi*.

Outras NTPDases recombinantes de *L. infantum chagasi* e *T. cruzi* foram expressas no mesmo vetor, como demonstrado em trabalhos do nosso grupo pesquisa e apresentaram expressão perceptível em gel de poliacrilamida (BASTOS, 2011; MARIOTINI-MOURA, 2010; VASCONCELLOS et al., 2014). Diferentemente, a expressão da enzima recombinante de *L. braziliensis* não pôde ser distinguida em gel, sendo necessária a marcação com western blotting. Isso indica uma baixa expressão da enzima, mesmo quando submetida à diferentes condições.

Após a purificação em FPLC foram obtidas duas proteínas de tamanhos diferentes e superiores ao padrão utilizado (42 kDa). Porém, apenas a proteína de menor tamanho foi marcada nas frações usando soro policlonal anti-NTPDas2 de *L. infantum chagasi*. A predição de massa molecular para a proteína de *L. braziliensis* foi de 44,4 kDa, maior que o padrão. Portanto, a proteína obtida na purificação e marcada no western blotting pode ser a proteína de interesse.

7. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho nós comparamos a NTPDase 2 das cepas ET e NSL de *L. (V.) braziliensis* com relação à sua sequência codificadora e avaliamos as possíveis consequências de mutações na composição de aminoácidos e estrutura tridimensional da enzima. Nessas análises foi possível verificar que:

- As análises de polimorfismos na região que codifica o ectodomínio da enzima NTPDase2 mostram que os clones ET possuem apenas mutações silenciosas nas posições 861 e 879 e os clones NSL apresentam duas sequências da enzima, confirmando resultados obtidos em outros trabalhos.
- Alguns clones NSL apresentam sequência idêntica à de ET e outros apresentam polimorfismos nas posições 213, 296, 377, 554 e 1126, mudando os aminoácidos nas posições 99, 126, 185 e 376.
- As mutações Q99P, S126F e T376A causam mudanças na polaridade.
- Obtivemos modelos da estrutura 3D para ambas as sequências, com qualidade que permite inferir com relação à posição das mutações e aminoácidos importantes para a atividade.
- O alinhamento mostrou que as mutações são externas à estrutura da enzima, com exceção da mutação T376A que se localiza internamente.
- A mutação T376A se alinha com o resíduo de Y398 da Rn-NTPDase2, predito como importante para ligação ao substrato na enzima de rato.
- Nesse trabalho, obtivemos construções em vetor de expressão com a sequência da enzima ET/NSL-NTPDase2, confirmados por PCR, digestão e sequenciamento.
- Os resultados indicam a clonagem em *frame* com a cauda de hexa-histidina carboxiterminal.
- Uma banda com tamanho aproximado ao padrão (42 kDa) pode ser vista em gel de poliacrilamida após a purificação e foi marcada em western blotting, indicando a possível expressão e purificação da proteína de interesse.

Nossos resultados mostram informações importantes acerca das mutações encontradas, permitindo-nos inferir sobre as possíveis consequências que elas podem causar na estrutura e atividade da enzima. Além disso, esse conhecimento nos permitirá delinear experimentos futuros, que possam responder de forma satisfatória os questionamentos que surgiram nessa pesquisa.

Como perspectiva, pretendemos realizar experimentos de dinâmica molecular, cristalografia e expressar e caracterizar bioquimicamente ambas enzimas, a fim de avaliar se as diferenças na sequência de aminoácidos podem ser responsáveis pela diferença de atividade observada para essas cepas, contribuindo para o entendimento do papel da NTPDase2 na atividade ectonucleotidásica. Além disso, pretendemos clonar o parasito e realizar experimentos de infecção *in vitro* e *in vivo* em modelo murino, a fim de avaliar a relação dos polimorfismos com a virulência dessas cepas.

8. REFERÊNCIAS

- AKMAN, L.; AKSU, H. S. Z.; WANG, R.-Q.; OZENSOY, S.; OZBEL, Y.; ALKAN, Z.; OZCEL, M. A.; CULHA, G.; OZCAN, K.; UZUN, S.; MEMISOGLU, H. R.; CHANG, K-P. **Multi-Site DNA Polymorphism Analyses of *Leishmania* Isolates Define their Genotypes Predicting Clinical Epidemiology of Leishmaniasis in a Specific Region.** *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 47 (6), p. 545-554, 2000.
- BASTOS, M. S. **Expressão heteróloga e caracterização bioquímica e biológica da NTPDase1 de *Leishmania infantum chagasi*.** 2011. 76f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.
- BERRÊDO-PINHO, M.; PERES-SAMPAIO, C. E.; CHRISPIM, P. P. M.; BELMONT-FIRPO, R.; LEMOS, A. P.; MARTINY, A.; VANNIER-SANTOS, M. A.; MEYER-FERNANDES, J. R. **A Mg-Dependent Ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and Its Possible Role in Adenosine Acquisition and Virulence.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 391(1), p. 16–24, 2001.
- BISAGGIO, D. F. R.; PERES-SAMPAIO, C. E.; MEYER-FERNANDES, J. R.; SOUTO-PADRÓN, T. **Ecto-ATPase activity on the surface of *Trypanosoma cruzi* and its possible role in the parasite–host cell interaction.** *Parasitology Research*, v. 91, p.273–282, 2003.
- BOURS, M.J.L.; SWENNEN, E.L.R.; DI VIRGILIO, F.; CRONSTEIN, B.N.; DAGNELIE, P.C. **Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation.** *Pharmacology & Therapeutics*, v.112, p.358–404, 2006.
- BOWIE, J. U.; LUTHY, R.; EISENBERG, D. **A Method to Identify Protein Sequences That Fold into a Known Three-Dimensional Structure.** *Science*, v. 253, p. 164-170, 1991.
- BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, v.72, 1976.
- BRASIL. Ministério da Saúde do Brasil. **Manual de vigilância da leishmaniose visceral.** Brasília, DF, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde do Brasil. Portaria interministerial N°1.426, de 11 de julho de 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Nota Técnica N°11 /2016 /CPV /DFIP /SDA /GM /MAPA.**
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Miltefosina para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar. Relatório de Recomendação,** novembro, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde do Brasil. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana.** Brasília, DF, 2017.
- BURNSTOCK, G. **Purinergic modulation of cholinergic transmission.** *General Pharmacology*, v.11 (1), p.15-18, 1980.

BURNSTOCK, G. **Purine and pyrimidine receptors.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 64, p.1471 – 1483, 2007.

CARGILL, M.; ALTSHULER, D.; IRELAND, J.; SKLAR, P.; ARDLIE, K.; PATIL, N.; LANE, C. R.; LIM, E. P.; KALYANARAMAN, N.; NEMESH, J.; ZIAUGRA, L.; FRIEDLAND, L.; ROLFE, A.; WARRINGTON, J.; LIPSHUTZ, R.; DALEY, G. Q.; LANDER, E. S. **Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes.** *Nature genetics*, v. 22, p. 231-238, 1999.

COLOVOS, C.; YATES, T. D. **Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions.** *Protein Science*, v.2, p. 1511-1519, 1993.

CONITEC. Proposta de elaboração protocolo clínico e diretrizes terapêuticas. Escopo. Leishmaniose Visceral, julho, 2016.

DEAGLIO, S.; DWYER, K. M.; GAO, W.; FRIEDMAN, D.; USHEVA, A.; ERAT, A.; CHEN, J.; ENJYOJI, K.; LINDEN, J.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K.; STROM, T. B.; ROBSON, S. C. **Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression.** *The Journal of Experimental Medicine*, v.204, n.6, p.1257–1265, 2007.

deSOUZA, R. F.; SANTOS, Y. L.; VASCONCELLOS, R. S.; BORGES-PEREIRA, L.; CALDAS, I. S.; ALMEIDA, M. R.; BAHIA, M. T.; FIETTO, J. L. R. **Recombinant *Leishmania (Leishmania) infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase NTPDase-2 as a new antigen in canine visceral leishmaniasis diagnosis.** *Acta Tropica*, v. 125, p. 60– 66, 2013.

EMANUELSSON, O.; BRUNAK, S.; HEIJNE, G.; NIELSEN, H. **Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools.** *Nature Protocols*, v.2, p. 953-971, 2007.

FAILER, B. U.; ASCHRAFI, A.; SCHMALZING, G.; ZIMMERMANN, H. **Determination of native oligomeric state and substrate specificity of rat NTPDase1 and NTPDase2 after heterologous expression in *Xenopus oocytes*.** *European Journal of Biochemistry*, v.270, p. 1802–1809, 2003.

FIETTO, J. L. R.; DEMARCO, R.; NASCIMENTO, I. P.; CASTRO, I. M.; CARVALHO, T. M. U.; DE SOUZA, W.; BAHIA, M. T.; ALVES, M. J. M.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. **Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.316(2), p. 454–460, 2004.

GASTEIGER E.; HOOGLAND C.; GATTIKER A.; DUVAUD S.; WILKINS M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH A. **Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server.** (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, 2005.

GOMES, R. S.; DE CARVALHO, L. C. F.; DE SOUZA VASCONCELLOS, R.; FIETTO, J. L. R.; AFONSO, L. C. C. **E-NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) of *Leishmania amazonensis* inhibits macrophage activation.** *Microbes and Infection*,

v.17(4), p. 295–303, 2015.

HAMMOND, D. J.; GUTTERIDGE, W. E. **Purine and pyrimidine metabolism in the Trypanosomatidae.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.13, p.243–261, 1984.

HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N. **Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil.** *Trends in Parasitology*, v.27, n.9, 2011.

KNOWLES, A. F. **The single NTPase gene of *Drosophila melanogaster* encodes an intracellular nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 (NTPDase6).** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 484, p. 70–79, 2009.

KRIEGER, E.; JOO, K.; LEE, J.; LEE, J.; RAMAN, S.; THOMPSON, J.; TYKA, M.; BAKER, D.; KARPLUS, K. **Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8.** *Proteins*, v. 77(9), p. 114–122, 2009.

KUMAR, R.; ENGWERDA, C. **Vaccines to prevent leishmaniasis.** *Clinical & Translational Immunology*, v.3, 2014.

LANGSTON, H. P.; KE, Y.; GEWIRTZ, A. T.; DOMBROWSKI, E.; KAPP, J. A.; KAPP, J. A. **Secretion of IL-2 and IFN- γ , But Not IL-4, by Antigen-Specific T Cells Requires Extracellular ATP.** *The Journal of Immunology*, v.170, p.2962-2970, 2003.

LEITE, P. M.; GOMES, R. S.; FIGUEIREDO, A. B.; SERAFIM, T. D.; TAFURI, W. L.; OLIVEIRA, M. A. P.; RABELLO, A. **Ecto-Nucleotidase Activities of Promastigotes from *Leishmania (Viannia) braziliensis* Relates to Parasite Infectivity and Disease Clinical Outcome.** *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 6 (10), 2012.

LEITE, P. M. **Correlação entre atividade ecto-nucleotidásica, infecciosidade e evolução clínica em isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.** 2012. 118f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, 2012.

MAIOLI, T. U.; TAKANE, E.; ARANTES, R. M. E.; FIETTO, J. L. R.; AFONSO, L. C. C. **Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice.** *Parasitology Research*, v. 94, p.207–212, 2004.

MARCUS, A. J.; BROEKMAN, M. J.; DROSOPOULOS, J. H. F.; ISLAM, N.; ALYONYCHEVA, T. N.; SAFIER, L. B.; HAJJAR, K. A.; POSNETT, D. N.; SCHOENBORN, M. A.; SCHOOLEY, K. A.; GAYLE, R. B.; MALISZEWSKI, C. R. **The Endothelial Cell Ecto-ADPase Responsible for Inhibition of Platelet Function is CD39.** *The Journal of Clinical Investigation*, v. 99, n. 6, p. 1351–1360, 1997.

MARIOTINI-MOURA, C.; SILVA, M.; BASTOS, M. S.; CASTRO, F. F.; LANNA, M. T.; VASCONCELLOS, R. S.; NEVES-DO-VALE, M. A. A.; MOREIRA, B. P.; SANTOS, R. F.; OLIVEIRA, C. M.; CUNHA, L. C. S.; SOUTO, X. M.; BRESSAN, G. C.; SILVA-JÚNIOR, A.; BAQUI, M. M. A.; BAHIA, M. T.; ALMEIDA, M. R.; MEYER-FERNANDES, J. R.; FIETTO, J. L. R. ***Trypanosoma cruzi* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in**

host cell adhesion. *Acta Tropica*, v. 130, p.140–147, 2014.

MARIOTINI-MOURA, C. **Expressão heteróloga, purificação e busca de inibidores da NTPDase1 de *Trypanosoma cruzi*.** 2010. 40f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

MARQUES-DA-SILVA, E. A.; OLIVEIRA, J. C.; FIGUEIREDO, A. B.; LIMA JÚNIOR, D. S.; CARNEIRO, C. M.; FIETTO, J. L. R.; AFONSO, L. C. C. **Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection.** *Microbes and Infection*, v. 10, p. 850–857, 2008.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. **Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil: Emerging Anthroponosis and Possibilities for Their Control.** *Cadernos de Saúde Pública*. Rio de Janeiro, 10 (supl. 2), p. 359-375, 1994.

MCCONVILLE, M. J.; NADERER, T. **Metabolic Pathways Required for the Intracellular Survival of *Leishmania*.** *Annual Reviews in Microbiology*, v. 6, p. 543–561, 2011.

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

MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. **Therapeutic Options for Old World Cutaneous Leishmaniasis and New World Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis.** *Drugs*, v.73, p.1889–1920, 2013.

MU, J.; DUAN, J.; MAKOVA, K. D.; JOY, D. A.; HUYNH, C. Q.; BRANCH, O. H.; WEN-HSIUNG LI, W.; SU, X. **Chromosome wide SNPs reveal an ancient origin for *Plasmodium falciparum*.** *Letters to nature*, 2002.

NAGLE, A. S.; KHARE, S.; KUMAR, A. B.; SUPEK, F.; BUCHYNSKYY, A.; MATHISON, C. J. N.; CHENNAMANENI, N. K.; PENDEM, N.; BUCKNER, F. S.; GELB, M. H.; MOLTENI, V. **Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis.** *Chemical Reviews*, v. 114, p. 11305–11347, 2014.

OLIVEIRA, C. I.; TEIXEIRA, M. J.; TEIXEIRA, C. R.; JESUS, J. R.; ROSATO, A. B.; SILVA, J. S.; BRODSKYN, C.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. ***Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice.** *Microbes and Infection*, v.6, p. 977–984, 2004.

PERSSON, P. B. **Purinergic signaling.** *Acta Physiologica*, v. 204, p.3–5, 2012.

PIMENTEL, F. G.; BASTOS, M. S.; SANTOS, R. F.; MARIOTINI-MOURA, C.; BRESSAN, G. C.; SILVA-JÚNIOR, A.; ALMEIDA, M. R.; FIETTO, J. L. R. **The leishmania-macrophage interactions: role of E-NTPDases and purinergic signaling.** *Macrophage*, v.3, 2016.

PINHEIRO, C. M.; MARTINS-DUARTE, E. S.; FERRARO, R. B.; SOUZA, A. L. F.; GOMES, M. T.; LOPES, A. H. C. S.; VANNIER-SANTOS, M. A.; SANTOS, A. L. S.;

MEYER-FERNANDES, J. R. ***Leishmania amazonensis*: Biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities.** *Experimental Parasitology*, v. 114, p.16–25, 2006.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. ***Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction.** *Future Microbiology*, v. 10(1), p. 111–129, 2015.

PORCINO, G. N.; CARVALHO-CAMPOS, C.; MAIA, A. C. R. G.; DETONI, M. L.; FARIA-PINTO, P.; COIMBRA, E. S.; MARQUES, M. J.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; DINIZ, V. A.; CORTE-REAL, S.; VASCONCELOS, E. G. ***Leishmania (Viannia) braziliensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1): Localization and in vitro inhibition of promastigotes growth by polyclonal antibodies.** *Experimental Parasitology*, v. 132, p. 293–299, 2012.

QUEIROZ, A.; SOUSA, R.; HEINE, C.; CARDOSO, M.; GUIMARÃES, L. H.; MACHADO, P. R. L.; CARVALHO, E. M.; RILEY, L. W.; WILSON, M. E.; SCHRIEFERA, A. **Association between an Emerging Disseminated form of Leishmaniasis and *Leishmania (Viannia) braziliensis* Strain Polymorphisms.** *Journal of Clinical Microbiology*, v.50, n.12, p. 4028–4034, 2012.

RANJITH-KUMAR, C. T.; MILLER, W.; SUN, J.; XIONG, J.; SANTOS, J.; YARBROUGH, Y.; LAMB, R. J.; MILLS, J.; DUFFY, K. E.; HOOSE, S.; CUNNINGHAM, M.; HOLZENBURG, A.; MBOW, M. L. SARISKY, R. T.; KAO, C. C. **Effects of Single Nucleotide Polymorphisms on Toll-like Receptor 3 Activity and Expression in Cultured Cells.** *The Journal of Biological Chemistry*, v.282, n. 24, p. 17696–17705, 2007.

RISCH, N. J. **Searching for genetic determinants in the new millennium.** *Nature*, v. 405, p. 847-856, 2000.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. **I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction.** *Nature Protocols*, v.5, p. 725-738, 2010.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. **The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice.** *Nature Reviews Immunology*, v.2, p. 845-858, 2002.

SANSOM, F. M. **The role of the NTPDase enzyme family in parasites: what do we know, and where to from here?** *Parasitology*, v. 139, p. 963–980, 2012.

SANSOM, F. M.; RALTON, J. E.; SERNEE, M. F.; COHEN, A. M.; HOOKER, D. J.; HARTLAND, E. L.; NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. **Golgi-Located NTPDase 1 of *Leishmania major* Is Required for Lipophosphoglycan Elongation and Normal Lesion Development whereas Secreted NTPDase 2 Is Dispensable for Virulence.** *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v.8 (12), 2014.

SANTOS, R. F.; PÔSSA, M. A. S.; BASTOS, M. S.; GUEDES, P. M. M.; ALMEIDA, M. R.; DEMARCO, R.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; BAHIA, M. T.; FIETTO, J. L. R. **Influence of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase Activity on *Trypanosoma cruzi* Infectivity and Virulence.** *Plos Neglected Tropical Diseases*, v.3(3), 2009.

SANTOS, R. F. **Padrões de poliadenilação em moléculas de RNAs de *Leishmania* obtidas**

da análise de transcriptoma. 2012. 173f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

VALIATE, B. V. S. **Estudo dos polimorfismos no gene da NTPDase 2 da cepa ET de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.** 2012. 55f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

VASCONCELLOS, R. S.; MARIOTINI-MOURA, C.; GOMES, R. S.; SERAFIM, T. D.; FIRMINO, R. C.; BASTOS, M. S.; CASTRO, F. F.; OLIVEIRA, C. M.; BORGES-PEREIRA, L.; SOUZA, A. C. A.; DESOUZA, R. F.; GÓMEZ, G. A. T.; PINHEIRO, A. C.; MACIEL, T. E. F.; SILVA-JÚNIOR, A.; BRESSAN, G. C.; ALMEIDA, M. R.; BAQUI, M. M. A.; AFONSO, L. C. C.; FIETTO, J. L. R. ***Leishmania infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 is an Apyrase Involved in Macrophage Infection and Expressed in Infected Dogs.** *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v.8(11), 2014.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. **ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins.** *Nucleic acids research*, v.35, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014.** *Weekly epidemiological record*, n. 22, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases.** 2017.

ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. **Structural insight into signal conversion and inactivation by NTPDase 2 in purinergic signaling.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, p. 6882–6887, 2008.

ZIMMERMANN, H. **Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides.** *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, v. 362, p.299–309, 2000.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. **Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases.** *Purinergic Signalling*, v. 8, p. 437–502, 2012.

ANEXOS**Tampões utilizados na pré-purificação****TAMPÃO DE LISE** (10 mL)Tris 50 mM 500 μ L (estoque 1 M)NaCl 300 mM.....750 μ L (estoque 4 M)Imidazol 10 mM.....100 μ L (estoque 1 M)H₂O.....8650 μ L**TAMPÃO DE LAVAGEM** (40 mL)

Tris 50 mM pH 8.....2 mL (estoque 1 M)

NaCl 500 mM.....5 mL (estoque 4 M)

 β -mercaptoetanol 10 mM.....28 μ L

Uréia 2 M..... 4,8 g

Água.....(completar)

TAMPÃO DE SOLUBILIZAÇÃO (1 mL)Tris 50 mM pH 8.....100 μ L (estoque 1 M)NaCl 500 mM.....125 μ L (estoque 4 M)

Uréia 8 M.....0,48 g

Água.....(completar)

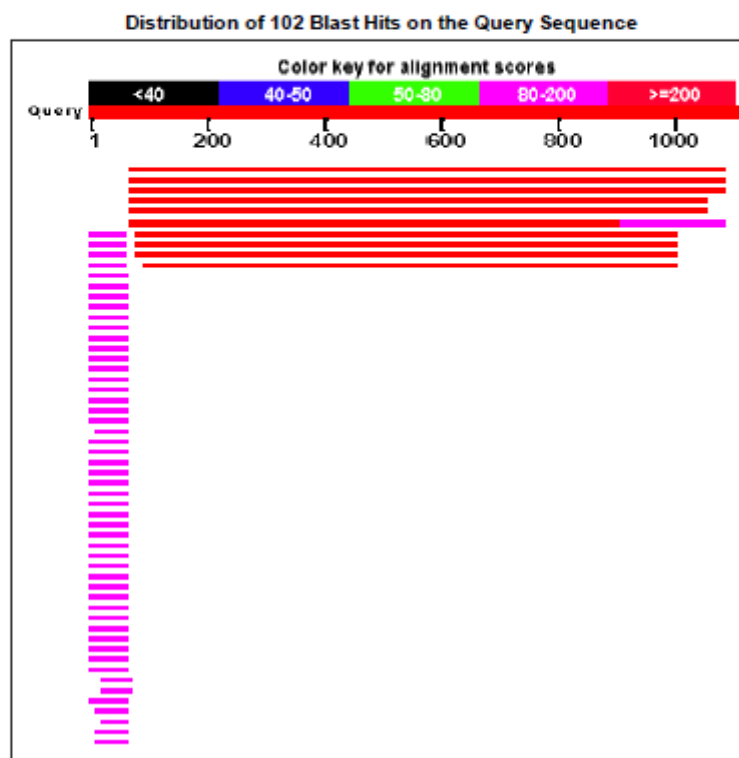
Confirmação da clonagem no vetor de expressão por BLAST

ET-pET21b

>ET_pET21b-F_B04

RID	GGF6DF4RQ1B (Expires on 04-10 07:20 am)	Database Name	nr
Query ID	Id Query_28229	Description	Nucleotide collection (nt)
Description	None	Program	BLASTN 2.3.1+
Molecule type	nucleic acid		
Query Length	1106		

Graphic Summary



08/04/2016

NCBI Blast->ET_pET21b-F_B04

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

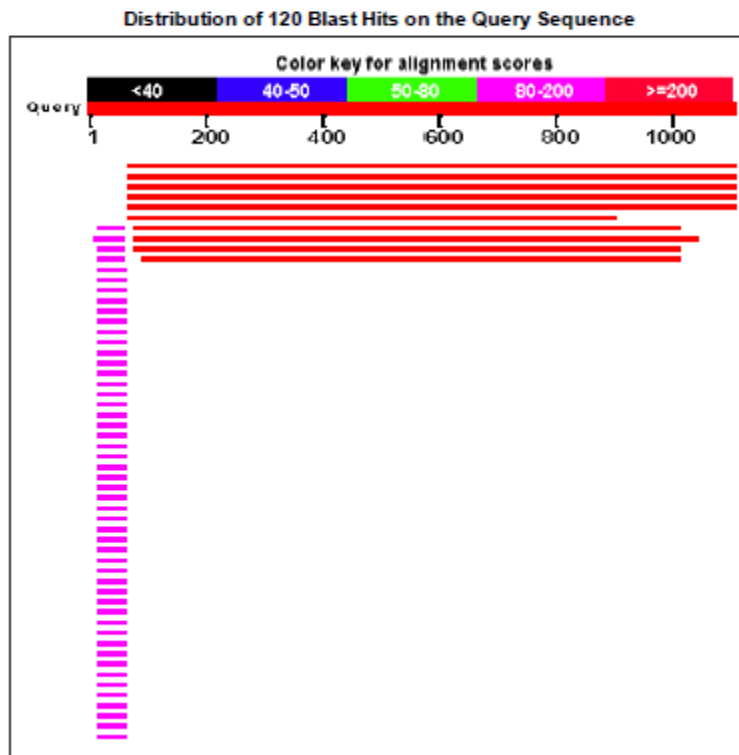
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 complete genome, chromosome 15	1626	1626	91%	0.0	96%	FR798989.1
Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 ATP diphosphohydrolase partial mRNA	1626	1626	91%	0.0	96%	XM_001562128.1
Leishmania peruviana genome assembly Leishmania peruviana PAB-4377_V1, chromosome : 15	1615	1615	91%	0.0	95%	LN609238.1
Leishmania panamensis ATP diphosphohydrolase partial mRNA	1580	1580	88%	0.0	96%	XM_010699079.1
Leishmania panamensis strain MHOM/PA/94/PSC-1 chromosome 15 sequence	1580	1580	88%	0.0	96%	CP009384.1
Leishmania peruviana genome assembly Leishmania peruviana LEM-1537_V1, chromosome : 15	1461	1632	91%	0.0	98%	LN609201.1
Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103 putative nucleoside diphosphatase partial mRNA	832	832	83%	0.0	83%	XM_003873478.1
Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103 complete genome, chromosome 15	832	832	83%	0.0	83%	FR799568.1
Leishmania amazonensis strain LTP0016 ATP diphosphohydrolase mRNA, complete cds	809	809	83%	0.0	83%	JQ697233.2
Leishmania amazonensis NTPDase 1 (NTPDase 1) gene, partial cds	798	798	82%	0.0	83%	JQ623507.1
Expression vector pKLD56nCBR, complete sequence	89.8	89.8	5%	1e-13	91%	KT020826.1
Expression vector pET32a-LIC, complete sequence	89.8	89.8	5%	1e-13	91%	EF442786.1
Cloning vector pCALnFLAG, complete sequence	89.8	89.8	5%	1e-13	91%	AF087042.1
Expression vector pPK121, complete sequence	89.8	89.8	5%	1e-13	91%	AF055296.1
Expression vector pCal-n-ek complete sequence	89.8	89.8	5%	1e-13	91%	U86347.1
Expression vector pCALn, complete sequence	89.8	89.8	5%	1e-13	91%	U36454.1
Expression vector pET151-OmyCasp3 DNA, complete sequence	87.9	87.9	5%	4e-13	91%	AB477343.1
Expression vector pET24a_mRuby2, complete sequence	87.9	87.9	5%	4e-13	91%	KM504961.1
Expression vector pET24a_mVenus, complete sequence	87.9	87.9	5%	4e-13	91%	KM504960.1
Expression vector pET24a_Clover, complete sequence	87.9	87.9	5%	4e-13	91%	KM504959.1
Expression vector pET24a_mCerulean3, complete sequence	87.9	87.9	5%	4e-13	91%	KM504958.1
Brugia timori genome assembly B_timori_Indonesia_v1_D_4, scaffold BTMF_contig0009058	87.9	87.9	5%	4e-13	91%	LK921170.1
Cloning vector pT7_RL2, complete sequence	87.9	87.9	5%	4e-13	91%	KM099240.1
Cloning vector pT7_RL1, complete sequence	87.9	87.9	5%	4e-13	91%	KM099239.1

NSL-pET21b

NSL_pET21b-F F04

RID [GGFHTYKM018](#) (Expires on 04-10 07:26 am)
Query ID lc|Query_75249
Description None
Molecule type nucleic acid
Query Length 1104
Database Name nr
Description Nucleotide collection (nt)
Program BLASTN 2.3.1+

Graphic Summary



08/04/2016

NCBI Blast: NSL_pET21b-F F04

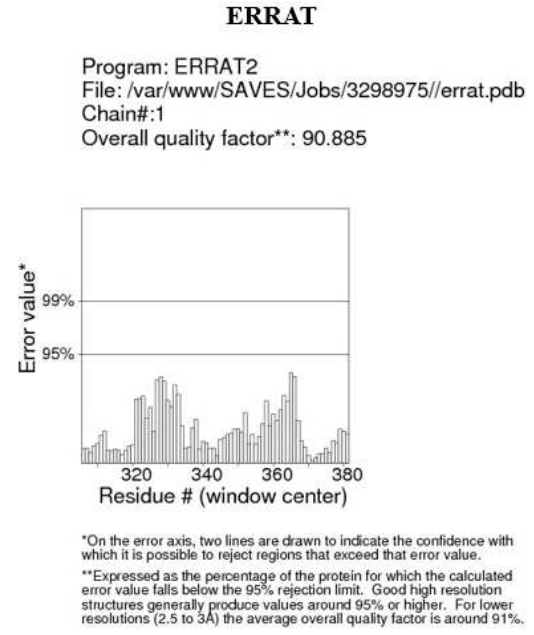
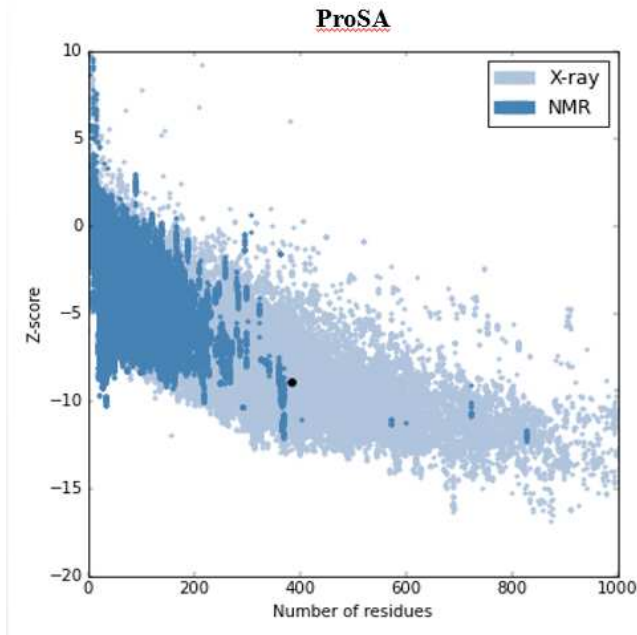
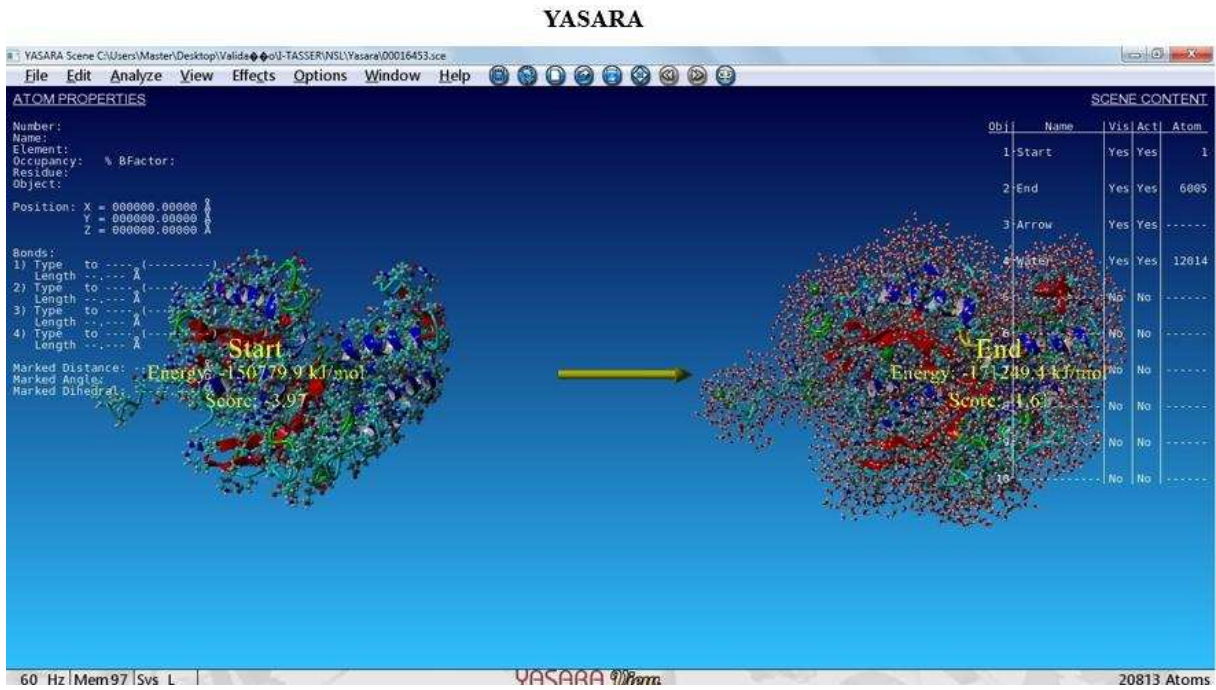
Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 complete genome, chromosome 15	1664	1664	93%	0.0	96%	FR738989.1
Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 ATP diphosphohydrolase partial mRNA	1664	1664	93%	0.0	96%	XM_001562128.1
Leishmania peruviana genome assembly Leishmania peruviana PAB-4377_V1, chromosome : 15	1653	1653	93%	0.0	95%	LN609238.1
Leishmania panamensis ATP diphosphohydrolase partial mRNA	1615	1615	93%	0.0	95%	XM_010699079.1
Leishmania panamensis strain MHOM/PA/84/PSC-1 chromosome 15 sequence	1615	1615	93%	0.0	95%	CP009384.1
Leishmania peruviana genome assembly Leishmania peruviana LEM-1537_V1, chromosome : 15	1495	1495	75%	0.0	99%	LN609201.1
Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103 putative nucleoside diphosphatase partial mRNA	852	852	84%	0.0	83%	XM_003873478.1
Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103 complete genome, chromosome 15	852	852	87%	0.0	83%	FR799568.1
Leishmania amazonensis strain LTP0016 ATP diphosphohydrolase mRNA, complete cds	830	830	84%	0.0	83%	JQ697233.2
Leishmania amazonensis NTPDase 1 (NTPDase1) gene, partial cds	819	819	83%	0.0	83%	JQ623507.1
Cloning vector pRC-Niv-N, complete sequence	91.6	91.6	4%	3e-14	100%	DQ508095.1
Synthetic construct MBP/His-tag/TEV protease/Arg-tag gene, complete cds	87.9	87.9	4%	4e-13	98%	KT183030.1
Synthetic construct L-amino acid oxidase gene, complete cds	87.9	87.9	5%	4e-13	95%	GU902953.2
Cloning vector pPK124 complete sequence	87.9	87.9	4%	4e-13	98%	AF161077.1
Expression vector pPK115, complete sequence	87.9	87.9	4%	4e-13	98%	AF117643.1
Bacillus Intermedius plasmid pET3xa-barn36, gene encoding barnase	87.9	87.9	4%	4e-13	98%	AJ006407.1
Expression vector pPK113, complete sequence	87.9	87.9	4%	4e-13	98%	AF059739.1
Expression vector pKLD66nCBP, complete sequence	86.1	86.1	4%	2e-12	96%	KT020828.1
Cloning vector pRSET-TAUT_2P, complete sequence	86.1	86.1	4%	2e-12	98%	KC795008.1
Cloning vector pRSET-TAUT_P, complete sequence	86.1	86.1	4%	2e-12	98%	KC795007.1
Cloning vector pRSET-TAUT, complete sequence	86.1	86.1	4%	2e-12	98%	KC795006.1
Expression vector pIGDM4R3, complete sequence	86.1	86.1	4%	2e-12	98%	HG845200.1
Expression vector LIC-pDEST-LC2, complete sequence	86.1	86.1	4%	2e-12	98%	JF327847.1
Expression vector LIC-pDEST-LC1, complete sequence	86.1	86.1	4%	2e-12	98%	JF327846.1

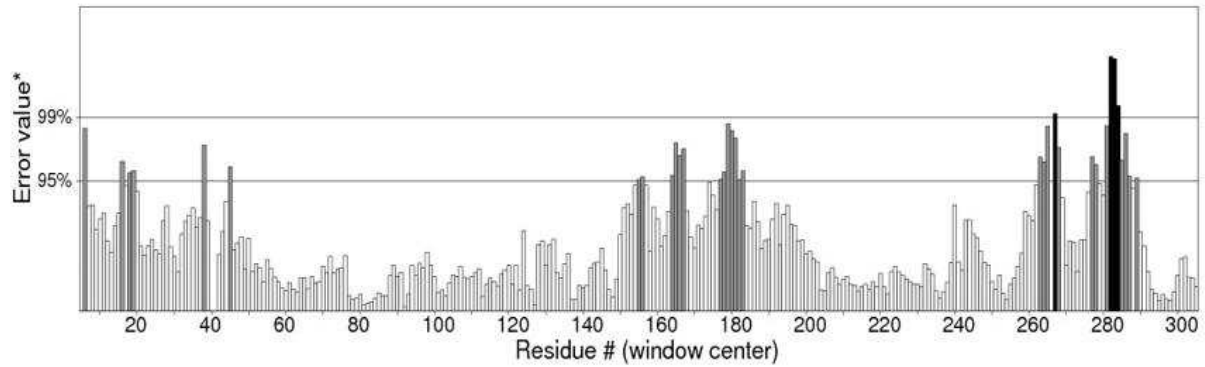
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Validações para o modelo NSL-NTPDase2.



ERRAT

Program: ERRAT2
 File: /var/www/SAVES/Jobs/3298975//erratt.pdb
 Chain#:1
 Overall quality factor**: 90.885



*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.

**Expressed as the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structures generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3Å) the average overall quality factor is around 91%.

Verify 3D

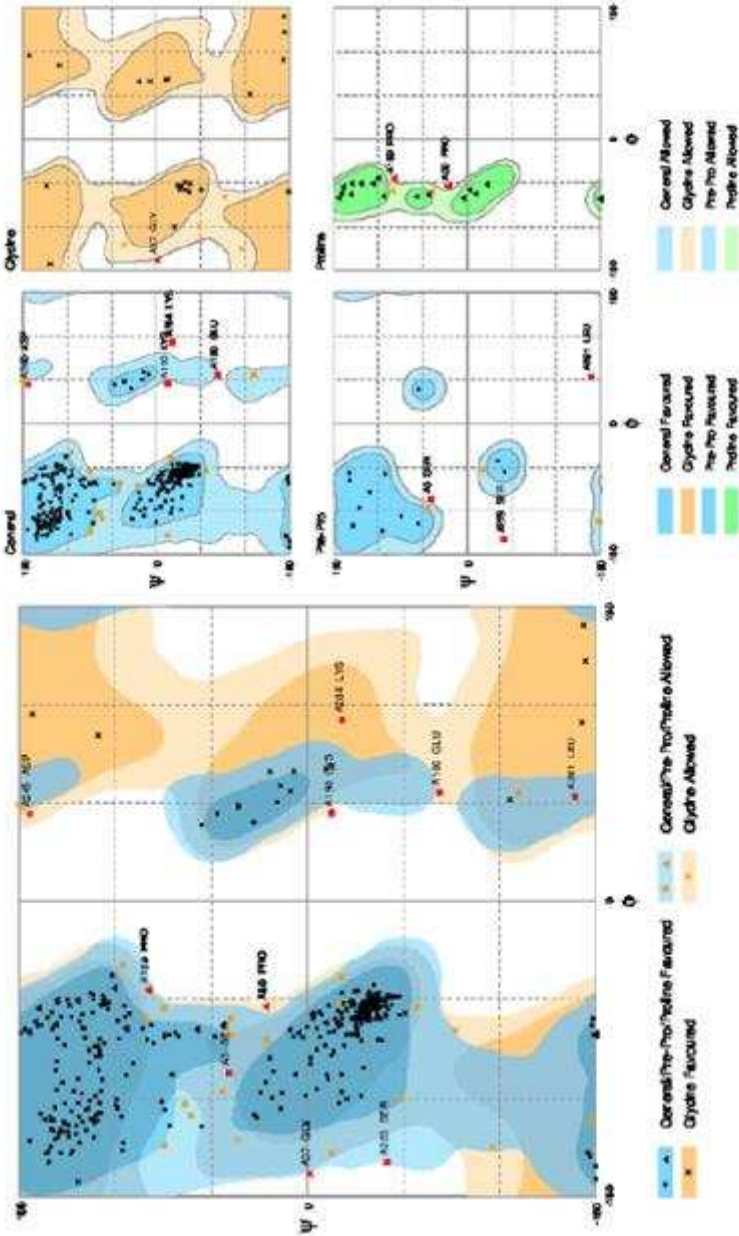
Verify 3D Results plot

91.95% of the residues had an averaged 3D-1D score ≥ 0.2

Pass

At least 80% of the amino acids have scored ≥ 0.2 in the 3D/1D profile.

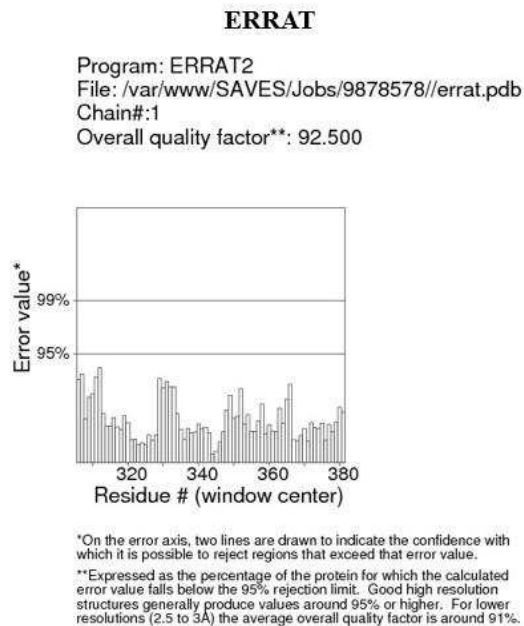
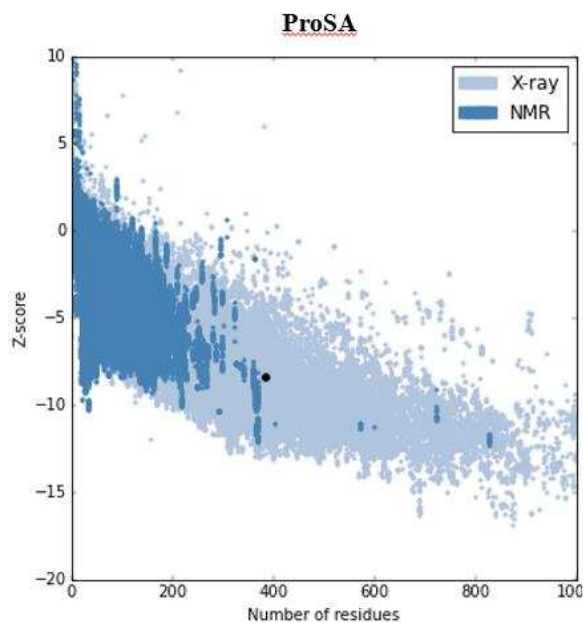
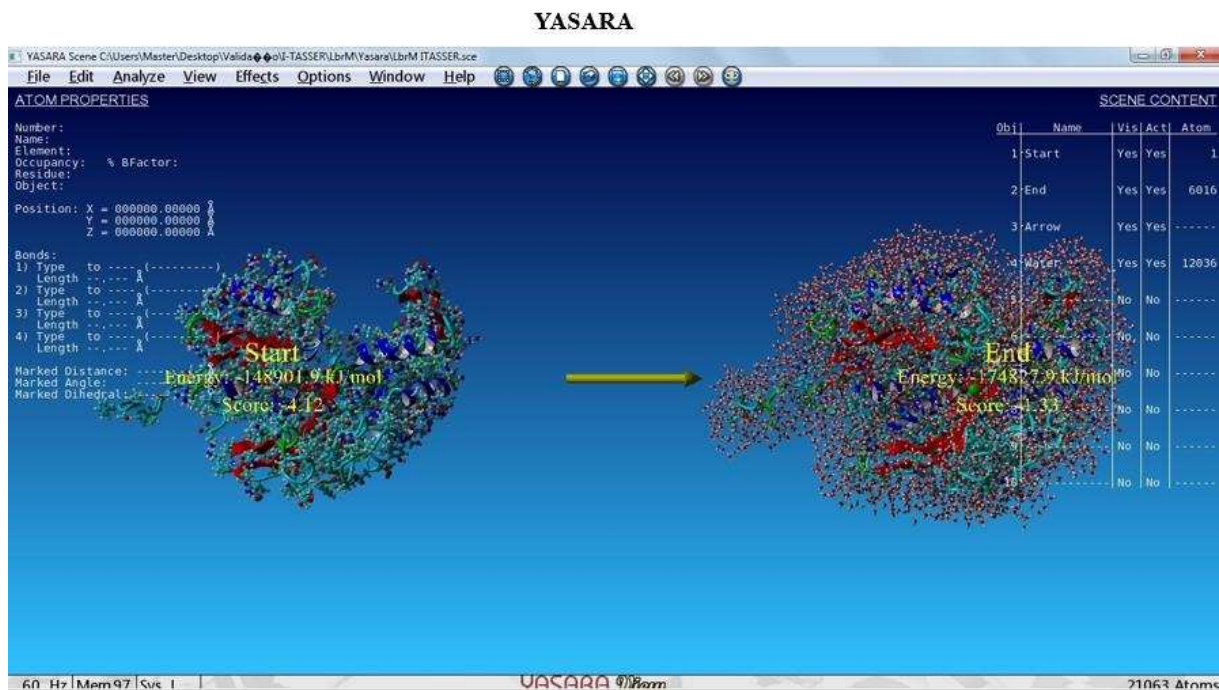
RAMPAGE



Evaluation of residues

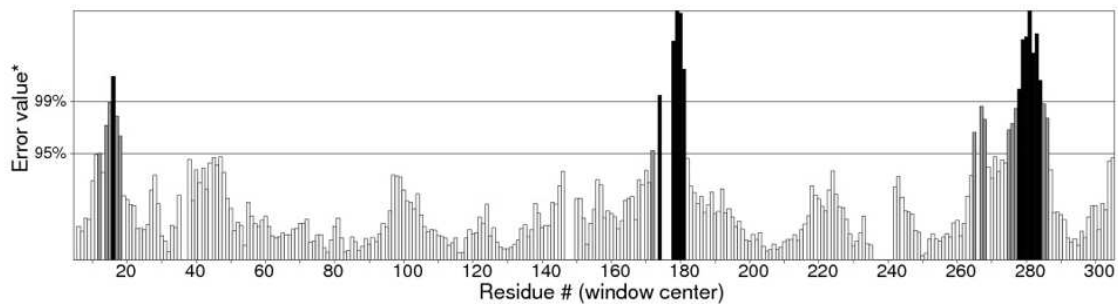
Residue [A 2 :HET]	(-82.85, 47.95)	In Allowed region
Residue [A 5 :CVS]	(-85.81, 25.88)	In Allowed region
Residue [A 9 :TYR]	(-65.68, 89.69)	In Allowed region
Residue [A 28 :VAL]	(-123.54, 76.54)	In Allowed region
Residue [A 93 :ALA]	(-46.74, -20.68)	In Allowed region
Residue [A 98 :LEU]	(-135.33, 53.10)	In Allowed region
Residue [A 101 :ALA]	(-85.83, -67.91)	In Allowed region
Residue [A 166 :GLU]	(59.17, 179.90)	In Allowed region
Residue [A 188 :THR]	(-148.32, 89.33)	In Allowed region
Residue [A 222 :THR]	(-133.82, -127.12)	In Allowed region
Residue [A 224 :PRO]	(-82.40, 49.73)	In Allowed region
Residue [A 238 :GLY]	(-119.81, -57.70)	In Allowed region
Residue [A 244 :GLY]	(-144.85, 43.54)	In Allowed region
Residue [A 246 :SER]	(-153.58, -35.24)	In Allowed region
Residue [A 273 :GLY]	(-63.37, -38.87)	In Allowed region
Residue [A 298 :PRO]	(-79.15, -82.35)	In Allowed region
Residue [A 306 :GLY]	(-71.77, -48.61)	In Allowed region
Residue [A 306 :GLY]	(-65.73, -131.56)	In Allowed region
Residue [A 306 :GLY]	(-189.86, -115.32)	In Allowed region
Residue [A 328 :HIS]	(-130.59, 72.82)	In Allowed region
Residue [A 357 :ARG]	(-59.26, 124.81)	In Allowed region
Residue [A 3 :SER]	(-104.34, -48.99)	In outlier region
Residue [A 37 :GLY]	(-155.78, -1.48)	In outlier region
Residue [A 50 :PRO]	(-64.47, 34.83)	In outlier region
Residue [A 109 :PRO]	(-66.57, -82.83)	In outlier region
Residue [A 109 :PRO]	(-54.62, 96.51)	In outlier region
Residue [A 159 :TYR]	(-51.82, -16.34)	In outlier region
Residue [A 233 :SER]	(-158.80, -45.89)	In outlier region
Residue [A 245 :ASP]	(33.24, 173.18)	In outlier region
Residue [A 284 :GLY]	(-64.89, -166.81)	In outlier region
Residue [A 284 :GLY]	(111.87, -21.80)	In outlier region
Number of residues in favoured region (-98.08 expected)		: 351 (91.6%)
Number of residues in allowed region (-2.88 expected)		: 22 (5.7%)
Number of residues in outlier region		: 10 (2.6%)

Validações para o modelo ET/NSL-NTPDase2



ERRAT

Program: ERRAT2
File: /var/www/SAVES/Jobs/9878578//erratt.pdb
Chain#:1
Overall quality factor**: 92.500



*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.
**Expressed as the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structures generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3Å) the average overall quality factor is around 91%.

Verify 3D

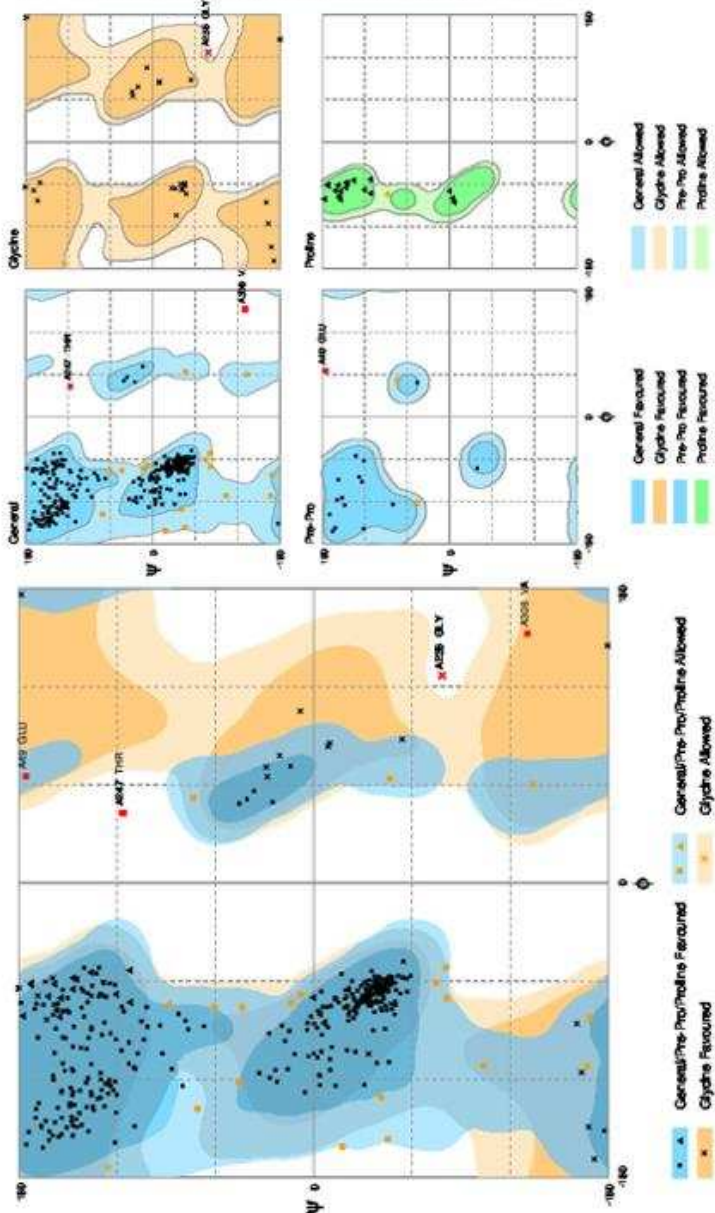
Verify 3D Results plot

94.29% of the residues had an averaged 3D-1D score ≥ 0.2

Pass

At least 80% of the amino acids have scored ≥ 0.2 in the 3D/1D profile.

RAMPAGE



Evaluation of residues

Residue [A 6 :ASU]	(-73.14, 13.92)	in Allowed region
Residue [A 35 :SER]	(-137.95, 70.94)	in Allowed region
Residue [A 42 :ARG]	(-111.69, -103.71)	in Allowed region
Residue [A 92 :THR]	(-111.89, -166.84)	in Allowed region
Residue [A 98 :LEU]	(-121.84, -45.99)	in Allowed region
Residue [A 101 :ALA]	(-156.41, -45.30)	in Allowed region
Residue [A 145 :ASP]	(-75.45, 60.63)	in Allowed region
Residue [A 148 :ASP]	(-70.35, -81.26)	in Allowed region
Residue [A 149 :LYS]	(-130.82, -41.03)	in Allowed region
Residue [A 162 :ALA]	(64.01, -46.55)	in Allowed region
Residue [A 178 :LEU]	(52.19, 73.63)	in Allowed region
Residue [A 180 :PRO]	(-60.74, -74.83)	in Allowed region
Residue [A 222 :THR]	(-160.95, -17.52)	in Allowed region
Residue [A 244 :GLY]	(-173.01, 125.14)	in Allowed region
Residue [A 273 :ALA]	(-51.51, -80.83)	in Allowed region
Residue [A 274 :ARG]	(-75.92, 43.75)	in Allowed region
Residue [A 282 :PRO]	(-74.16, 89.02)	in Allowed region
Residue [A 292 :SER]	(60.41, -133.62)	in Allowed region
Residue [A 354 :SER]	(-82.51, -168.91)	in Allowed region
Residue [A 356 :ASP]	(-68.34, 7.66)	in Allowed region
Residue [A 49 :GLU]	(65.43, 175.76)	in Outlier region
Residue [A 238 :GLY]	(126.74, -78.41)	in Outlier region
Residue [A 247 :THR]	(43.01, 116.48)	in Outlier region
Residue [A 308 :VAL]	(152.60, -130.50)	in Outlier region

Number of residues in favoured region : 359 (93.7%)
 Number of residues in allowed region : 20 (5.2%)
 Number of residues in outlier region : 4 (1.0%)
 (-98.0% expected)
 (-72.0% expected)