

CHRISTIANE MARIOTINI MOURA

**ESTUDO BIOLÓGICO E BIOQUÍMICO DAS NTPDASES de
Trypanosoma cruzi E *Leishmania infantum chagasi* E BUSCA POR
NOVOS COMPOSTOS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE
CHAGAS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

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

T

M929e
2014

Moura, Christiane Mariotini, 1982-
Estudo biológico e bioquímico das NTPDases de
Trypanosoma cruzi e *Leishmania infantum chagasi* e busca
por novos compostos para o tratamento da doença de
Chagas / Christiane Mariotini Moura. - Viçosa, MG, 2014.
ix, 115f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador : Juliana Lopes Rangel Fietto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. NTPDases. 2. Inibidores. 3. Quimioterapia. 4. Chagas,
Doença de. 5. *Trypanosoma cruzi*. 6. *Leishmania*.
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. 572.7

CHRISTIANE MARIOTINI MOURA

**ESTUDO BIOLÓGICO E BIOQUÍMICO DAS NTPDASES de
Trypanosoma cruzi E *Leishmania infantum chagasi* E BUSCA POR
NOVOS COMPOSTOS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE
CHAGAS**

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

APROVADA: 18 de Dezembro de 2014.

Prof. Gaspar Diaz Muñoz

Prof. Robson Ricardo Teixeira

Prof. João Paulo Viana Leite

Prof. Eduardo de Almeida Marques da
Silva

Profa. Juliana Lopes Rangel Fietto
(Orientadora)

À minha família, em especial à minha filha Giovanna, que trouxe novo sentido à minha vida e tem me ensinado tanto.

Amor maior que eu!

"O temor do SENHOR é o princípio do conhecimento; os loucos desprezam a sabedoria e a instrução."

Provérbios 1:7

AGRADECIMENTOS

A Deus, por nunca me abandonar, mesmo nos muitos momentos de dúvida.

À minha família, construída com muito amor, pilar da minha vida.

Ao Raphael, companheiro de trabalho e de vida, marido, pai e profissional exemplar.

Aos meus amigos, pelos momentos de lazer e distração, que tornaram essa jornada mais agradável.

A Universidade Federal de Viçosa e ao departamento de Biologia Geral pelo programa de Pós-Graduação.

À minha orientadora Juliana Lopes Rangel Fietto, pela dedicação, amizade e experiência compartilhada, tanto científica quanto de vida.

Aos professores que colaboraram conosco durante todos esses anos.

A todos os professores, pelo conhecimento transmitido.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Aos amigos do LIMA, que compartilharam dessa jornada. Serão sempre lembrados.

A todos que de alguma forma contribuíram para este momento.

Muito obrigada!

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	viii
CAPÍTULO I: Busca por inibidores da NTPDase-1 de <i>Trypanosoma cruzi</i> e outros compostos como estratégia no desenho racional de novas drogas para o tratamento da doença de Chagas	01
1. Introdução	02
2. Revisão da Literatura.....	05
3. Objetivos e metas propostos.....	17
4. Material e Métodos.....	18
5. Resultados e Discussão.....	28
6. Conclusões e Perspectivas.....	67
7. Referências.....	68
ANEXO I.....	79
ANEXO II.....	82
ANEXO III.....	85
ANEXO IV.....	89
ANEXO V.....	90
ANEXO VI.....	91
CAPÍTULO II: <i>Trypanosoma cruzi</i> nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in cell adhesion	92
CAPÍTULO III: <i>Leishmania infantum</i> ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 is an apyrase involved in macrophage infection and expressed in infected dogs.....	101

RESUMO

MOURA, Christiane Mariotini, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Dezembro de 2014. **Estudo biológico e bioquímico das NTPDases de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum chagasi* e busca por novos compostos para o tratamento da doença de Chagas.** Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto. Coorientadores: Márcia Rogéria de Almeida Lamego, Abelardo da Silva Júnior e Gustavo Costa Bressan

As doenças tropicais negligenciadas persistem ainda como graves problemas de saúde pública em vários países, incluindo o Brasil. Dentre elas estão: a doença de Chagas e as Leishmanioses, causadas por *Trypanosoma cruzi* e espécies do gênero *Leishmania*, respectivamente. As ectonucleotidases da família das E-NTPDases são enzimas capazes de hidrolisar nucleotídeos tri e/ou difosfatados, que atuam como sinalizadores em vários processos celulares. A hidrólise de ATP extracelular possui papel na infectividade e virulência de *T. cruzi*, bem como para *Leishmania*. As enzimas NTPDase-1 de *T. cruzi* (TcNTPDase-1) e NTPDase-2 de *Leishmania infantum chagasi* (LicNTPDase-2) demonstraram serem moléculas pró-adesão, agindo como facilitadores na infecção de células VERO e macrófagos, respectivamente. Uma expressão ubíqua dessas duas enzimas sugere ainda que elas podem estar envolvidas em diferentes processos biológicos, e apresentar funções desconhecidas. A detecção da LicNTPDase-2 em tecidos de cães diagnosticados com leishmaniose visceral, indica uma importância das ENTPDases na infecção natural. A descoberta de moléculas envolvidas com o processo de infecção é uma alternativa em potencial para o desenho racional de novas drogas. Para a doença de Chagas, atualmente, somente duas drogas são utilizadas para o tratamento, porém ambas apresentam sérios efeitos colaterais e não são efetivas na fase crônica da doença. Sendo assim, é urgente o desenvolvimento de um tratamento menos nocivo e mais eficiente. A TcNTPDase-1 recombinante foi expressa e purificada, e foram encontrados extratos capazes de abolir totalmente sua atividade nucleotidásica. A partir de um desses extratos foi extraído o composto puro bioativo responsável pela inibição. A ligação deste composto ao sítio ativo da enzima foi avaliada por modelagem molecular. Esses e outros extratos e

compostos foram testados sobre o parasito e células de mamíferos. Um composto da classe das isobenzofuranonas apresentou eficiência contra os parasitos comparável à da droga de referência, o benzonidazol. A baixa toxicidade apresentada pelo composto para as células hospedeiras foi revertida ao final de 72 horas. O estudo desses compostos e sua modificação e otimização poderia fornecer ferramentas para o desenvolvimento de novos compostos, com potencial para uma nova droga para o tratamento da doença de Chagas.

ABSTRACT

MOURA, Christiane Mariotini, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2014. **Biological and biochemical study of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum chagasi* NTPDases and search for new compounds for the treatment of Chagas disease.** Adviser: Juliana Lopes Rangel Fietto. Co-advisers: Márcia Rogéria de Almeida Lamego, Abelardo da Silva Júnior and Gustavo Costa Bressan

Neglected tropical diseases persist as major public health problem in many countries, including Brazil. These include: Chagas disease and Leishmaniasis, caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* species, respectively. The ectonucleotidases of the E-NTPDase family are enzymes that hydrolyze tri and / or diphosphate nucleotides, which act as signaling molecules in various cellular processes. Extracellular ATP hydrolysis has role in infectivity and virulence of *T. cruzi* and *Leishmania*. The enzymes NTPDase-1 of *T. cruzi* (TcNTPDase-1) and NTPDase-2 of *Leishmania infantum chagasi* (LicNTPDase-2) were demonstrated to be pro-adhesion molecules, acting as facilitators at the infection of VERO cells and macrophages, respectively. A ubiquitous expression of these two enzymes suggests that they may be involved in different biological processes, and present unknown functions. Detection of LicNTPDase-2 in dog tissues diagnosed with visceral leishmaniasis indicates an importance of ENTPDases in natural infection. The discovery of molecules involved in the infection process is a potential alternative to rational design of new drugs. For Chagas disease, currently, only two drugs are used for treatment, but both have serious side effects and are not effective in the chronic phase of the disease. Therefore, it is urgent to develop a less harmful and more efficient treatment. Recombinant TcNTPDase-1 was expressed and purified, and a few extracts were able to abolish its ectonucleotidase activity. From one of these extracts was extracted a pure bioactive compound, responsible for the inhibition. The binding of this compound to the active site of the enzyme, was evaluated by molecular modeling. These and other extracts and compounds were tested upon the parasite and mammalian cells. A compound of the isobenzofuranonas class presented efficiency against the parasites comparable to the reference drug, benznidazole. The low toxicity of the compound toward host cells was reversed after 72 hours. The study of these compounds and their modification and optimization

could provide tools for the development of new compounds with potential for a new drug for the treatment of Chagas disease.

Capítulo I

BUSCA POR INIBIDORES DA NTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi* E OUTROS COMPOSTOS COMO ESTRATÉGIA NO DESENHO RACIONAL DE NOVAS DROGAS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS

1. Introdução

Descoberta há mais de um século, a doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, ainda persiste como um grave problema de saúde pública, figurando como uma das doenças tropicais negligenciadas de maior impacto na América Latina, com uma incidência anual de 50.000 novos casos (Hotez *et al.*, 2008) e cerca de 8 milhões de pessoas infectadas pelo parasito em todo o mundo (Who, 2014). A doença de Chagas figura como negligenciada nas intenções, principalmente, de indústrias farmacêuticas (Amato Neto e Pasternak, 2009). Devido a isso, o conhecimento produzido por pesquisas relacionadas não se reverte em avanços terapêuticos (Ministériodasaúde, 2010).

Atualmente, somente duas drogas são utilizadas para o tratamento da doença de Chagas, o benzonidazol e o nifurtimox, que não se encontram comercialmente disponíveis no Brasil (Fiocruz, 2013). Além disso, ambas apresentam sérios efeitos colaterais e não são efetivas na fase crônica, com apenas 20% de cura em média (Coura e Borges-Pereira, 2012), sendo que, no Brasil, 97% das mortes ocorrem nesta fase (Martins-Melo *et al.*, 2012).

Tendo em vista o número expressivo de casos da doença no continente Americano, bem como no Brasil, a morbidade causada e a ineficiência e toxicidade do tratamento com as únicas duas drogas atualmente disponíveis, pode-se afirmar que é de extrema importância o desenvolvimento de alternativas de tratamento menos nocivas e mais eficientes. Neste contexto, a descoberta de moléculas envolvidas com o processo de infecção e o conhecimento da função destas biomoléculas é uma alternativa em potencial para o desenho racional de novas drogas que possam ser usadas no tratamento desta infecção.

T. cruzi é um protozoário hemoflagelado pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, conhecido como agente etiológico da Doença de Chagas (Chagas, 1909). Este parasito é naturalmente transmitido ao homem pelas fezes de insetos triatomíneos hematófagos contaminados. O parasito pode ainda ser transmitido verticalmente, por transfusão de sangue e transplante de órgãos, e por via oral, pela ingestão de alimentos contaminados (Rassi *et al.*, 2010).

Por ser um parasito intracelular obrigatório no hospedeiro vertebrado, a invasão da célula hospedeira tem um papel fundamental na manutenção e amplificação da infecção. Os primeiros passos do processo de interação *T. cruzi*-célula hospedeira podem ser divididos em três fases: a adesão e reconhecimento, sinalização e invasão (De Souza, W. *et al.*, 2010). As moléculas que figuram nestes eventos são o foco de diversos estudos que visam encontrar alvos para uma terapia efetiva contra a doença de Chagas.

As E-NTPDases são ectonucleotidases descritas, de uma maneira geral, como proteínas de superfície de membrana ou solúveis (secretadas), e tem como principal função a degradação de nucleotídeos, especialmente extracelulares, di e/ou trifosfatados. Os membros dessa família de enzimas, as apirases, podem apresentar baixa identidade de aminoácidos, no entanto, apresentam cinco regiões altamente conservadas, denominadas ACRs (Apyrase Conserved Regions) (Handa e Guidotti, 1996; Schulte Am Esch *et al.*, 1999). Essas enzimas são muito importantes para vários processos biológicos e tem sido estudadas com relação à sua importância em infecções causadas por patógenos (Sansom, Robson, *et al.*, 2008), sendo avaliadas inclusive como candidatos vacinais (Manque *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2011) e como antígeno para métodos diagnósticos (De Souza *et al.*, 2013).

Para diversos patógenos, a família das E-NTPDases já foi demonstrada como importante para a sua nutrição, bem como para o controle de respostas biológicas relacionadas com a hidrólise de ATP extracelular (ATPe) e seus derivados, dentre estas: virulência, sobrevivência intracelular, adesão celular e modulação do sistema imune do hospedeiro (Asai *et al.*, 1995; Nakaar *et al.*, 1999; Barros *et al.*, 2000; Sansom *et al.*, 2007; De Almeida Marques-Da-Silva *et al.*, 2008; Sansom, Riedmaier, *et al.*, 2008; De Souza, M. C. *et al.*, 2010; Manque *et al.*, 2012; Porcino *et al.*, 2012; Detoni *et al.*, 2013).

T. cruzi apresenta somente uma E-NTPDase descrita até o momento, a NTPDase-1 (TcNTPDase-1) (Fietto *et al.*, 2004). A presença de uma atividade de hidrólise E-NTPDásica na superfície externa do parasito, maior na forma infecciosa (tripomastigota), sugere o envolvimento deste fenômeno na capacidade infecciosa do parasito (Fietto *et al.*, 2004). Além disso, através do

uso de anticorpos policlonais e inibidores específicos, foi demonstrado na proteína recombinante, no parasito e na infecção *in vitro* que a inibição mesmo que parcial da NTPDase-1, bem como da atividade ecto-nucleotidásica, está diretamente ligada a infecciosidade e virulência de *T. cruzi* em modelo murino (Santos *et al.*, 2009). Estudos da adesão do parasito à célula hospedeira também indicam a participação da TcNTPDase-1 como uma molécula pró-adesão. Estes dados nos levaram a postular que a TcNTPDase-1 é um alvo em potencial para o desenho racional de novas drogas para uso no tratamento da doença de Chagas (Mariotini-Moura *et al.*, 2014).

Neste capítulo, mostramos a otimização de protocolos de expressão, purificação e renaturação da NTPDase-1 de *T. cruzi*, e a busca de compostos inibidores da atividade nucleotidásica, visando gerar ferramentas para o estudo do papel desta enzima. Ademais, os compostos não inibidores da enzima foram testados no crescimento de culturas da forma epimastigota do parasito e também de células de mamíferos, na busca por moléculas com atividade tripanocida, que possam ser utilizadas no desenho de novas drogas mais efetivas e menos tóxicas para o tratamento da doença de Chagas.

2. Revisão da Literatura

2.1. Doença de Chagas

A Doença de Chagas caracteriza-se por duas fases distintas: uma fase aguda e uma fase crônica. A fase aguda inicia-se 6-10 dias após a infecção com duração de cerca de 4-8 semanas. Essa fase apresenta alta parasitemia, e é assintomática ou oligossintomática na grande maioria dos casos. Entretanto, dependendo do local de inoculação, apresenta manifestações locais, como quando *T. cruzi* penetra na conjuntiva causando um edema bipalpebral unilateral (sinal de Romaña), ou na pele, causando um edema pela picada do triatomíneo (chagoma de inoculação) (Who, 2014). Existem ainda algumas manifestações gerais como, febre, edema generalizado, mialgia, dor abdominal, dores de cabeça, diarreia, poliadenia, hepatomegalia, esplenomegalia, dispnéia, podendo vir acompanhada também de insuficiência cardíaca e perturbações neurológicas, entre outras (Prata, 2001). Durante esta fase, todos os tipos de células nucleadas no hospedeiro humano podem ser infectadas. A resposta imune do organismo leva à redução substancial da parasitemia, sinalizando o fim da fase aguda e início da fase crônica, caracterizada pela infecção de tecidos específicos (Rassi *et al.*, 2010).

Durante a fase crônica, os parasitos se encontram nos tecidos-alvo, especialmente coração e musculatura lisa do trato digestivo. Essa fase pode ser assintomática (forma indeterminada ou latente), ocorrendo tipicamente no início da fase crônica e durando a vida toda na maioria dos pacientes (70%), ou sintomática, que pode evoluir após a fase de latência e apresentar sintomatologia relacionada com o sistema cardiovascular (forma cardíaca), digestivo (forma digestiva), ou ambos (forma mista), causando cardiomiopatias e megavísceras. Uma suposta fase neurológica, embora descrita pelo próprio Carlos Chagas, ainda é a menos estudada e pouco se sabe sobre ela (Who/Trs, 2009).

Diversos estudos tem sido realizados ao longo dos anos na tentativa de elucidar a patogenia da infecção por *T. cruzi*. É sabido que os danos causados durante a fase aguda da infecção são causados pelo parasito em si e pela

resposta imune inflamatória aguda do hospedeiro, desencadeada pela presença do parasito (Andrade, 1999). Porém, a patogênese da fase crônica da doença de Chagas parece ser independente da presença do parasito, e os mecanismos que causam as lesões nos tecidos nesta fase ainda não são claros e permanecem como tema de discussão (Rodrigues Coura e De Castro, 2002; WHO/Trs, 2009; Alvarez *et al.*, 2014). Sabe-se, no entanto, que diversos fatores atuam direta ou indiretamente no aparecimento das lesões produzidas por *T. cruzi*. Alguns desses fatores estão relacionados ao parasito (tropismo celular, virulência da cepa, re-infecção, infecções mistas etc.), enquanto outros são inerentes ao hospedeiro (constituição genética, sexo, idade, raça, resposta imune, nutrição etc.) (Tafari, 1987). Pode-se notar com isso, que como em outras doenças parasitárias, também na doença de Chagas, os mecanismos pelos quais *T. cruzi* determina as lesões são multifatoriais.

2.2. Quimioterapia da doença de Chagas

A busca por compostos para o tratamento da doença de Chagas começou logo após a descoberta da infecção, mas sem resultados eficazes (revisado em (Rodrigues Coura e De Castro, 2002)). Somente mais de 50 anos depois, em 1966, a Roche® introduziu o Benzonidazol (figura 1) e em 1970 o Nifurtimox (figura 1) foi produzido comercialmente como medicamento antichagásico pela Bayer® (Rodrigues Coura e De Castro, 2002). No entanto, nos anos 80 o Nifurtimox teve sua comercialização interrompida no Brasil devido aos diversos efeitos colaterais causados aos pacientes. O Brasil é o único produtor mundial do benzonidazol, o qual é produzido e distribuído pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (Lafepe).

Nifurtimox, 5-nitrofurano (3-metil-*N*-[(5-nitro-2-furanil)-metileno]-4-tiomorfolinamina-1,1-dioxida) e benzonidazol (*N*-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida) são comercializados, respectivamente, com os nomes Lampit e Rochagan. O benzonidazol age por *stress* reductivo, causando modificações covalentes em macromoléculas, como o DNA, através de intermediários nitroreductores, levando à perda da capacidade de multiplicação do parasito e

morte (Polak e Richle, 1978). O nifurtimox causa dano oxidativo através da geração de radicais nitroaniônicos que, na presença de oxigênio, produzem intermediários reativos aos quais *T. cruzi* é sensível, por ser parcialmente deficiente na eliminação de radicais livres (Docampo, 1990).

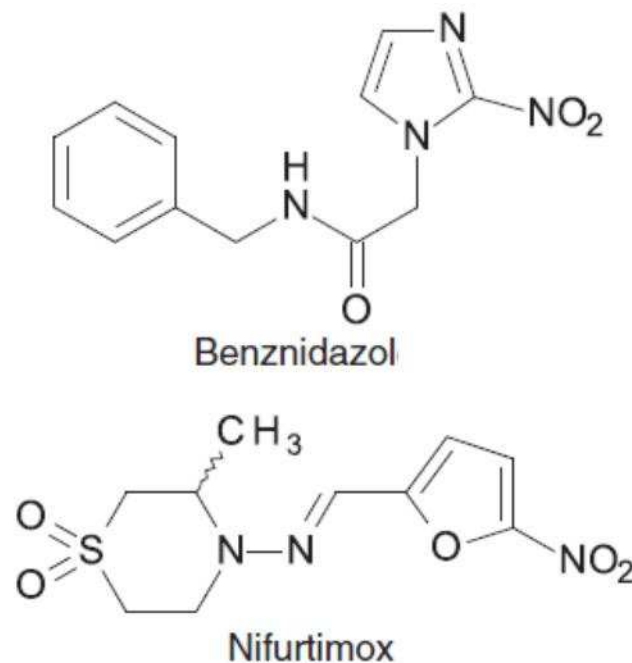


Figura 1- Estrutura química dos compostos utilizados para o tratamento da doença de Chagas. Benzonidazol e Nifurtimox.

Para eliminar o parasito, ambos benzonidazol e nifurtimox (figura 1) são efetivos caso o tratamento seja iniciado logo após a infecção. O tratamento também é indicado em casos de reativação (e.g. imunossupressão), em crianças com infecção congênita e pacientes no início da fase crônica. Porém, a indicação do tratamento deve considerar as reações adversas, que ocorrem em cerca de 40% dos pacientes tratados (Who, 2014).

Entre os efeitos colaterais causados por essas duas drogas estão náuseas, erupções cutâneas, insuficiência renal e hepática. O nifurtimox pode ainda causar convulsões e neuropatias. Associado a isso, a falta de infra-estrutura e a duração do tratamento (60 dias) faz com que os pacientes não terminem o tratamento, reduzindo a eficácia da droga e aumentando a resistência (Marr e Docampo, 1986).

Durante todos esses anos desde a introdução do benzonidazol e nifurtimox, somente o alopurinol, itraconazol, fluconazol, posaconazol e ravuconazol chegaram a ensaios clínicos. No entanto, os ensaios clínicos recentes com *azóis*, especificamente posaconazol e a pró-droga ravuconazol E1224, foram decepcionantes, com falha do tratamento em pacientes com doença de Chagas atingindo 70% a 90%, em comparação a 6% a 30% de falha nos doentes tratados com benzonidazol (Chatelain, 2014).

2.3. *Transmissão vetorial e ciclo de vida do Trypanosoma cruzi*

Na América Latina, *T. cruzi* é transmitido principalmente pelo contato com as fezes de triatomíneos hematófagos infectados. Estes insetos geralmente vivem nas frestas de casas em áreas rurais ou suburbanas, costumam picar uma área exposta da pele, como a face, e defecam perto do local da mordida. Como *T. cruzi* não é capaz de penetrar na pele intacta, ao coçar, a pessoa causa microlesões que são contaminadas pelas fezes do triatomíneo, contendo os parasitos. Além disso, leva também parasitos aos olhos e boca, onde *T. cruzi* é capaz de penetrar nas mucosas intactas (e.g. conjuntiva, epitélio gástrico). Outras formas de transmissão incluem o consumo de alimentos contaminados, contato com fezes de triatomíneos infectados, transfusões de sangue, congênita (via placenta ou durante o parto), amamentação (de uma mãe infectada para o recém-nascido), transplantes utilizando órgãos de doadores infectados e acidentes de laboratório (Steverding, 2014; Who, 2014).

Embora a transmissão da doença de Chagas tenha sido eliminada em diversos países através de controle do triatomíneo vetor e triagem sorológica de

doadores de sangue (Dias *et al.*, 2002; Schmunis e Cruz, 2005), continua endêmica em regiões da América Latina. A doença de Chagas já foi inteiramente confinada à região das Américas, porém nas últimas décadas se tornou um problema emergente de saúde pública também em países não endêmicos, devido à migração de indivíduos infectados, principalmente no sul dos Estados Unidos e alguns países europeus (Gascon *et al.*, 2010; Schmunis e Yadon, 2010; Who, 2014).

Entre os tripanosomatídeos, *T. cruzi* apresenta um dos ciclos de vida mais complexos, envolvendo diversos estágios de desenvolvimento encontrados nos hospedeiros vertebrado e invertebrado (De Souza, 2002). As formas amastigotas são responsáveis pela multiplicação intracelular nos hospedeiros vertebrados (De Souza, 2002). Os epimastigotas são encontrados no intestino médio e posterior dos hospedeiros invertebrados onde se multiplicam ativamente por fissão binária (De Souza, 2002). Os tripomastigotas são considerados as formas infecciosas para os hospedeiros vertebrados. Existem as formas tripomastigotas de tecidos ou sanguíneos, derivados do ciclo intracelular de multiplicação, quando após são liberados para o meio extracelular, alcançando posteriormente os vasos sanguíneos. Existem ainda os tripomastigotas metacíclicos, provenientes da diferenciação nos insetos vetores, dos epimastigotas em tripomastigotas por um processo conhecido como metaciclogênese. Estes são naturalmente encontrados na ampola retal dos hospedeiros invertebrados e eliminados através das fezes e urina, representando, portanto, as formas infecciosas para os hospedeiros vertebrados, considerando o mecanismo de infecção natural, via transmissão vetorial (De Souza, 2002). A transmissão vetorial e o ciclo evolutivo de *T. cruzi* estão resumidos na figura 2.

Por ser um parasito intracelular obrigatório no hospedeiro vertebrado, a invasão da célula hospedeira tem um papel fundamental na manutenção e propagação da infecção. O processo de invasão pode ser dividido, simplificada, em três fases: (1) adesão do parasito à membrana da célula hospedeira; (2) internalização através da formação de um vacúolo parasitóforo; e (3) rompimento da membrana do vacúolo e liberação do parasito no citoplasma, onde ocorre sua replicação (De Souza, 1984). As moléculas que figuram nestes

eventos são o foco de diversos estudos que visam encontrar alvos para uma terapia efetiva contra a doença de Chagas.

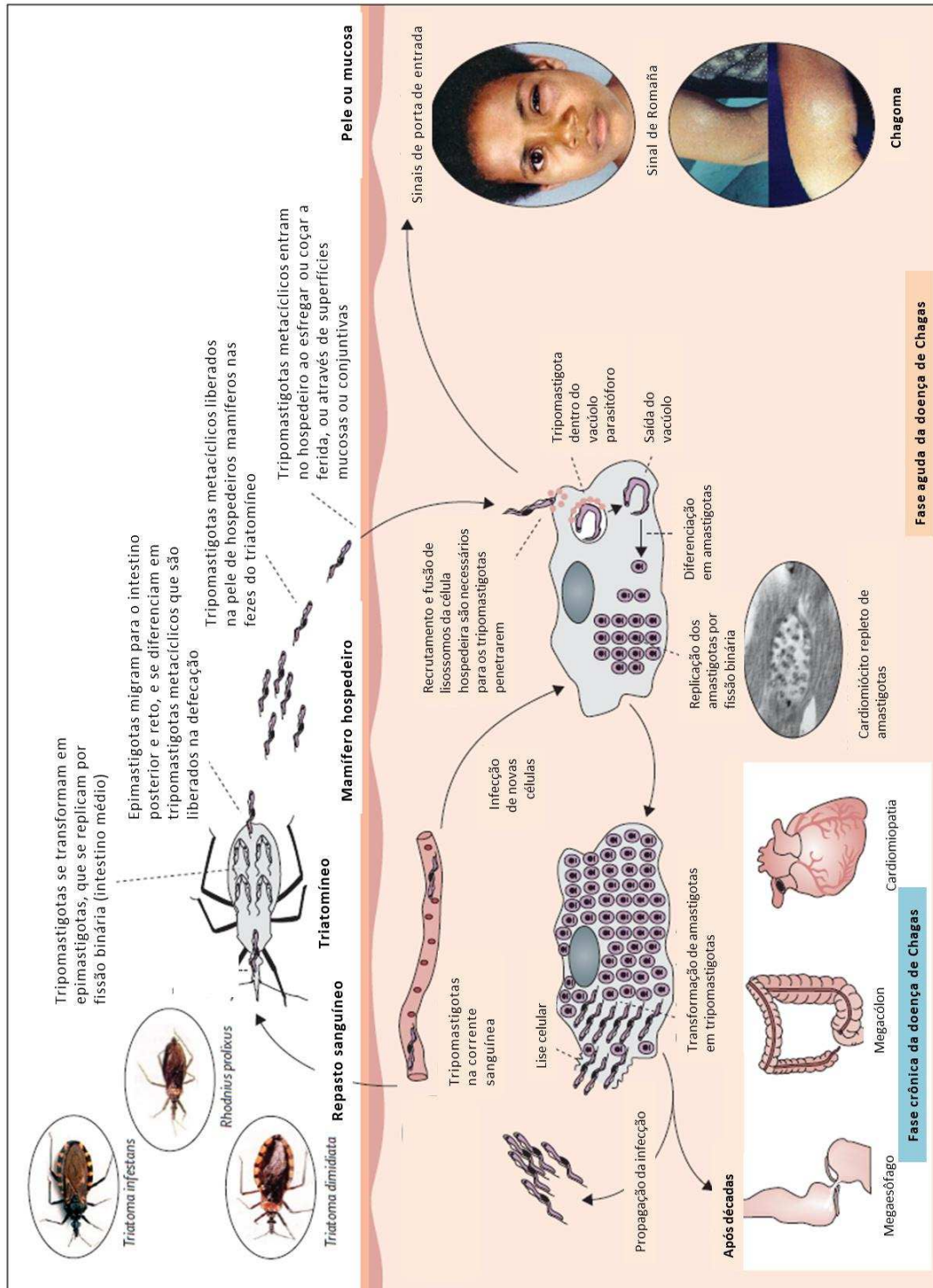


Figura 2- Representação esquemática da transmissão vetorial e ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Adaptado de Rassi, 2010

2.4. As Ecto-NTPDases

As apirases do tipo E-NTPDases são ectonucleotidases descritas, de uma maneira geral, como proteínas de superfície de membrana ou solúveis (excretadas) que têm como principal função a degradação de nucleotídeos, especialmente extracelulares, di e/ou trifosfatados. Essas enzimas são muito importantes para vários processos biológicos e são muito estudadas com relação à sua importância em infecções causadas por patógenos, incluindo protozoários como *T. cruzi* (Sansom, Robson, *et al.*, 2008).

Todas as enzimas pertencentes à família das apirases possuem cinco regiões altamente conservadas de apirase (ACRs) (Handa e Guidotti, 1996; Schulte Am Esch *et al.*, 1999), e mutações dentro das ACRs podem levar à perda da atividade bioquímica (Schulte Am Esch *et al.*, 1999).

As apirases possuem diferentes localizações subcelulares e, conseqüentemente, diferentes funções como participação na via de glicosilação de proteínas (Braun *et al.*, 2000; Sanchez *et al.*, 2003) e tromboregulação (Pinsky *et al.*, 2002). Membros da família das E-NTPDases são classificados em dois grupos, de acordo com sua topologia de membrana. As E-NTPDases 1, 2, 3, 4, 7 e 8 possuem predição de domínio transmembrana N- e C-terminal, enquanto as NTPDases 5 e 6 possuem predição somente N-terminal (figura 3) (Zimmermann, 2000; 2001; Sansom, Robson, *et al.*, 2008).

T. cruzi apresenta até o momento somente uma E-NTPDase descrita, a NTPDase-1 (Fietto *et al.*, 2004). O parasito intacto é capaz de hidrolisar os nucleotídeos ATP, ADP, UTP, UDP, GTP e GDP, e apresenta proteínas imunorreativas com antisoro anti-NTPDase de *Toxoplasma gondii*, na superfície da membrana de todas as formas do parasito (Fietto *et al.*, 2004). A forma infectante (tripomastigota) apresenta hidrólise significativamente maior de ATP em relação ao ADP, comparada com a forma não-infectante (epimastigota), o que sugere uma participação dessa atividade com o processo infeccioso (Fietto *et al.*, 2004).

Sabe-se que o ATP extracelular (ATP_e), e seus produtos de degradação ADP_e, AMP_e e adenosina_e, bem como outros nucleotídeos e nucleosídeos, são

componentes normais do meio extracelular e estão envolvidos com vários efeitos biológicos em diferentes células, tecidos e órgãos (Dombrowski *et al.*, 1998). Para que estas inúmeras respostas ocorram, é preciso que ocorra o reconhecimento destes nucleotídeos pelos purinoreceptores para que a célula possa captar o sinal e definir a resposta.

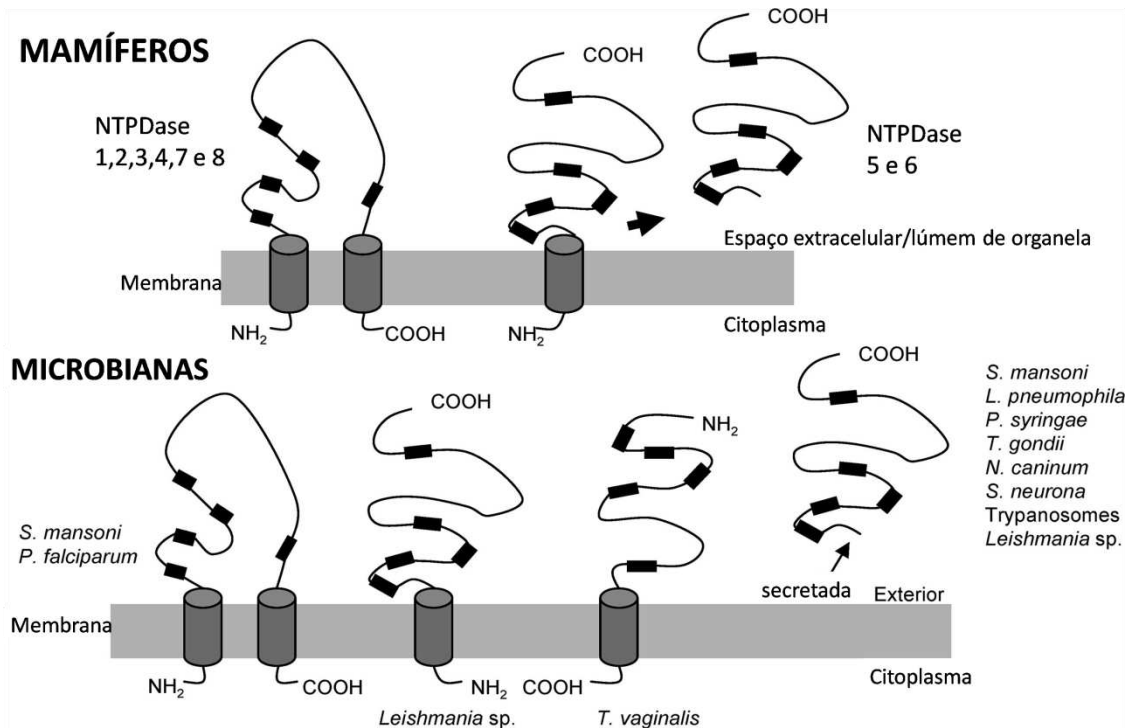


Figura 3- Representação esquemática de localizações subcelulares conhecidas ou preditas encontradas em humanos e patógenos, baseada em evidências experimentais e motivos presentes nas sequências das proteínas. Cilindros representam os domínios transmembrana, e retângulos pretos representam as ACRs. Adaptada de Sansom, 2008.

A penetração de *T. cruzi* nas células hospedeiras envolve uma série combinada de eventos que culmina com a mobilização de Ca²⁺ celular, com esse aumento ocorrendo inicialmente nas células hospedeiras, seguido por um aumento citosólico de cálcio no parasito, logo após a adesão parasito-célula hospedeira (Moreno *et al.*, 1994; Tardieux *et al.*, 1994; Burleigh e Andrews, 1995a; b; Docampo e Moreno, 1996; Burleigh e Andrews, 1998). Sabe-se que as formas infectantes de *T. cruzi* secretam um fator solúvel de estrutura desconhecida, capaz de estimular sinais de Ca²⁺ nas células hospedeiras

(Burleigh e Andrews, 1995a), este fator poderia ser a NTPDase-1 ou uma outra enzima com atividade ecto-nucleotidásica.

De uma maneira geral, a concentração extracelular dos nucleotídeos e a presença de subtipos diferentes de receptores nas células regulam a resposta celular a estas biomoléculas e, por sua vez, a presença e concentração dos nucleotídeos são reguladas pela ação de enzimas metabolizadoras destes.

Em estudo prévio (Santos *et al.*, 2009) observou-se com o cultivo de tripomastigotas em células VERO, que após três passagens celulares, apenas uma pequena fração dos tripomastigotas era capaz de realizar uma quarta passagem, e que esses parasitos (tripomastigotas) apresentavam níveis 2,5 vezes maiores de atividade ecto-ATPásica quando comparados com parasitas que não foram capazes de penetrar nas células. Foram realizados também ensaios com três conhecidos inibidores de E-NTPDases: ARL67156, gadolinium e suramina. Observou-se que tripomastigotas de primeira passagem tratados com esses inibidores, especialmente a Suramina, mostraram redução significativa da infectividade *in vitro* e da virulência *in vivo* (em modelo murino). A suramina também inibiu a NTPDase-1 recombinante de *T. cruzi*. Porém, por não serem inibidores específicos, não é possível excluir a possibilidade de uma atividade adicional em outras moléculas-alvo. No entanto, o mesmo efeito inibitório da infecção *in vitro* foi verificado com adição de anti-soro policlonal anti-NTPDase1 recombinante, o que reforça a possível participação desta enzima ou homólogos como facilitadores da infecção. Apesar da provável participação da NTPDase-1 no processo infeccioso, não se conhece o mecanismo molecular exato da indução de perda de infectuosidade e virulência observadas.

Estudos da adesão do parasito à célula hospedeira também indicam a participação da TcNTPDase-1 como uma molécula pró-adesão. Estes dados levam a postular que a TcNTPDase-1 é um alvo em potencial para o desenho racional de novas drogas para uso no tratamento da doença de Chagas (Mariotini-Moura *et al.*, 2014). Ademais, verificou-se uma distribuição ubíqua da proteína na forma epimastigota do parasito, predominantemente no corpo celular, núcleo, flagelo e bolso flagelar, além de cinetoplasto, vesículas citoplasmáticas e superfícies externa e interna (Mariotini-Moura *et al.*, 2014). O

mesmo perfil difuso foi observado em promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* (Porcino *et al.*, 2012; Detoni *et al.*, 2013). Os dados descritos acima sugerem, portanto, a participação das NTPDases em diferentes processos biológicos nesses parasitos.

2.5. Sinalização Purinérgica

Por muitos anos, o interesse nas purinas e pirimidinas resumiu-se ao envolvimento do ATP no metabolismo e em seu papel como fonte de energia (Abbracchio e Burnstock, 1998). Em 1972, Burnstock observou a participação das purinas em mecanismos de sinalização no sistema nervoso autônomo, e utilizou, pela primeira vez, o termo “purinérgico” (Burnstock, 1972). Hoje se sabe que não somente as purinas, mas também as pirimidinas possuem papel como moléculas sinalizadoras, existindo diversos exemplos de sinalização purinérgica com efeitos biológicos conhecidos, como proliferação celular, diferenciação, migração e morte (Burnstock, 2006).

A duração e magnitude da sinalização purinérgica são regidas por uma rede de ecto-enzimas, incluindo as enzimas da família nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase) (Yegutkin, 2014). Em diversos tecidos, incluindo o sistema imune, o ATP e outros nucleosídeos tri e difosfatados são hidrolisados por essas enzimas, também chamadas de apirases (Kaczmarek *et al.*, 1996; Kegel *et al.*, 1997; Atkinson *et al.*, 2006). A enzima ecto-5'-nucleotidase catalisa o passo final da hidrólise dos nucleotídeos, hidrolisando nucleosídeos monofosfatados a nucleosídeo e Pi (Zimmermann, 2000). As ectonucleotidases degradam rapidamente ATP a ADP, AMP e adenosina. Esta degradação enzimática traz outro nível de complexidade para sinalização purinérgica, já que os produtos de degradação do ATP também são transmissores químicos importantes (Burnstock e Boeynaems, 2014).

Danos em qualquer célula viva provoca liberação maciça de ATP citosólico, e, portanto, o ATP é um sinalizador universal de dano, uma função conservada evolutivamente. O ATPe é um dos principais mediadores dos numerosos sistemas de defesa biológica e está envolvido em efeitos citostáticos e citotóxicos em vários tumores, além de ser necessário para a secreção de

algumas citocinas (Burnstock e Boeynaems, 2014). O ADP extracelular estimula a agregação plaquetária e o UDP estimula a liberação de IL-8 por monócitos (Dombrowski *et al.*, 1998).

A adenosina extracelular resultante pode ser transportada e incorporada em vias de recuperação de purinas, nos diversos parasitos que não possuem a via de síntese *de novo*. Além disso, o acúmulo de adenosina extracelular apresenta papel imunomodulador, contribuindo para o estabelecimento da infecção por esses parasitos (Maioli *et al.*, 2004; Abbracchio e Ceruti, 2007; De Almeida Marques-Da-Silva *et al.*, 2008). Contudo, como dito anteriormente, para que estas respostas ocorram é necessário o reconhecimento destes nucleotídeos pelos purinoreceptores.

Os purinoreceptores são proteínas ancoradas à membrana celular que se ligam a purinas e/ou pirimidinas. Quando ocorre o reconhecimento, este receptor desencadeia uma serie de reações, alterando o comportamento celular. Os receptores que ligam nucleotídeos e nucleosídeos são divididos em receptores do tipo P1, acoplados a proteína G, (subdivididos em A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃), e em receptores P2, que são subdivididos em dois grandes grupos: os receptores tipo canal iônico P2X (P2X₁₋₇); e os receptores tipo serpentina, P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ e P2Y₁₁₋₁₄) (Ralevic e Burnstock, 1998). Cada classe e subclasse destes receptores possui uma afinidade diferente para um ou mais nucleosídeos. Por exemplo, o receptor P1A₁ é ativado por adenosina e inosina, possuindo uma maior afinidade por adenosina. Os receptores do tipo P2X são ativados por ATP em diferentes concentrações para cada subtipo. Os receptores P2Y podem ser ativados por ATP, ADP, UTP, UDP e UDP-Glicose (Bours *et al.*, 2006). Desta forma, o efeito de um mesmo nucleotídeo será diferente em cada tipo de célula dependendo de sua concentração no microambiente e do receptor específico, ou conjunto de receptores, sendo expresso no momento pela célula. Além disso, foi demonstrado que os efeitos fisiológicos de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina dependem de uma rede formada por receptores e enzimas na membrana plasmática, mostrando que as respostas podem variar, também, de acordo com essa combinação (Schicker *et al.*, 2009).

O sistema de sinalização purinérgica é fundamental em ambos os contextos fisiológicos e patológicos, sendo seus componentes moleculares considerados como alvos para novas estratégias terapêuticas (Burnstock e Boeynaems, 2014).

3. Objetivos e metas propostos:

Objetivo 1- Obtenção da NTPDase-1 em sua estrutura nativa

- Ensaios para otimização da expressão da proteína na forma solúvel
- Padronização de uma metodologia de purificação da proteína nativa

Objetivo 2- Busca por inibidores sintéticos da NTPDase-1 de *T. cruzi*

- Ensaios de inibição utilizando compostos naturais e sintéticos
- Determinação da IC_{50} para os candidatos a inibidores mais promissores
- Determinação da forma de inibição dos candidatos selecionados.

Objetivo 3- Estudos estruturais *in silico* da NTPDase-1 de *T. cruzi*

- Predição da estrutura da enzima heteróloga através de modelagem molecular por similaridade
- Avaliação da interação com os inibidores através de *docking* utilizando o modelo predito

Objetivo 4- Avaliação de efeitos biológicos de inibidores da NTPDase-1 de *T. cruzi* e outros compostos

- Efeito sobre epimastigotas de cepa Y
- Teste de toxicidade em células Vero.

4. Material e Métodos:

Produção do domínio extracelular da NTPDase-1 (sNTPDase-1) de T. cruzi

A sequência gênica que codifica a porção solúvel da NTPDase-1 (sNTPDase-1) de *T. cruzi* foi clonada no plasmídeo pET21b Novagen® (Santos *et al.*, 2009). O pET21b possui fusão C-terminal de uma cauda de hexahistidina, a fim de possibilitar a posterior purificação da proteína recombinante através de cromatografia de afinidade por níquel. O plasmídeo recombinante foi purificado a partir das células Top10 (Sambrook e Russell, 2001) e células de *E. coli* BL21(DE3)RIL foram transformadas para a expressão da proteína. A transformação foi feita por choque térmico (30' em gelo e 1'30" a 42°C, em seguida) e as células cresceram por 40' em meio LB (Luria Bertani) (Sambrook e Russell, 2001). O pré-inóculo foi cultivado *overnight* em meio LB contendo 50 µg/mL de ampicilina. A cultura foi transferida na proporção de 1/20 para meio SOC, para expressão insolúvel, ou meio LB, para expressão solúvel (Sambrook e Russell, 2001), e as células cresceram até atingir a DO₆₀₀ de 0,6. Para a indução da expressão insolúvel, 0,25 mM de IPTG foi adicionado e a indução foi realizada por uma hora, a 30°C. Para a indução da expressão solúvel, 0,5 mM de IPTG foi adicionado e a indução foi realizada por 24 horas, a 20°C. Ao final da indução pellets de alíquotas de 100 mL e 200 mL foram armazenados à -80°C até o uso.

Nos ensaios de expressão para obtenção da proteína solúvel foram utilizadas condições variadas de tempo, temperatura, meio de cultura, concentração de IPTG e cepa bacteriana, conforme indicado nos respectivos resultados.

Os ensaios de expressão sob choque térmico e osmótico foram feitos de acordo com (Oganesyan *et al.*, 2007) com modificações. Os pré-inóculos cresceram até a D.O.= 0,9 e foram adicionados na proporção de 1:100 em meio LB. As culturas submetidas ao choque térmico foram mantidas em banho-maria a 47°C até que o meio atingisse a temperatura (cerca de 15 min). Em seguida, as células ficaram sob agitação a 47°C, 210 rpm por 20

min. O LB controle permaneceu também sob agitação, porém a 37°C. Todos os inóculos foram então transferidos para outro agitador a 20°C, 210 rpm, 20 min. A indução foi feita com 0,5 mM de IPTG, a 20°C, *overnight*. Para o choque osmótico foi adicionado 0,5 M de NaCl ao meio LB.

Purificação da sNTPDase-1 de T. cruzi

As células *E. coli* BL21 DE3 RIL, após a indução da expressão, foram lisadas em tampão contendo 50 mM de Tris pH 8,0, 300 mM de NaCl (pH 8,0) e os inibidores de proteases aprotinina (1 µg/mL), pepstatina (1 µg/mL), leupeptina (1 µg/mL). Foi adicionado 1 mg/mL de lisozima para auxiliar no processo de lise, feita por sonicação em 6 pulsos de 10 segundos intercalados com intervalos de 10 segundos, e amplitude de 20 Hz. O lisado foi centrifugado a 12500xg por 15 min para separação das frações insolúvel/solúvel.

A purificação (lavagem) dos corpos de inclusão foi realizada como previamente descrito por (Areas *et al.*, 2002) com modificações. Os passos de centrifugação foram realizados a 12500 g. O *pellet* lavado e solubilizado em tampão desnaturante (50 mM de Tris pH 8,0; 300 mM de NaCl; 8 M uréia; 20 mM de imidazol) seguiu um segundo passo de purificação em uma coluna HisTrap FF crude 1 mL, acoplada a um sistema ÄKTA FPLC (GE Healthcare®). A eluição foi feita com o mesmo tampão desnaturante contendo 300 mM de imidazol. A fração eluída foi renaturada por diluição em 1:10 de tampão 50 mM de Tris pH 8,0, 300 mM de NaCl e armazenada à 4°C por 24h antes de ser utilizada. Para os ensaios de renaturação a proteína foi diluída ou dialisada em seis tampões de diferentes constituições, indicadas no texto.

A purificação da fração solúvel, em condições nativas, foi feita no sistema ÄKTA purifier (GE Healthcare®) de acordo com o manual do fabricante. Foram utilizadas as colunas HisTrap FF crude 1 mL e Capto S 1 mL (GE Healthcare®), e os tampões variaram em constituição e concentração conforme indicado no texto, para fins de padronização.

Determinação da Concentração de Proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) para microplaca, segundo instruções do fabricante (Biorad®). As concentrações padrão foram determinadas com soroalbumina bovina, BSA (Sigma®).

Análises de Western Blotting e SDS-PAGE

As análises de Western Blotting e SDS-PAGE foram realizadas como previamente descrito (Sambrook e Russell, 2001). O gel foi corado com *coomassie blue* ou AgNO₃ (Sambrook e Russell, 2001), conforme indicado. Para o *western blotting*, foram utilizados como anticorpo primário, anti-hexahistidina monoclonal produzido em camundongo (GE Healthcare®) na proporção 1:6.000, ou soro policlonal anti-NTPDase-1 produzido em coelho (Moura, 2010), conforme indicado. Como anticorpo secundário foi utilizado anti-IgG de camundongo ou coelho (molélula inteira) produzidos em cabra, conjugados com FITC (Sigma Aldrich®) na proporção 1:8.000. O Western foi revelado no equipamento Phosphoimage (Kodak®) à 475nm com filtro azul.

Para o ensaio de secreção da TcNTPDase-1 os parasitos foram cultivados em meio Grace's, como descrito abaixo (*Parasitos*). No oitavo dia, os parasitos foram lavados em tampão NaCl 116,0 mM, KCl 5,4 mM, D-glicose 5,5 mM, MgCl₂ 5,0 mM e tampão hepes-tris 50,0 mM pH 7,2 duas vezes e ressuspendidos no mesmo tampão. O sobrenadante da cultura foi separado por centrifugação a 1400xg nos tempos zero e trinta minutos e utilizados no *western blotting*.

Atividade Enzimática

A determinação da atividade enzimática de hidrólise de nucleotídeos foi realizada por técnica microcolorimétrica de determinação de fosfato livre, pelo método do verde de malaquita (Taussky e Shorr, 1953; Ekman e Jager,

1993). A atividade enzimática foi determinada em um tampão contendo 50 mM de Tris pH 8,0; 50 mM de HEPES pH 8,0; 2,5 mM de MgCl₂; 116 mM de NaCl ; 5,4 mM de KCl e 2,5mM de nucleotídeo, num total de 80 μL de reação, incluindo a proteína. A reação foi disparada com 0,5 μg de proteína e ocorreu por 10 minutos à 37°C, até que fosse interrompida com mesmo volume de HCl 0,1 M. Para determinação de fosfato livre, foi utilizado o reagente colorimétrico (verde malaquita 0,2% e molibdato de amônio 10% 1:3, ambos ressuspensos em HCl 4M). O branco da reação continha todos os reagentes, exceto a proteína que foi adicionada após a parada da reação. A leitura foi realizada a 650 nm em uma leitora de microplacas.

Extratos e compostos

Os extratos e compostos utilizados foram diluídos em DMSO na concentração de 10 mM/10 mg/mL, e congelados. Para o uso, uma alíquota foi descongelada e diluída 10x em água ultrapura. Para os ensaios, a concentração/massa final máxima(o) dos compostos/extratos foi de 100 μM/100 μg.

Para os testes com extratos e compostos como possíveis inibidores da NTPDase-1, bem como para os ensaios de atividade tripanocida ou citotóxica, cada extrato/composto foi adicionado nas concentrações indicadas nas legendas das figuras. Em alguns ensaios de atividade enzimática a concentração de nucleotídeo foi diminuída de 2,5 mM para 100 μM para permitir a detecção de inibição competitiva. Para cada ensaio foi feito um controle contendo a mesma concentração de DMSO presente na suspensão dos compostos. A curva de concentração de cada inibidor variou de 0,0 a 100 μM. A atividade inibitória (i.e. IC₅₀) foi calculada da seguinte forma: [% atividade inibitória = ((nmol Pi x μg⁻¹ x 10min do controle - nmol Pi x μg⁻¹ x 30min do composto) / nmol Pi x μg⁻¹ x 10min do controle) x 100].

Produção de anticorpos policlonais anti-NTPDase-1

Para a produção de anticorpos foi utilizado um coelho, fêmea, adulta jovem, proveniente do biotério de criação de coelhos da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Antes da imunização, uma amostra de sangue foi obtida por punção da veia marginal da orelha (soro pré-imune). A sNTPDase foi purificada em resina de níquel (Sigma Aldrich®) até a obtenção de uma quantidade satisfatória. Foram realizadas três imunizações, intradérmicas, com 200µg/400µL de proteína, com intervalos de 21 e 15 dias, respectivamente. Na primeira imunização foi adicionado, em igual volume, adjuvante completo de *Freund*, e nas outras duas, adjuvante incompleto. No sétimo dia após a terceira imunização foi colhida uma amostra de sangue para verificar se a imunização havia sido efetiva, e foi administrado um reforço com 200µg de proteína. O soro coletado foi posteriormente purificado pelo método do ácido caprílico, e o título foi determinado por *Dot Blotting*.

Construção de modelos tridimensionais da proteína NTPDase-1

Os modelos estruturais da proteína selvagem foram construídos pelo software I-TASSER (Roy *et al.*, 2010), utilizando um método baseado em alinhamentos múltiplos de domínios. A estrutura cristalina da proteína NTPDase-2 de *Rattus norvegicus* (PDB ID 3CJ1) foi indicada como molde primário. Os melhores resultados, de acordo com o software PROCHECK, foram analisados e um modelo tridimensional foi selecionado para o prosseguimento das análises.

Construção dos ligantes e otimização de cargas e geometria

A estrutura monomérica do Composto III (CIII) foi projetada utilizando-se a versão de avaliação do software LigPrep versão 2.6 do pacote *Small-Molecule Drug Discovery Suite* (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2013). Suas cargas atômicas foram calculadas aplicando-se o método de CHELPG (Breneman, 1990) e sua geometria foi otimizada através de cálculos químicos

quânticos do tipo DFT (B3LYP/6-31G*) utilizando a versão de avaliação do software Jaguar versão 8.0 do mesmo pacote.

O ligante foi submetido ao algoritmo de geração de topologia PRODRG (Schuttelkopf e Van Aalten, 2004) e suas cargas foram novamente calculadas e incorporadas aos arquivos de topologia.

Ancoramento molecular

Para as análises de ancoramento molecular a proteína recombinante foi usada, na qual uma cavidade principal foi encontrada a partir de uma busca inicial feita manualmente. Essa cavidade já é descrita como o sítio de ligação ao cátion divalente, no caso o Mg^{2+} (Zebisch e Strater, 2008). O ancoramento molecular do Composto III nessa região foi realizado pelo programa AutoDockVina (Trott e Olson, 2010) considerando uma grade centrada na cavidade e circunscrita à mesma e utilizando 50 corridas usando a opção do método de Algoritmo Genético.

As melhores posições/poses, conformações e interações entre o ligante e a proteína foram analisadas, bem como suas energias.

Parasitas

Foram utilizados parasitos da cepa Y (DTU II) de *T. cruzi* isolado a partir de um caso agudo humano. Esta cepa leva à baixa parasitemia e alta mortalidade em camundongos (Silva e Nussenzweig, 1953) e é parcialmente sensível ao benzonidazol (Filardi e Brener, 1987).

Formas epimastigotas de *T. cruzi* cultivados em meio LIT foram congelados em nitrogênio líquido. Para os ensaios foram descongelados e inoculados em meio Grace's contendo 10% de soro fetal bovino (SBF) a 28 °C.

Uma curva de crescimento de epimastigotas foi realizada, em quadruplicata, com repique inicial com 1×10^5 células/mL em uma garrafa de

cultivo de 25 cm³ e completados com meio Grace's numa quantidade suficiente para 10 mL. Este foi considerado o dia "zero" da curva. A partir deste dia, foram feitas contagens em câmara de Neubauer do número de parasitos durante 15 dias consecutivos. As curvas representam as médias diárias dos parasitos contados.

Para o crescimento exponencial, foi adicionado novo meio de cultura, a cada 2 dias, em quantidade suficiente para manter a concentração de parasitos em 5x10⁶ células/mL. Cada cultura foi então submetida a um repique semanal, mantendo ao menos 10% do meio. Com objetivo de manter as características biológicas de cada cepa, após cerca de oito semanas, os parasitos foram homogeneizados em meio contendo 10% de glicerina e criopreservados em nitrogênio líquido.

Células VERO

As células VERO são células derivadas de carcinoma de rim de embrião de macaco verde africano (*Chlorocebus aethiops*). Esta linhagem foi obtida da American Type Culture Collection e armazenada em tubos de criopreservação em nitrogênio líquido.

Para a manutenção das células VERO foram utilizadas garrafas de cultura de 25 cm³ contendo 10 mL de meio de cultura RPMI (Sigma[®]) adicionado de 1 a 10 % de soro fetal bovino. Foram colocadas aproximadamente 5x10⁵ células por garrafa. Os repiques dessas células foram feitos pela remoção do meio de cultura, lavagem da monocamada de células com 10 mL de solução salina 0,9% (estéril), adição de 5 mL de tripsina (100 mL de PBS 1X, 0,5 g de tripsina e 0,02g de EDTA) e incubação por 2 a 3 minutos em estufa à 37° C para descolamento das células. A reação de descolamento foi interrompida pela adição de 10 mL de solução salina 0,9% e posterior homogeneização. Esta suspensão celular foi acondicionada em tubo Falcon de 15 mL, centrifugada por 10 minutos a 152 xg (5° C), o sobrenadante descartado e o pellet suspenso em 10 mL de solução salina 0,9% estéril. Uma alíquota foi retirada para contagem em câmara de

Neubauer. As células foram centrifugadas novamente por 10 minutos a 152 *xg* (4 °C), suspensas em meio RPMI 10% SFB e uma quantidade de 1×10^6 células foram semeadas em 15 mL de meio de cultura RPMI 10% SFB em garrafas de 75 cm³ e incubadas em estufa à 37 °C, 5% CO₂ e atmosfera umidificada à 95%.

Padronização das condições experimentais para a utilização da resazurina

Epimastigotas foram contados em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 1×10^8 parasitos/mL. Cem (100) microlitros (µL) dessa suspensão, mais 100 µL de meio, foram pipetados em placas de 96 poços, em triplicata. Foram feitas 7 diluições seriadas na proporção de 1:2 (sendo 200 µL de volume final em cada poço) e a placa então incubada por 24 h, 48 h e 72 horas em estufa BOD, a 28°C. Após esse período foram adicionados 20 µL de resazurina 1 mM (concentração previamente padronizada) a cada poço. A reação foi lida a cada uma hora, até que o corante fosse completamente reduzido. Como as duas formas do corante (oxidada ou reduzida) absorvem luz em comprimentos de onda diferentes, as leituras de absorbância foram feitas a 570 e 600 nm em leitor de microplacas. A porcentagem de redução do corante, em cada tempo, foi calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Redução da resazurina} = [A570 - (A600 \times R0)]$$

Nessa fórmula, A570= absorbância a 570 nm, A600= absorbância a 600 nm e R0 é o fator de correção, calculado a partir dos valores de absorbância do controle negativo (C-), que continha meio de cultura e resazurina na ausência de células [$R0 = (A570_{C-} / A600_{C-})$]. A curva-padrão foi construída plotando-se o número de parasitos *versus* a porcentagem de redução do corante. Dessa forma definiu-se a quantidade ideal de epimastigotas, bem como o tempo ótimo de incubação a fim de se obter uma reação linear.

Para as células VERO, uma série de seis diluições na proporção 1:2, partindo da concentração de 1×10^5 células/mL foi pipetada em placa de 96 poços (200 μ L/poço). A placa foi incubada por 24 h, 48 h e 72 h a 37°C, 5% de CO₂. Como controle negativo da reação, triplicatas contendo 200 μ L de meio de cultura puro, sem células, foram utilizadas. Após esse período, foram adicionados 20 μ L de resazurina 1 mM em cada poço, procedimento seguido de nova incubação a 37°C. A leitura da reação foi realizada a 570 nm e 600 nm, a cada 1 hora, até que fosse alcançado cerca de 80% de redução. Os cálculos de percentual de redução e construção da curva-padrão foram feitos de maneira similar aos procedimentos descritos para os epimastigotas.

Ensaio de atividade tripanocida

Para a avaliação do efeito anti-epimastigota dos compostos, as formas epimastigotas foram mantidas como previamente descrito. Para quantificar a atividade de cada composto sobre o parasito, utilizou-se a reação colorimétrica da resazurina, previamente padronizada. Após contagem em câmara de Neubauer, ajustou-se o número de parasitos para a concentração de 5×10^7 /mL. Cem microlitros dessa suspensão foram adicionados a cada poço da placa de 96 poços, em triplicata. Logo após, 100 μ g/100 μ M dos extratos/compostos foram adicionados aos poços contendo os epimastigotas. As placas foram incubadas em estufa BOD, a 28°C, por 24 h, 48 h e 72 horas. Foram adicionados, a cada placa, controles negativos (meio), controles positivos (meio + parasitos), controles para avaliar o potencial do DMSO (meio + DMSO a 1%) em reduzir o corante ou em afetar os parasitos (meio + DMSO + parasitos). Após esse período foram adicionados 20 μ L de resazurina 1mM/poço e após 2, 3 ou 4 horas foi realizada a leitura da reação a 570 nm e 600 nm, utilizando um leitor de microplacas. Todos os experimentos com formas epimastigotas foram realizados em triplicata, com no mínimo 3 repetições. A porcentagem de inibição da proliferação foi calculada a partir da fórmula:

$\% \text{ inibi\c{c}\tilde{a}o} = 100 - [A570 - (A600 \times R0) \text{ Tratado} / A570 - (A600 \times R0) \text{ Controle+}] \times 100.$

Nessa fórmula, A570= absorv\u00e2ncia a 570 nm, A600= absorv\u00e2ncia a 600 nm e R0 \u00e9 o fator de corre\u00e7\u00e3o, calculado a partir dos valores de absorv\u00e2ncia do controle negativo, ou seja, apenas meio de cultura e resazurina na aus\u00eancia de parasitos [R0 = (A570 /A600)].

Ensaio de citotoxicidade

Para excluir os efeitos t\u00f3xicos sobre as c\u00e9lulas hospedeiras, culturas de c\u00e9lulas VERO foram tratadas com os mesmos compostos testados para os epimastigotas. Cem microlitros de suspens\u00e3o das c\u00e9lulas VERO, na concentra\u00e7\u00e3o de $2,5 \times 10^5$ /mL, adicionados de 100 μ L de meio RPMI foram pipetados em placas de 96 po\u00e7os e incubados a 37\u00b0, 5% CO₂, por 24 h, 48 h e 72 horas. Os extratos/compostos foram adicionados a peso/concentra\u00e7\u00e3o final de 100 μ g/100 μ M. Foram adicionados a cada placa: controles negativos (meio), controles positivos (meio+c\u00e9lulas), controles para avaliar o potencial do DMSO (meio+DMSO a 1%) em reduzir o corante ou em afetar as c\u00e9lulas (meio + DMSO + VERO).

Ap\u00f3s 24 h, 48 h e 72 horas de incubac\u00e3o a 37\u00b0C, foram adicionados 20 μ L de resazurina 1 mM a cada po\u00e7o e a placa foi lida em leitor de microplacas (570 nm e 600nm). A porcentagem de inibi\u00e7\u00e3o da prolifera\u00e7\u00e3o induzida pelos compostos foi calculada utilizando-se a f\u00f3rmula abaixo:

$\% \text{ inibi\c{c}\tilde{a}o} = 100 - [A570 - (A600 \times R0) \text{ Tratado} / A570 - (A600 \times R0) \text{ Controle+}] \times 100$

Nessa f\u00f3rmula, A570= Absorv\u00e2ncia a 570 nm, A600= Absorv\u00e2ncia a 600 nm, Controle + \u00e9 o po\u00e7o contendo c\u00e9lulas, meio e resazurina, na aus\u00eancia do f\u00e1rmaco. R0 \u00e9 o fator de corre\u00e7\u00e3o, calculado a partir dos valores de absorv\u00e2ncia do controle negativo (C-), ou seja, apenas meio de cultura e resazurina na aus\u00eancia de c\u00e9lulas [Ro = (A570 /A600)C-].

5. Resultados e discussão:

Predição estrutural e avaliação secreção da NTPDase-1 de T. cruzi

A sNTPDase-1 corresponde a porção solúvel da NTPDase-1 de *T. cruzi* (TcNTPDase-1). Para a clonagem, foram retirados 36 aminoácidos da porção N-terminal correspondentes à região predita como transmembranar da proteína (Fietto *et al.*, 2004) visando melhorar a estabilidade da mesma. Segundo o índice de instabilidade (Guruprasad *et al.*, 1990) predito pelo software ProtParamTM (<http://web.expasy.org/protparam/>) (Anexos I e II) a sNTPDase-1 é considerada mais estável. A subclonagem no pET21b (material e métodos), por sua vez, adicionou aminoácidos à porção C-terminal da proteína. As alterações na sequência e no número de aminoácidos parecem afetar minimamente o dobramento predito da proteína (figura 4A e B) mantendo sua função. Função esta, avaliada por atividade nucleotidásica prévia (Santos *et al.*, 2009; Moura, 2010; Mariotini-Moura *et al.*, 2014), e também no presente trabalho.

A predição de um peptídeo sinal sugere que a TcNTPDase-1 poderia ser secretada pelo parasito. Para isso, realizamos um *western blotting* do sobrenadante da cultura de epimastigotas (figura 5). Os parasitos foram centrifugados e lavados em um tampão, como descrito em material e métodos, e o sobrenadante foi coletado a partir do tempo 0, de 30 em 30 minutos. Logo nos primeiros 30 min já é possível detectar a presença da proteína (figura 5, canaleta 3), ausente no tempo 0 (figura 5, canaleta 2). A secreção da proteína se mantém por pelo menos 180 minutos, o que sugere que a secreção aconteça nos momentos iniciais. O fato de a NTPDase estar presente na membrana (Fietto *et al.*, 2004; Mariotini-Moura *et al.*, 2014) e poder ser secretada reforça seu potencial como alvo para o desenho de drogas, estando disponível para a ação de inibidores no meio extracelular e podendo ser usada como um fator de virulência.

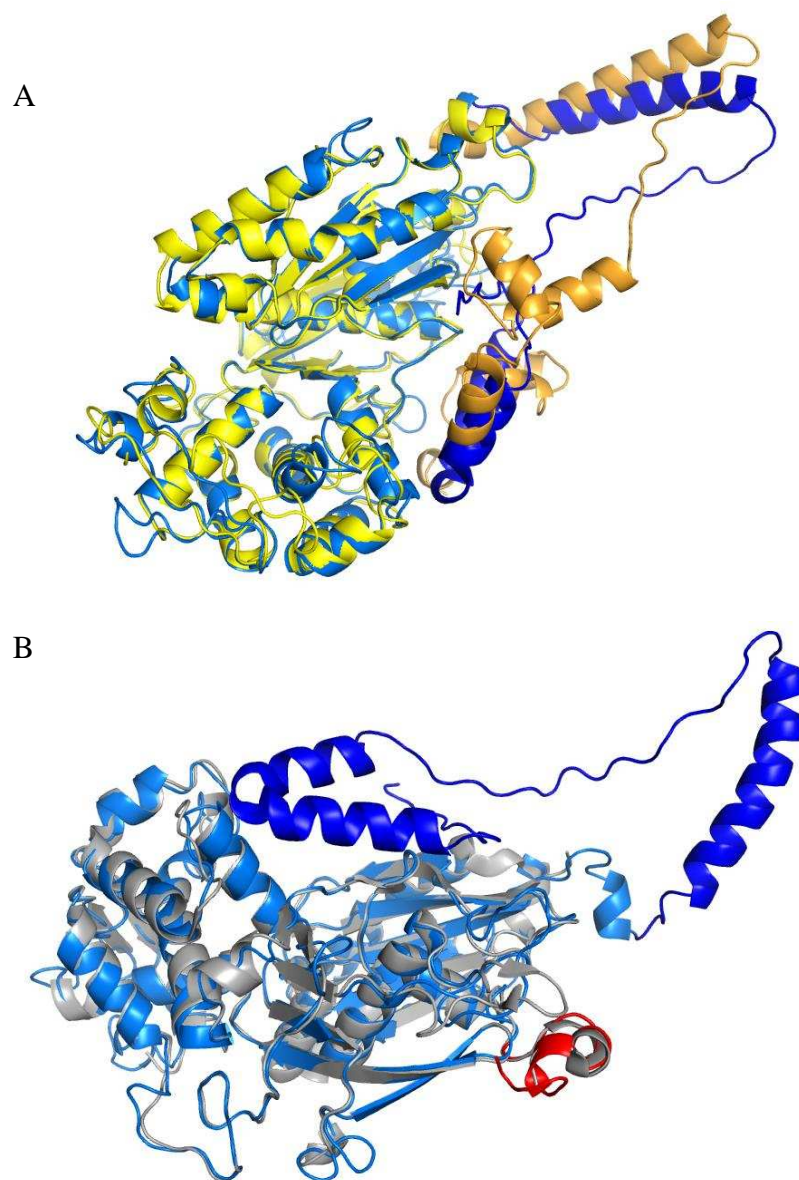


Figura 4- Modelos estruturais sobrepostos da sNTPDase-1(azul) com (A) TcNTPDase-1 (amarelo) e (B) NTPDase2 de *Rattus norvegicus* (prata). Em (A) a região destacada em azul escuro e dourado corresponde à região N-terminal da TcNTPDase-1, ausente na enzima de rato. Em (B) a região destacada em vermelho corresponde aos aminoácidos adicionados pelo pET 21b. Os modelos foram construídos pelo software I-TASSER por homologia de domínios, utilizando como molde primário a estrutura cristalina da proteína de rato (PDB ID 3CJ1). Os melhores modelos foram selecionados de acordo com o software PROCHECK.



Figura 5- Secreção da TcNTPDase-1 por Epimastigotas. Parasitos em fase log de crescimento foram lavados duas vezes e ressuspensos no mesmo tampão. O sobrenadante da cultura foi separado por centrifugação a 1400 $\times g$ nos tempos zero e trinta minutos e utilizados no *Western blotting*. (1) sNTPDase-1 recombinante purificada. (2), sobrenadante no tempo zero. (3) sobrenadante no tempo 30 min. Foram aplicados 15 μL em cada canaleta.

Purificação da sNTPDase-1 de T. cruzi em condições desnaturantes

A expressão em *E. coli* é considerada um método rápido, simples, barato e de alto rendimento, porém a alta taxa de tradução acaba levando ao acúmulo de agregados insolúveis de proteína, denominados corpos de inclusão. A purificação dessa forma da proteína é vantajosa pela facilidade de concentrar por centrifugação, além de apresentar poucos contaminantes e ser resistente à proteólise (Brondyk, 2009), no entanto, a renaturação pode ser um passo limitante na obtenção da proteína em sua forma ativa.

A expressão da sNTPDase-1 em meio SOC a 30°C por 1 h, induzida com 0,25 mM IPTG, levou a produção da proteína na forma de corpos de inclusão. Apenas com lavagens com uréia 2 M, a proteína obtida corresponde visualmente a pelo menos mais que 80% do purificado, suficiente para se determinar sua atividade (Moura, 2010). Para garantir a pureza da proteína e, portanto, minimizar variações nos ensaios de atividade enzimática, o purificado foi submetido à cromatografia de afinidade em condições desnaturantes, conforme descrito em material e métodos.

A utilização de baixas concentrações de uréia, cloreto de guanidina e arginina, bem como o glicerol, podem otimizar a produção de proteínas ativas por minimizar a formação de agregados (Meng *et al.*, 2001; Tsumoto *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2009). A sNTPDase-1 possui cinco possíveis pontes dissulfeto, de acordo com predição feita no DiANNA 1.1 web server (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>), e um sistema de oxi-redução poderia ser a chave para o sucesso do passo de renaturação. Para avaliar esses efeitos a proteína eluída foi renaturada em seis diferentes tampões, incluindo o tampão de renaturação habitual, por diluição ou diálise (tabela 1). Na rotina do nosso laboratório a NTPDase-1 é renaturada por diluição (1:10) em tampão contendo apenas 50 mM de Tris pH 8,0, 300 mM de NaCl. Nesse caso, a concentração final da proteína é ideal para os ensaios de atividade, porém para outros ensaios é necessária uma amostra mais concentrada. Por esse motivo, foi avaliada também a renaturação por diálise. O tampão de renaturação foi testado com ou sem 0,8 M de uréia, que é a concentração final na renaturação por diluição. O sucesso da renaturação foi avaliado, na

diálise, pela precipitação ou não da proteína, e na diluição, pela presença ou não de atividade (tabela 1).

Como pode ser observado na tabela 1, o tampão de renaturação habitual se mostrou ideal para a renaturação por diluição e para a diálise, sendo que a adição de 0,8 M de uréia foi fundamental para a estabilização da proteína, nas condições testadas. No entanto, o passo de concentração desta proteína continua sendo um problema, resultando na sua precipitação em concentrações acima de 1 mg/mL.

Um projeto viabilizando o uso da linha de SAXS (Espalhamento de raios-x a baixo ângulo) do LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron) foi submetido e aprovado, em nome do Prof. Gustavo Costa Bressan, co-orientador deste projeto. Duas amostras foram enviadas, sendo uma renaturada por diálise na concentração de 1,6 mg/mL, e uma amostra em 8 M de uréia. Porém, a amostra renaturada precipitou durante a viagem, e a segunda amostra, renaturada por diluição, não foi suficiente para gerar resultados satisfatórios.

Na tentativa de obter o cristal da sNTPDase-1, uma purificação em maior escala foi realizada no Laboratório de Cristalografia da USP de São Carlos – SP. Um litro de indução da proteína insolúvel foi purificado como uma amostra única. Porém, muita proteína se perdeu no escalonamento e também por precipitação, durante a concentração da amostra. Ainda assim, conseguimos reduzir a amostra a um volume de 200 µL a 1,2 mg/mL. Foram utilizados quatro “kits” de cristalização, sendo eles Crystal Screen HT e Index HT, Hampton research®, e Morpheus e JCSG+, Molecular Dimensions®, totalizando 384 diferentes condições. Visto que após 30 dias de armazenamento em câmara fria e observação não houve sequer formação de precipitado em nenhum dos 384 tampões, pode-se concluir claramente que a quantidade de proteína não foi suficiente.

Tabela 1- Teste de renaturação da sNTPDase-1. A proteína foi renaturada nos diferentes tampões, por diluição e/ou diálise. As letras indicam o resultado da renaturação: (P) precipitou, (S) solúvel, (-) não foi feito, (A) ativa, (N) sem atividade, (B) baixa atividade. ^a Retirado ou adaptado de (Zebisch e Strater, 2007). ^b Adaptado de (Ivanenkov *et al.*, 2003).

Tampão	Constituição	Diálise	Diluição
Renat.	Tris pH 8,0 50 mM; NaCl 0,3 M	P	A
Renat. + 0,8M uréia	Tris pH 8,0 50 mM; NaCl 0,3 M; uréia 0,8 M	S/A	A
1^a	Tris pH 8,0 100 mM; NaCl 0,6 M; Glicerol 33%; GSSG 1 mM; GSH 2 mM	-	N
2^a	Tris pH 8,0 100 mM; L-arginina 1 M; Glicerol 20%; GSSG 1 mM; GSH 2 mM	P	N/B
3^a	Tris pH 8,0 100 mM; L-arginina 1 M; NaCl 1,2 M; GSSG 1 mM; GSH 2 mM	-	N
4^b	Tris pH 8,0 100 mM; L-arginina 0,5 M; NaCl 250 mM; KCl 10 mM; MgCl ₂ 2 mM; CaCl ₂ 2 mM; GSSG 0,4 mM; GSH 2 mM	-	N
5^b	Tris pH 8,0 100mM; NaCl 250 mM; KCl 10 mM; 2 mM CaCl ₂ ; 0,2 mM GSSG; 2 mM GSH	P	N

Expressão solúvel da sNTPDase-1 de T. cruzi

Mesmo uma renaturação eficiente pode não dispensar totalmente a necessidade de se ter uma proteína expressa em sua forma nativa, sem passar por processos agressivos como a desnaturação com agentes caotrópicos. Para ensaios estruturais, por exemplo, a expressão da forma mais próxima da selvagem é ideal. Apesar de *E. coli* ter uma capacidade limitada de realizar modificações pós-traducionais, é possível obter proteínas corretamente dobradas, minimizando a formação de corpos de inclusão. Para maximizar a formação de proteína solúvel lançamos mão de algumas modificações no protocolo de expressão da sNTPDase-1.

Muito tem sido feito com relação à engenharia de novas cepas bacterianas a fim de otimizar a expressão de proteínas. As ArcticExpress (Agilent®) são projetadas para a expressão em baixas temperaturas, pois co-expressam chaperonas com atividade ótima de 4 a 12°C. Realizamos um teste de expressão da sNTPDase-1 utilizando a cepa de trabalho, BL21 DE3 RIL, e a cepa Artic. Variamos o meio de cultura e a temperatura de indução, criando três diferentes cenários: expressão em BL21 a 30°C em meio SOC ou 20°C em meio LB, e expressão em Artic a 10°C em meio SOC (figura 6).

Apesar da temperatura extremamente baixa e a presença de chaperonas ativas, a indução em células Artic apresentou baixa expressão e na forma de corpos de inclusão somente (figura 6, Artic 10°C). Nas condições testadas, uma temperatura não tão baixa (20°C) e um meio um pouco mais pobre (LB) foram suficientes para que parte da proteína fosse expressa em sua forma solúvel, provavelmente por diminuir as taxas de tradução e dobramento. Visualmente, a proporção solúvel/insolúvel parece ser de 50%/50%, ou próximo disso. Seguimos tentando aumentar o nível de expressão utilizando esse cenário como base.

Sabe-se que as bactérias possuem mecanismos de defesa para evitar o enovelamento incorreto e agregação de proteínas, causada por estresse osmótico e/ou térmico, entre eles está o acúmulo intracelular de osmólitos e síntese de chaperonas (Bukau e Horwich, 1998; Kempf e Bremer, 1998;

Oganesyan *et al.*, 2007). Assim, avaliamos o efeito do crescimento das células bacterianas BL21DE3RIL, na presença de altas concentrações de sal e choque térmico, na expressão da sNTPDase-1 (figura 7A). Foram testadas quatro condições: LB controle (segundo condições padronizadas descritas acima), LBchoque: cultura que sofreu somente choque térmico (47°C), LBNa: cultura que sofreu somente choque osmótico (0,5 M NaCl), e LBNachoque: cultura que sofreu choque térmico e osmótico. Após os tratamentos, todas as culturas, foram crescidas a 20°C *overnight*, conforme descrito em material e métodos.

A quantidade de proteína total aplicada dessa vez foi bem menor que no experimento anterior, porém ainda é possível notar que, novamente apesar da atividade adicional de chaperonas, as situações de choque térmico e osmótico não trouxeram nenhuma melhora na expressão da NTPDase-1 na forma solúvel, com relação ao controle.

Como no primeiro ensaio, o crescimento em um meio mais pobre (LB, comparado ao SOC) aliado à baixa temperatura favoreceu a expressão da proteína solúvel, o crescimento em meio mínimo também foi testado. O meio M9 foi utilizado para o crescimento de BL21, durante 24 h e 48 h, com ou sem adição de 50 µg/mL de ampicilina durante a expressão a 20 °C (figura 8). Foi utilizado 1 mM IPTG para a indução.

Como podemos observar na figura houve produção de proteína solúvel, porém, a maior parte da proteína continuou indo para os corpos de inclusão. Foram realizadas novas tentativas de expressão em meio M9, variando a concentração de IPTG, porém não obtivemos melhores resultados. Decidimos por investir na expressão em meio LB a 20°C por 24 h, variando também a concentração de IPTG e, nosso melhor resultado foi obtido dobrando a concentração de IPTG utilizada inicialmente, que era de 0,25 mM. Com 0,5 mM de IPTG houve um aumento na quantidade de proteína produzida, tanto solúvel quanto insolúvel (figura 7B).

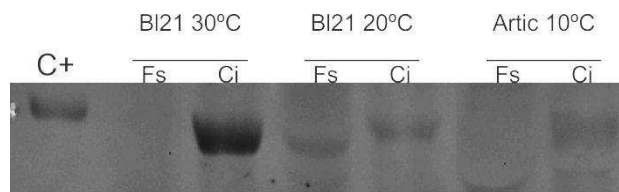


Figura 6- Western blotting de indução Artic/BL21. (C+) 1 μ g de sNTPDase-1 purificada. (BL21 30°C) indução com BL21 a 30°C por 1 h em meio SOC e 0,25 mM IPTG. (BL21 20°C) indução com BL21 a 20°C por 21 h em meio LB e 0,25 mM IPTG. (Artic 10°) indução com Artic a 10°C por 24 h em meio SOC e 0,1 mM IPTG. 50 mL de cada indução foram lisados e centrifugados para separar (Fs) fração solúvel e (Ci) corpos de inclusão. Ambas as frações foram ressuspensas em volumes iguais e foram aplicados 37 μ L de cada no gel. O WB foi revelado com anti-histidina 1:6000 e anti-IgG de camundongo conjugado com FITC 1:8000.

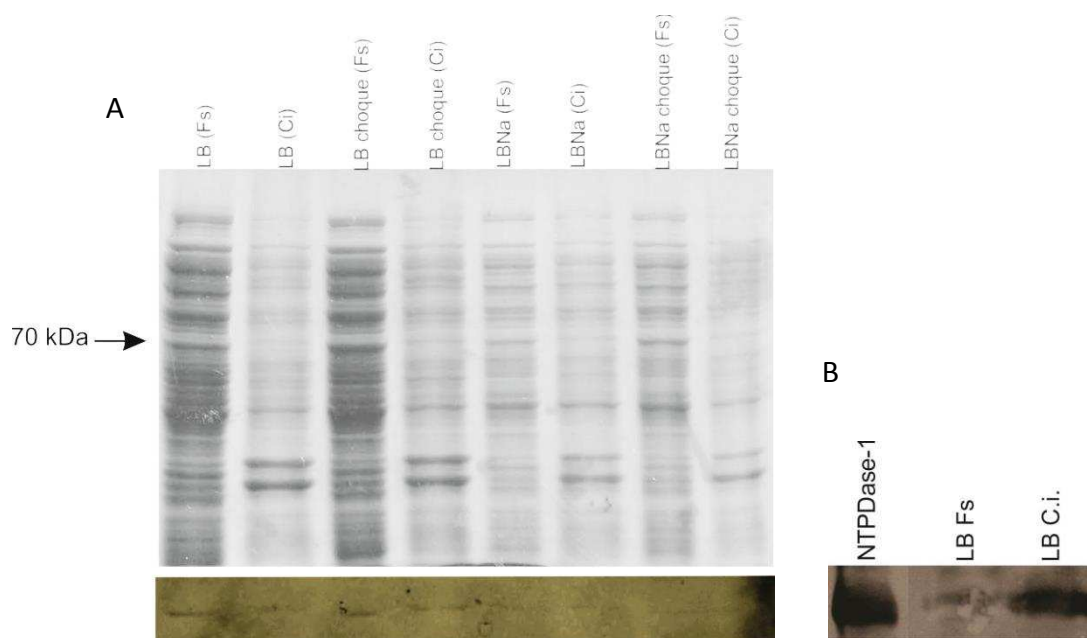


Figura 7- Indução da NTPDase-1 em meio LB. **A:** SDS-PAGE e *Western blotting* de indução LB choque térmico/osmótico. 8mL de cada indução foram lisados e centrifugados para separar (Fs) fração solúvel e (Ci) corpos de inclusão. Ambas as frações foram ressuspensas em volumes iguais e foram aplicados 18 μ L de cada no gel. Para todas as condições foi utilizado 0,25 mM IPTG para a indução da expressão. **B:** *Western blot* de indução em meio LB, em condições normais, utilizando 0,5 mM IPTG. Foram aplicados 8,5 μ L de cada fração no gel, totalizando 5 μ g da NTPDase-1, e 10 μ g de Fs e Ci, cada. Os resultados de WB foram revelados com anti-histidina 1:6000 e anti-IgG de camundongo conjugado com FITC 1:8000.

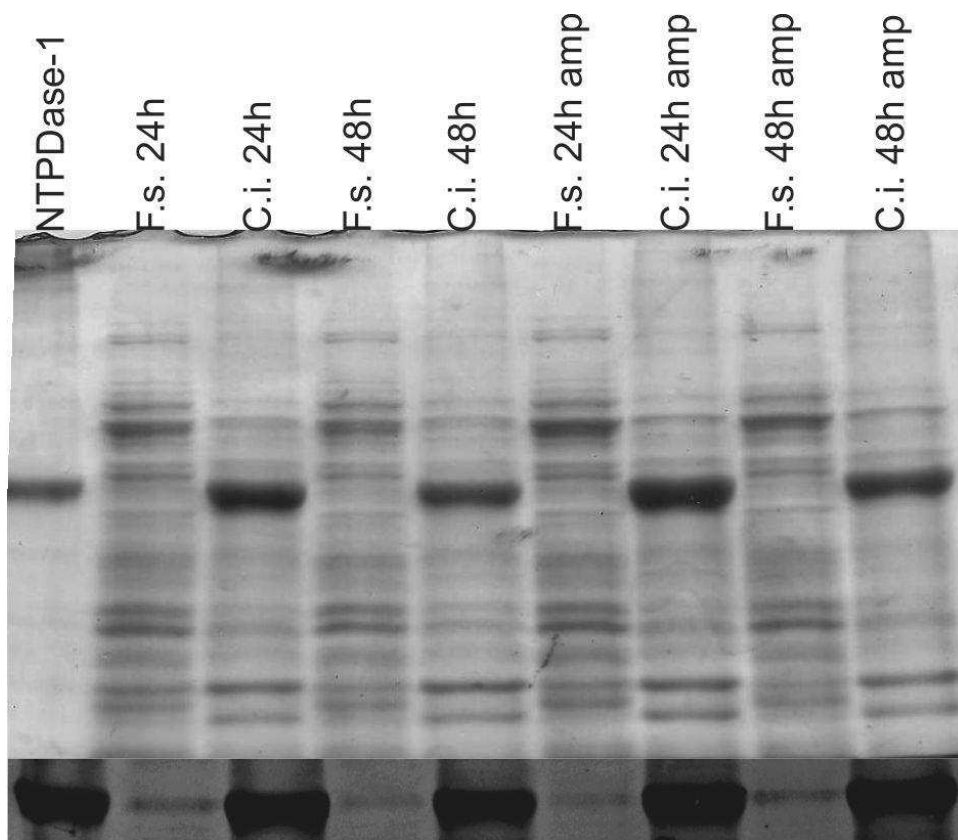


Figura 8- SDS-PAGE e Western da indução em meio M9. As induções (50 mL) aconteceram por 24 h e 48 h com ou sem ampicilina. As induções foram lisados e centrifugados para separar (Fs) fração solúvel e (Ci) corpos de inclusão. Ambas as frações foram ressuspendidas em volumes iguais e foram aplicados 15 µg de proteína total em cada canaleta do gel. O WB foi revelado com soro policlonal 1º lote 1:40000 e anti-IgG de coelho conjugado com FITC 1:8000.

Purificação da sNTPDase-1 de T. cruzi em condições não desnaturantes

A facilidade encontrada na separação e purificação dos corpos de inclusão dificilmente se aplica na purificação de uma proteína a partir da fração solúvel. Enquanto os corpos de inclusão são praticamente um agregado da proteína de interesse, na fração solúvel estão todas as outras proteínas da bactéria, além da proteína de interesse. Sendo assim, a purificação de uma proteína solúvel geralmente requer mais de um passo de purificação.

A fusão com uma cauda de hexa-histidina (His tag) oferece bons rendimentos de proteína a partir de resinas de baixo custo e de alta capacidade, porém com pureza apenas moderada a partir de extratos de *E. coli*, quando comparada com outras tags (Lichy *et al.*, 2011) o que reforça a necessidade de purificação adicional, embora isso possa variar de acordo com características de cada proteína.

Para a sNTPDase-1, o primeiro passo foi padronizar a purificação por afinidade em coluna de níquel, utilizando como “isca” a cauda de hexa-histidina (figura 9). A constituição base dos tampões foi o tampão de lise, variando somente a concentração do eluente (imidazol) em gradiente.

Podemos notar na figura 9 que, com uma maior concentração de imidazol no passo de ligação (15 mM), a presença de contaminantes foi significativamente menor, e pouco se perdeu no VNL. A proteína é eluída entre 90-100% do gradiente (270-300 mM), confirmando a exposição da cauda de hexa-histidina, mostrada na figura 4B. Foram obtidos 420 µg e 480 µg de proteína total em A e B, respectivamente. Sendo que, em B, a sNTPDase-1 corresponde a grande parte desse total.

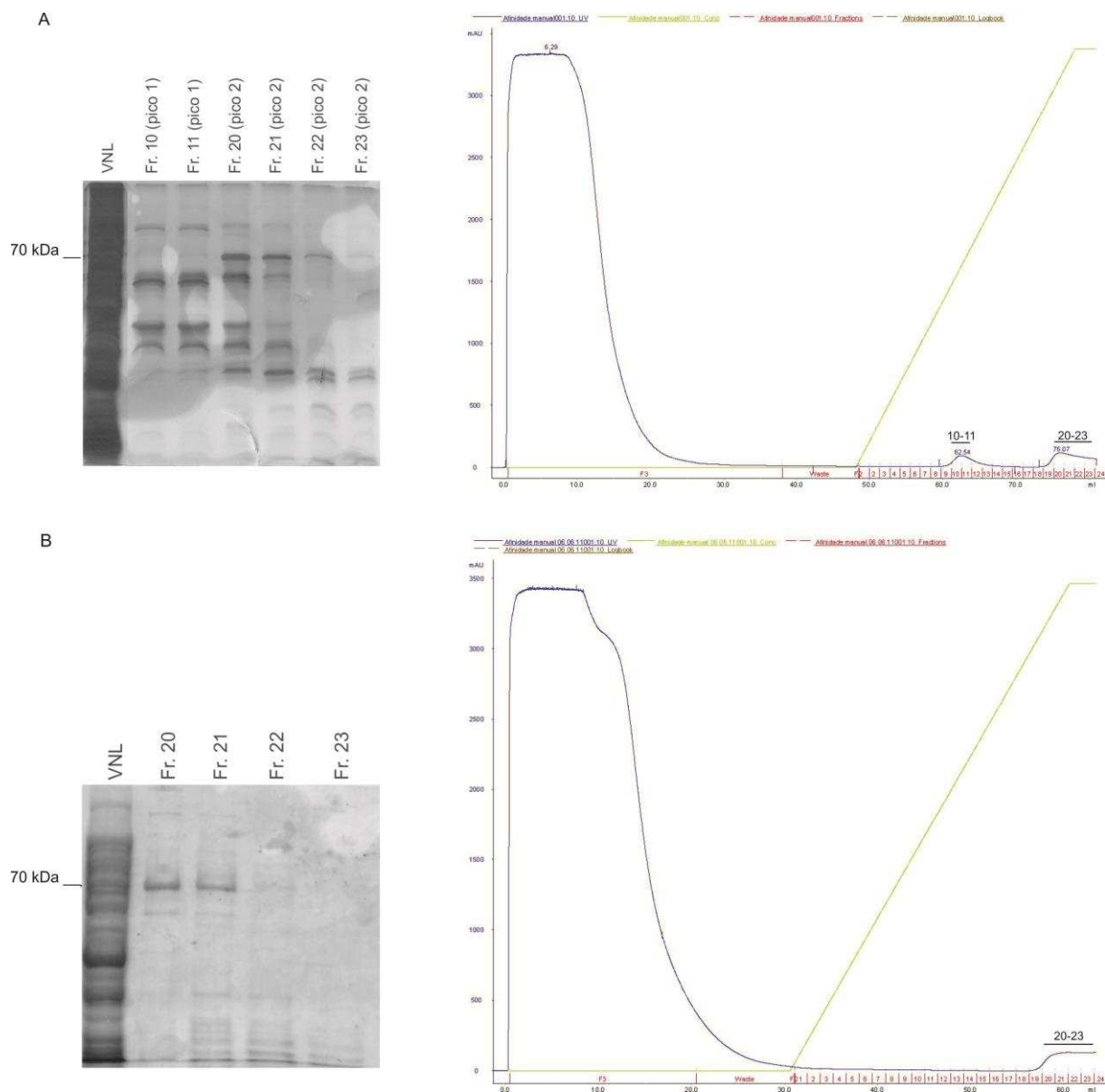


Figura 9- Purificação da sNTPDase-1 por afinidade em resina de níquel. Pellets de 100 mL de indução foram lisados e centrifugados para recuperação da fração solúvel, que foi carregada em uma coluna Histrap FF crude 1mL em um AKTA purifier. Os tampões de ligação e eluição tinham a mesma constituição do tampão de lise (50 mM tris pH 8,0, 0,3 M NaCl) variando somente a concentração de imidazol, em gradiente de 5 mM-300 mM (A) ou 15 mM-300 mM (B). Os géis foram corados pelo método da prata. Nos cromatogramas a linha azul representa a absorbância em mAU (280 nm), e a linha verde representa o gradiente de imidazol (30 cv). VNL= volume não ligado na coluna.

A partir desse resultado decidimos investir no grau de pureza da sNTPDase-1. O melhor resultado foi obtido com uma purificação em 3 passos, afinidade-troca.iônica-afinidade (figura 10). O primeiro passo foi uma cromatografia de afinidade em resina de níquel (GE healthcare®). Por problemas de funcionamento no equipamento AKTA purifier, este passo somente foi realizado em bancada. O tampão utilizado foi o tampão definido acima, com 15 mM de imidazol na ligação e 300 mM na eluição. Apesar de ser o mesmo tampão, a ligação da proteína na resina parece ter sido menos eficiente no método manual (figura 10A). O segundo passo foi uma cromatografia por troca iônica em coluna de troca catiônica, Capto S, da eluição 1 do passo anterior (figura 10B). Foi feito um passo único de eluição com 1 M de NaCl, 50 mM Hepes pH 7,6. O pI teórico da sNTPDase-1 é de 6,57, portanto, a intenção era que a proteína não se ligasse à resina, saindo no VNL (volume não ligado) (figura 10D). Foram feitas tentativas anteriores com a abordagem contrária, em resina de troca aniônica, Capto Q, e mesmo pH, porém muitos contaminantes também se ligaram (dados não mostrados). O terceiro passo foi uma nova afinidade do VNL do passo anterior. Como não houve picos definidos, todas as frações foram dosadas quanto ao conteúdo protéico total, e as mais concentradas foram aplicadas no gel. Os tampões utilizados foram os mesmos do passo de afinidade 1, porém, a purificação foi feita em FPLC (figura 10C e D).

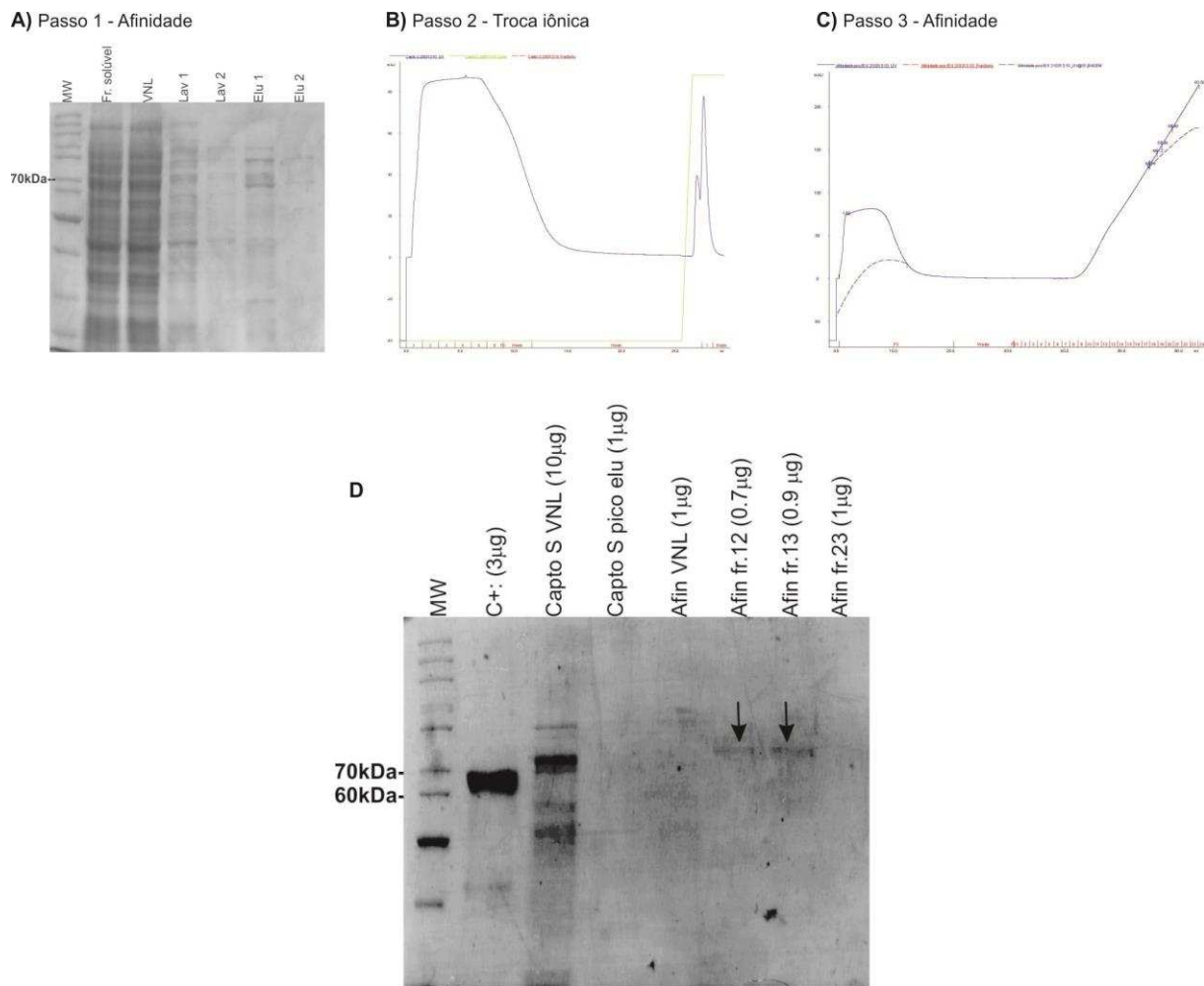


Figura 10- Purificação *multi-step* da sNTPDase-1. Um pellet de 100 mL de indução foi lisado e centrifugado para recuperação da fração solúvel que foi purificada em três passos. **(A)** SDS-PAGE Passo 1: A fração solúvel foi purificada manualmente em resina de níquel. A ligação e lavagens (Lav 1 e 2) foram feitas com 15 mM de imidazol e as eluições (Elu 1 e 2), com 300 mM. Foi aplicado 15 μ L de cada canaleta. **(B)** Cromatograma Passo 2: a eluição 1 foi carregada em uma coluna Capto S, e recuperada no VNL. **(C)** Cromatograma Passo 3: O VNL foi carregado em uma coluna Histrap FF crude em um FPLC, e eluída em gradiente. **(D)** SDS-PAGE contendo as frações dos passos 2 e 3. (C+) sNTPDase-1 purificada de corpos de inclusão. As concentrações aplicadas em cada canaleta estão indicadas na figura.

Após os três passos específicos de purificação da sNTPDase-1, observamos no gel que as bandas que corresponderiam a proteína solúvel aparecem um pouco acima da banda do C+, que corresponde à proteína purificada de corpos de inclusão. Essa diferença no padrão de migração no gel pode ser devido a várias situações, porém consideramos duas hipóteses como mais prováveis: desnaturação incompleta, devido à grande diferença de concentração entre as amostras, a concentração de agentes desnaturantes pode ter sido insuficiente no caso da proteína de corpos de inclusão (C+), que teria, nesse caso, um menor raio e, portanto, maior mobilidade no gel comparada à forma solúvel, totalmente reduzida. Outra possibilidade seria a presença de possíveis modificações sofridas pela forma solúvel. De qualquer forma, para que haja confirmação de que a banda purificada corresponde à sNTPDase-1, é necessário que seja feito um *western blotting*. Caso isso se confirme, o sequenciamento por espectrometria de massa seria interessante para verificar se há alguma modificação na forma solúvel da proteína. Todas as frações evidenciadas apresentaram atividade nucleotidásica. Após esses três passos de purificação, um quarto passo deverá ser feito. A cromatografia por exclusão molecular irá mostrar se a proteína está homogênea e monodispersa. A partir daí, seria possível dar início a ensaios estruturais, visando a cristalização da sNTPDase-1.

Busca por inibidores da sNTPDase-1

A identificação de possíveis inibidores enzimáticos é um passo importante para se iniciar um projeto de busca por novas drogas, e tem como principal fonte de novos compostos, os produtos naturais. Outra estratégia muito utilizada é a síntese de análogos de substrato. Além disso, a combinação de abordagens experimentais e computacionais vem sendo muito utilizada na seleção e otimização de compostos bioativos (Guido *et al.*, 2011).

Como discutido anteriormente, consideramos a TcNTPDase-1 um alvo em potencial para o desenho de novas drogas para a quimioterapia da

doença de Chagas por possuir um papel na virulência, infecção e, possivelmente, na adesão de *T. cruzi* à célula hospedeira (Fietto *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2009; Mariotini-Moura *et al.*, 2014). Anteriormente, foram testados análogos de adenina, que compõe os nucleotídeos ATP e ADP, hidrolisados pela TcNPTDase-1. Foram obtidos dois compostos com inibição aparentemente competitiva de 93% e 73% da atividade ATPásica (Moura, 2010). Decidimos também testar produtos naturais e outros compostos frente à atividade UDPásica da sNTPDase-1. O UDP foi escolhido como substrato por apresentar a maior taxa de hidrólise pela enzima. Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços (Moura, 2010). Para cada ensaio havia um controle de atividade, contendo somente os constituintes usuais do tampão e nucleotídeo (não mostrado), e um controle da atividade na presença de DMSO a 1%, mesma concentração presente na reação com os compostos (reação controle).

Os primeiros compostos testados foram extraídos e disponibilizados pelo grupo do Prof. Paulo César Vieira (UFSCAR). Trata-se de compostos sintéticos e extratos variados de origem vegetal e de microrganismos, bem como compostos isolados a partir desses e outros extratos (anexo III). A princípio, como não era esperada a inibição competitiva, fizemos os ensaios de triagem de inibidores com uma concentração 25x maior de substrato com relação à concentração dos compostos (figura 11). Para aqueles compostos com massa molecular conhecida, usamos 100 μ M de cada, e para os extratos, usamos 100 μ g de cada, por ensaio.

Alguns compostos inibiram parcial ou totalmente a atividade da enzima (figura 11). Os mesmos compostos foram testados em concentração competitiva de substrato (100 μ M) e, como esperado, o padrão se manteve para aqueles compostos com atividade inibitória (figura 12). Nenhum outro composto foi capaz de inibir nessas condições (figura 12).

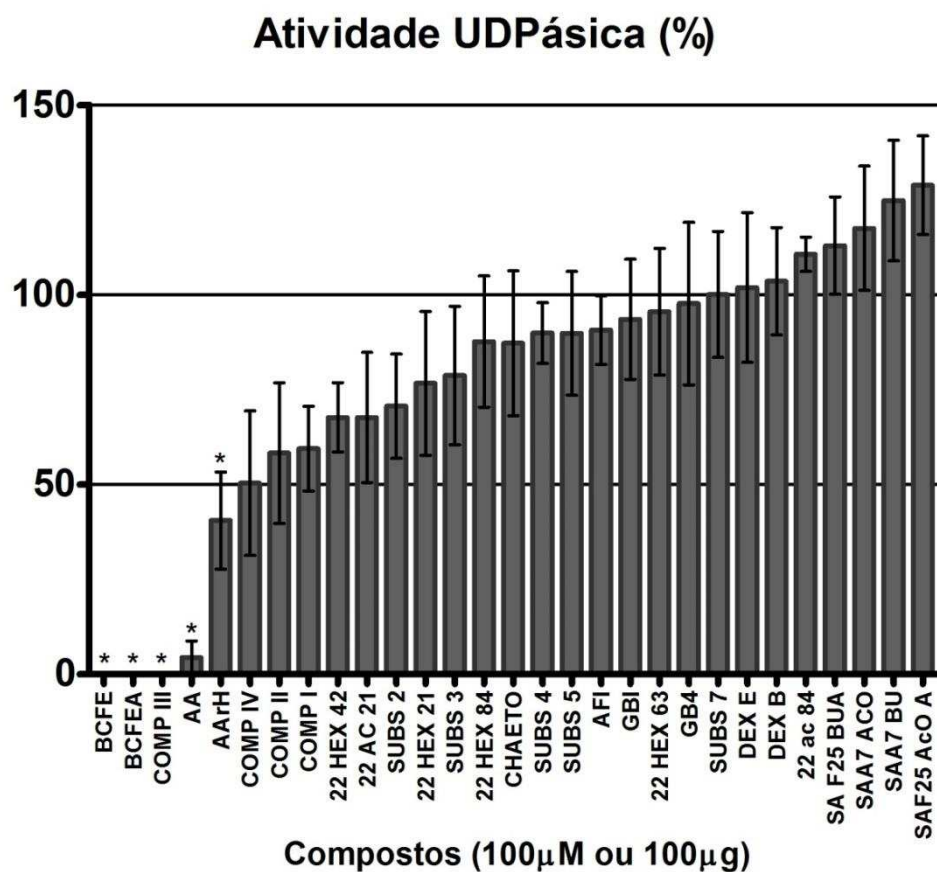


Figura 11- Triagem de compostos por inibição da atividade UDPásica da sNTPDase-1, em alta concentração de substrato. Foi utilizado 2,5 mM de UDP e 100 μM/ μg de cada um dos compostos/extratos. O controle continha 1% DMSO, mesma concentração presente nas outras reações. Os ensaios foram feitos em triplicatas biológicas independentes. O gráfico foi construído com os dados de atividade normalizados em relação ao controle (100%) e submetidos a 1 way ANOVA, utilizando o software GraphPad Prisma versão 5.01 *(P<0,05).

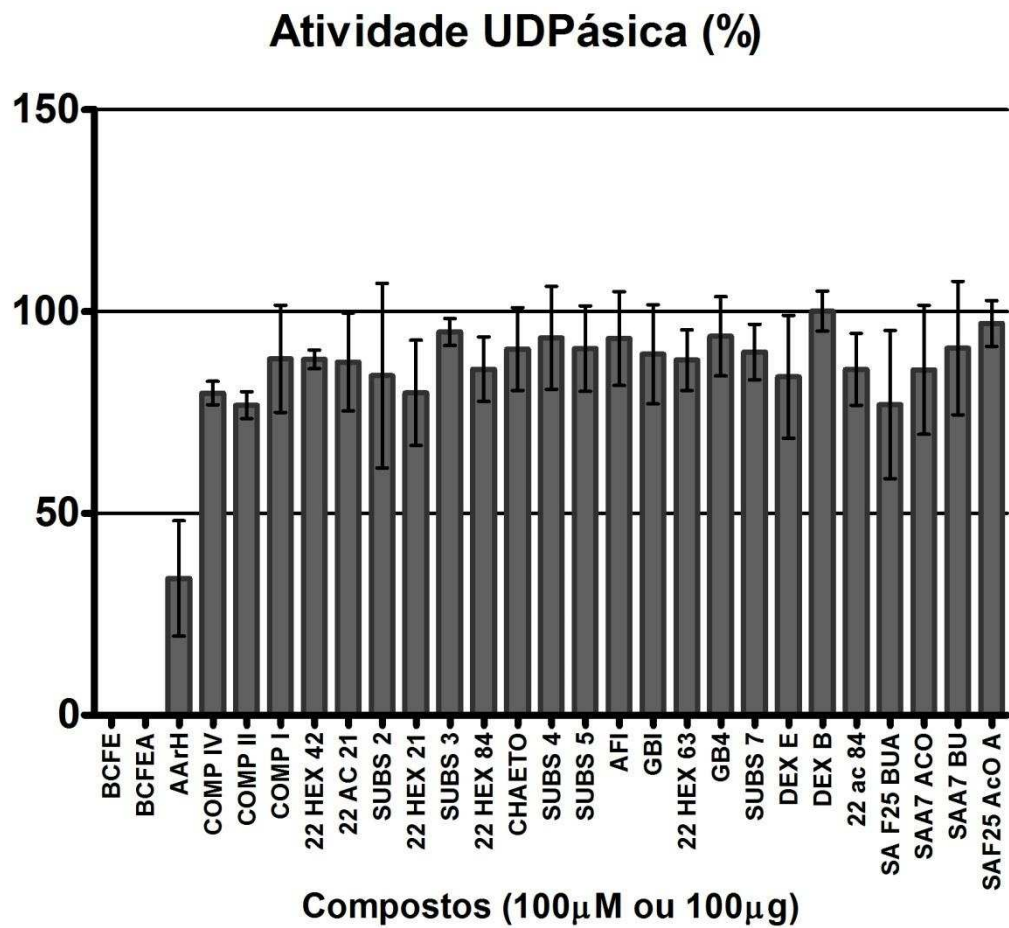


Figura 12 - Triagem de compostos por inibição da atividade UDPásica da sNTPDase-1, em baixa concentração de substrato. Foi utilizado 100 µM de UDP e 100 µM/ µg de cada um dos compostos/extratos. O controle continha 1% DMSO, mesma concentração presente nas outras reações. Os ensaios foram feitos em triplicatas biológicas independentes. O gráfico foi contruído com os dados de atividade normalizados em relação ao controle (100%) e submetidos a 1 way ANOVA, utilizando o software GraphPad Prisma versão 5.01 *(P<0,05).

BCFE e BCFEA (anexo III) são extratos de folha de *Byrsonima coccolobifolia*, extraídos por solventes diferentes, e foram capazes de abolir atividade da sNTPDase-1, apresentando IC₅₀ de 0,07 µg/µL e 0,06 µg/µL, respectivamente (figura 13). O composto AA também mostrou inibição de 96% (±4%), porém, essa inibição caiu para cerca de 60% durante o período de armazenamento em solução de DMSO 10% (figura 14).

Um grande desafio, quando se trata da descoberta de drogas a partir de produtos naturais, é a identificação do composto bioativo isolado a partir de um extrato bruto. O Composto III (CIII) foi o primeiro composto puro isolado a partir do BCFE/BCFEA a ser testado, e sustentou os 100% de inibição apresentados pelo extrato (figura 11). A partir daí, supomos que o CIII seria o composto bioativo que procurávamos. Esse composto é um derivado glicosilado da quercetina, quercetina-3-O-L-glicopiranosídeo (anexo III), e se mostrou instável, perdendo parte de sua atividade inibitória de 100% para cerca de 70% durante o período de armazenamento em solução de DMSO (figura 14).

Além do CIII, três novos compostos foram isolados a partir do BCFE/BCFEA, são eles o CHSgl, CHy e Ep (anexo III), todos flavonóides com estrutura semelhante a da quercetina (Qrc). Testamos esses compostos quanto a inibição da atividade UDPásica da sNTPDase-1, além também da quercetina comercial (quercetin dihydrate- Sigma[®]), a quercetin 3-β-D-glucoside (Sigma[®]), aqui chamado CIII-D, pois corresponde à forma dextrógera do CIII testado anteriormente, agora chamado CIII-L. Testamos também os compostos AA e CIII-L, após a queda da atividade inibitória. Todos esses compostos foram testados em condições de excesso de substrato (ensaio não-competitivo) (figura 14) e em concentrações iguais de substrato/composto (ensaio competitivo) (figura 14).

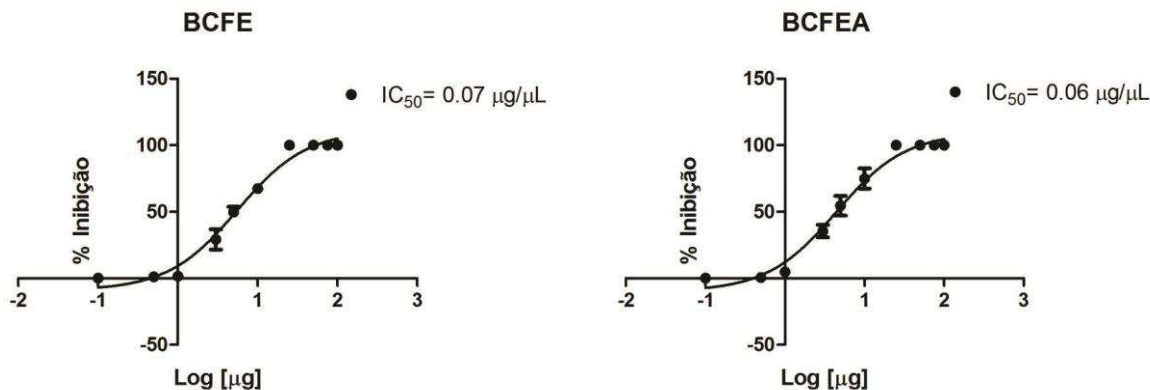


Figura 13- IC₅₀ dos extratos BCFE e BCFEA com relação à atividade UDPásica da sNTPDase-1. A determinação da atividade enzimática foi realizada pela medida da hidrólise de UDP por verde malaquita. Foi utilizado 2,5 mM de UDP. Os ensaios foram feitos em triplicata. Os gráficos foram construídos com os dados de atividade transformados (log[inibidor] x resposta) e normalizados, utilizando o software GraphPad Prisma versão 5.01.

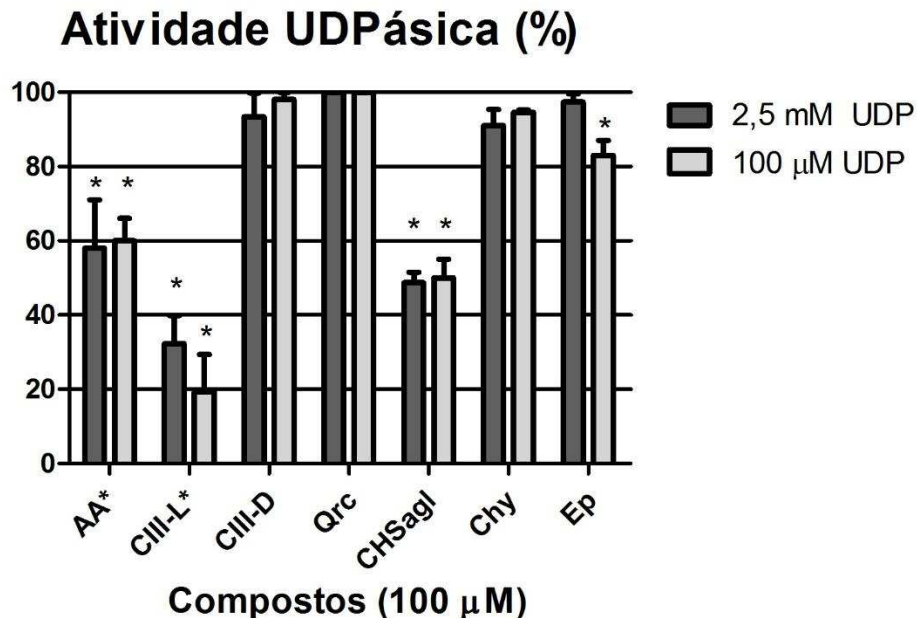


Figura 14- Ensaio de inibição da atividade UDPásica da sNTPDase-1 por derivados do BCFEA. A determinação da atividade enzimática foi realizada pela medida da hidrólise de UDP por verde malaquita. Foi utilizado 2,5 mM ou 100 µM de UDP e 100 µM de cada um dos compostos. O controle continha 1% DMSO, mesma concentração presente nas outras reações. Os ensaios foram feitos em triplicata. *AA e *CIII-L correspondem aos compostos após queda da atividade inibitória. O gráfico foi construído com os dados de atividade normalizados em relação ao controle (100%) e submetidos a 2 way ANOVA, utilizando o software GraphPad Prisma versão 5.01 *(P<0,05).

Como era esperado, não houve diferença significativa com relação à concentração de substrato presente na reação, o que fortalece a presença de inibição do tipo não-competitiva ou incompetitiva. Mesmo com a queda na capacidade inibitória, AA e CIII-L ainda foram os melhores candidatos. Como a disposição espacial dos substituintes (estereoquímica) é crucial na determinação da atividade de um composto, a mesma substância com disposição espacial distinta pode não apresentar efeito biológico. Foi o que aconteceu no caso do CIII, pois ao contrário do CIII-L, o CIII-D não apresentou nenhum efeito sobre a atividade enzimática. Apesar da grande semelhança estrutural, somente CHSagl apresentou inibição significativa relevante (50%), comparado com Chy, Ep e a quercetina dihidratada (anexo III).

A quercetina é um flavonol, classe de flavonóides com grande capacidade antioxidante. Os flavonóides são compostos polifenólicos com um esqueleto carbônico de 15 átomos, organizado em três anéis (A, B e C), sendo dois aromáticos (A e B) ligados por um anel pirano (C) (figura 15A) (Behling, 2004). Várias propriedades terapêuticas dos flavonóides, principalmente da quercetina (figura 15B), tem sido estudadas, entre elas, seu efeito antimicrobiano e antiviral (Gravina *et al.*, 2011; Rahman *et al.*, 2013; Rizzo *et al.*, 2013). Os flavonóides frequentemente ocorrem como heterosídeos, que é o caso do CIII (figura 15C), conhecidos por apresentar alta biodisponibilidade.

Para melhor compreender a capacidade inibitória destes compostos, procuramos avaliar a interação dos melhores inibidores com a sNTPDase-1. Resultados de ancoramento molecular trouxeram novos *insights* sobre o encaixe dos inibidores no sítio ativo (contendo as ACRs) do modelo estrutural proposto (figura 16). As melhores poses obtidas do ancoramento da quercetina sugerem que após a ligação do inibidor ao sítio ativo, um bolso de ligação ainda permanece livre para demais interações. Esse bolso é completamente preenchido pela porção L-glicosídica do composto CIIIL, tornando-o mais específico (figura 16 A-E). Esses resultados computacionais corroboram com os dados de inibição obtidos experimentalmente e criam

diretrizes promissoras quanto ao mecanismo de ligação dos compostos Quercetina e CIIL (figura 15) à sNTPDase 1. De acordo com nossos resultados a presença da porção L-glicosídica na posição 3 é essencial para a inibição da sNTPDase-1, já que a quercetina sozinha ou glicosilada com D-glicose na mesma posição não apresentou efeito inibitório (figura 14).

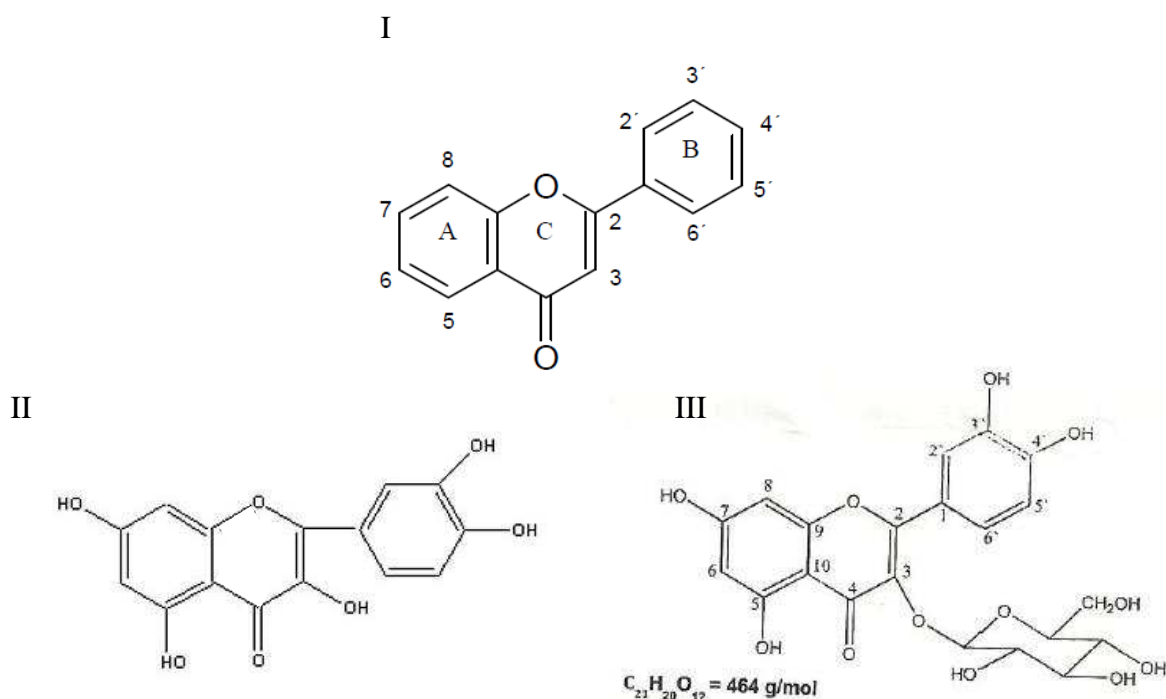


Figura 15- Estrutura química dos flavonóides. (I) Estrutura básica dos flavonóides. (II) Estrutura da quercetina. (III) Quercetina-3-β-O-L-glicopiranosídeo (CIIL).

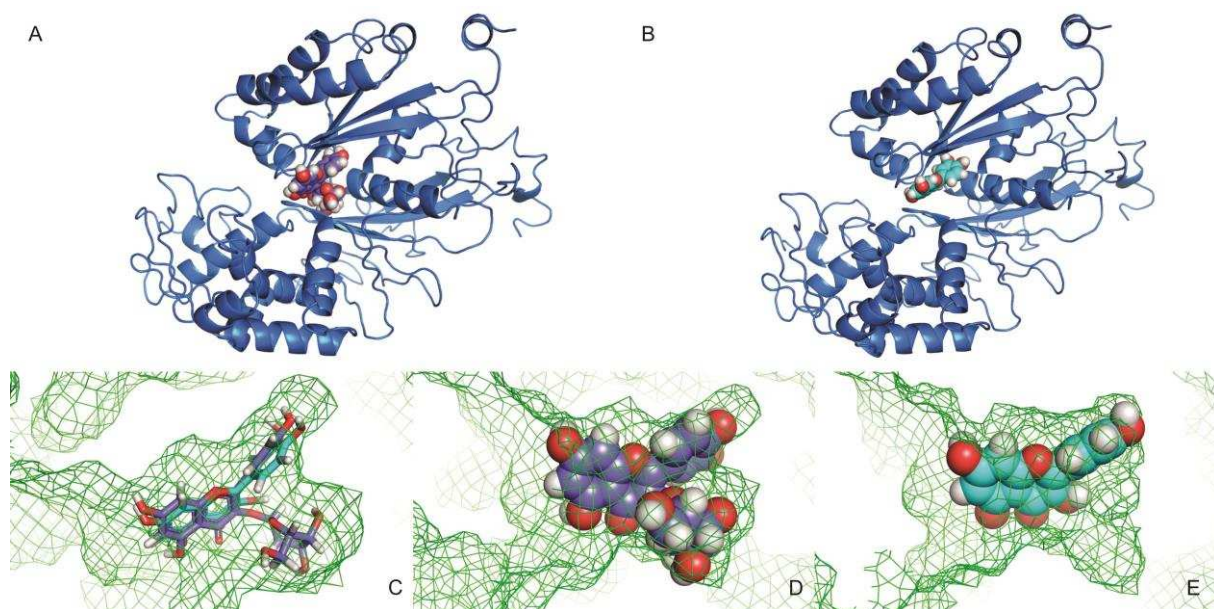


Figura 16- Ancoramento da Quercetina e do CIII-L no sítio ativo da sNTPDase-1. (A) Ancoramento do CIII-L à sNTPDase-1. (B) Ancoramento da quercetina à sNTPDase-1. (C-E) Detalhe mostrando o sítio ativo da sNTPDase-1, com ancoramento (C) sobreposto CIII-L/Quercetina, (D) somente CIII-L e (E) somente quercetina.

Uma vez escolhido o melhor sistema de trabalho para simular o sistema proteína-ligante, as poses de menor energia do ancoramento da quercetina e CIII-L, ligadas à proteína, serão levadas às respectivas simulações de dinâmica molecular para compreender o comportamento das interações propostas ao longo do tempo. A compreensão do mecanismo de interação abre caminhos para desenhos de drogas mais específicas e eficazes na inibição da TcNTPDase1.

Nos ensaios enzimáticos, o CIII-L foi capaz de inibir completamente a enzima, mesmo em condições de excesso de substrato, sugerindo uma inibição do tipo não-competitiva ou incompetitiva. No entanto, nas análises de ancoramento molecular, o composto mostrou grande afinidade pelo sítio ativo, mesmo no ancoramento inicial, onde foi dada total liberdade de interação. Para se conhecer melhor o mecanismo de inibição desse composto, seria necessária a realização do ensaio duplo-recíproco, não realizado devido à pequena quantidade de composto fornecido.

A partir desses resultados, e diante da falta do CIII-L isolado, duas abordagens foram exploradas: síntese do CIII-L pelo grupo do Professor Gaspar Diaz Muñoz (UFMG), com avaliação dos intermediários, e teste com outros derivados comerciais de quercetina. Alguns destes compostos possuem também carboidratos ligados, na tentativa de reproduzir o resultado obtido com o CIII-L, onde a presença da L-glicose parece ser essencial (figura 16).

A síntese do intermediário protegido do CIII-L foi realizada com sucesso, porém a instabilidade do composto desprotegido tem se mostrado um fator limitante. Até o presente momento não foi possível obter o CIII-L sintético, de forma pura e estável, para a continuidade dos estudos deste inibidor. Com relação aos compostos comerciais, foram testados quatro compostos (anexo IV), quercetina 3-glucuronídeo (miquelianina), spiraeosídeo, avicularina e quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosídeo. Apesar das semelhanças entre os compostos, apenas a miquelianina foi capaz de inibir a enzima, de 20% a 40%, enquanto que os outros compostos chegaram

a causar um aumento de atividade (figura 17). O teste com esses compostos foi feito somente em condições de baixa concentração de substrato.

Foram testados novos extratos e compostos frente à atividade da NTPDase-1. A professora Marisa Alves Nogueira Diaz (UFV) cedeu cinco extratos vegetais brutos, extraídos de diferentes espécies, referidos aqui como M1-M5. Por se tratarem de extratos, os ensaios de triagem foram feitos em baixa concentração de substrato, para que não se perdesse nenhum inibidor em potencial. Nessas condições, os extratos M2 e M3 aboliram a atividade da enzima (figura 18A), sustentando a inibição em altas concentrações de substrato (figura 18B). O composto crisofanol foi isolado a partir do extrato M2 e também testado, porém não foi capaz de inibir a NTPDase. Portanto, não se conhece ainda o(s) composto(s) bioativo(s) responsável(is) pela atividade inibitória dos extratos testados, até o momento.

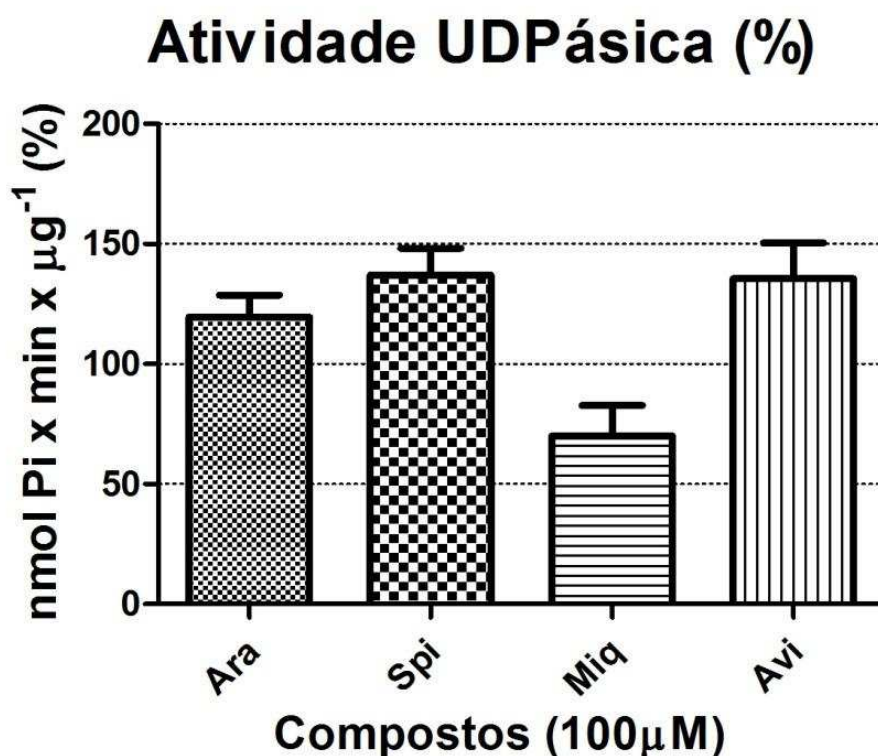


Figura 17 - Ensaio de inibição da atividade UDPásica da sNTPDase-1 por derivados da Quercetina. A determinação da atividade enzimática foi realizada pela medida da hidrólise de UDP por verde malaquita. Foi utilizado 100 µM de UDP e 100 µM de cada um dos compostos. O controle continha 1% DMSO, mesma concentração presente nas outras reações. Os ensaios foram feitos em triplicata. **Ara** (Quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo), **Spi** (Spiraeosídeo), **Miq** (Miquelianina) e **Avi** (Avicularina). O gráfico foi construído com os dados de atividade normalizados em relação ao controle (100%) e submetidos a 1 way ANOVA, utilizando o software GraphPad Prisma versão 5.01 *(P<0,05).

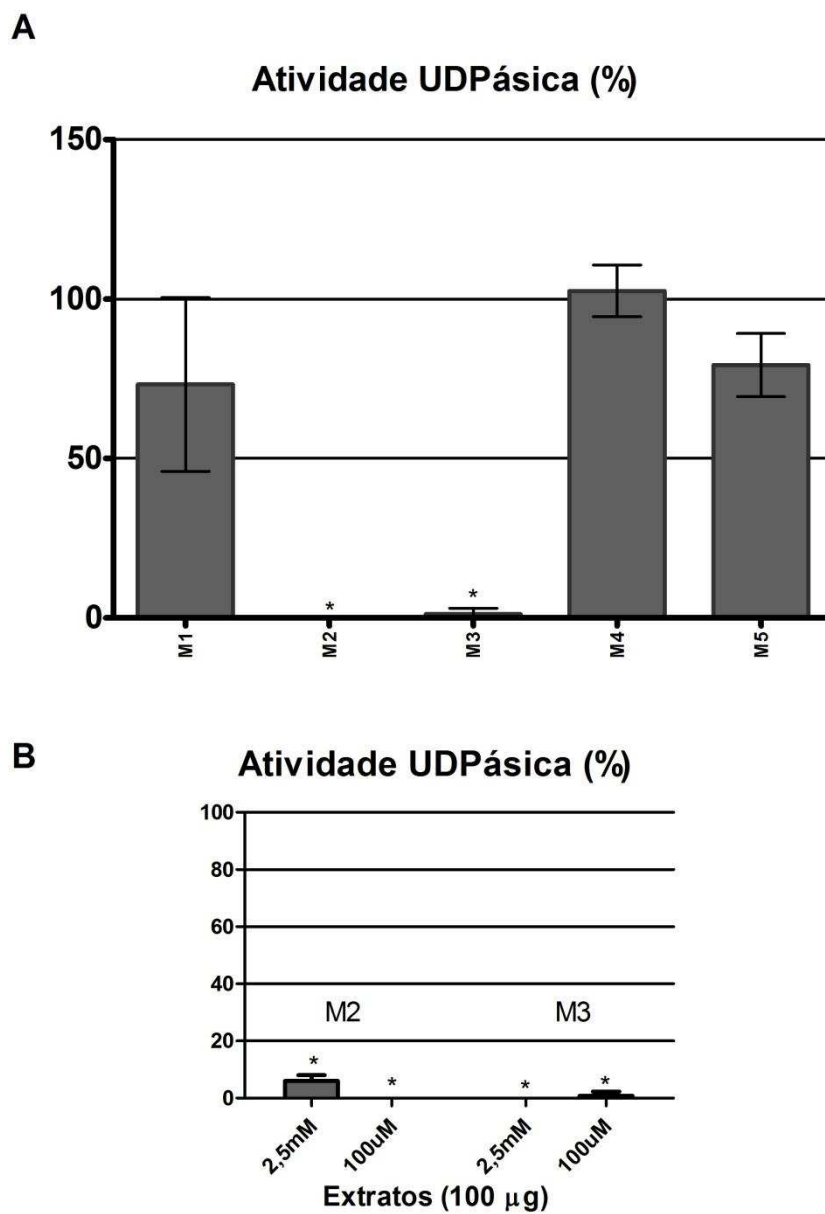


Figura 18- Ensaio de inibição da atividade UDPásica da sNTPDase-1 por extratos vegetais. A determinação da atividade enzimática foi realizada pela medida da hidrólise de UDP por verde malaquita. Foi utilizado 100 µM (A) ou 2,5 mM e 100 µM (B) de UDP e 100 µg de cada um dos extratos. O controle continha 1% DMSO, mesma concentração presente nas outras reações. Os ensaios foram feitos em triplicata. Os gráficos foram construídos com os dados de atividade normalizados em relação ao controle (100%) e submetidos a 1 way ANOVA (A) e 2 way ANOVA (B), utilizando o software GraphPad Prisma versão 5.01 *(P<0,05).

Uma série de três outros compostos foram testados. A angustureína é um composto derivado alcalóide, que ocorre naturalmente na casca do tronco de *Galipea officinalis*, árvore originária da Venezuela, onde é utilizada na medicina popular (Jacquemond-Collet *et al.*, 2001). Seus enantiômeros e seu racemato (figura 19) foram sintetizados e cedidos pelo grupo do Professor Gaspar Diaz Muñoz (UFMG) (Diaz; *et al.*, 2013) e testados em condições de baixa concentração de substrato, porém não apresentaram inibição da sNTPDase-1 (figura 20).

Outra classe de compostos testados foi a das isobenzofuranonas, que tem uma vasta atividade antimicrobiana relatada (Rahman e Gray, 2005), em especial atividade antifúngica (Strobel *et al.*, 2002). Esta classe de compostos já foi avaliada também pela sua capacidade antitumoral (Logrado *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2013). Os compostos foram sintetizados e cedidos pelo Professor Robson Ricardo Teixeira (UFV) (Teixeira *et al.*, 2013). Dentre os dez (10) compostos testados (anexo V), somente o WLP3 e o WLP8 causaram inibição significativa de aproximadamente 20% para ambos (figura 21).

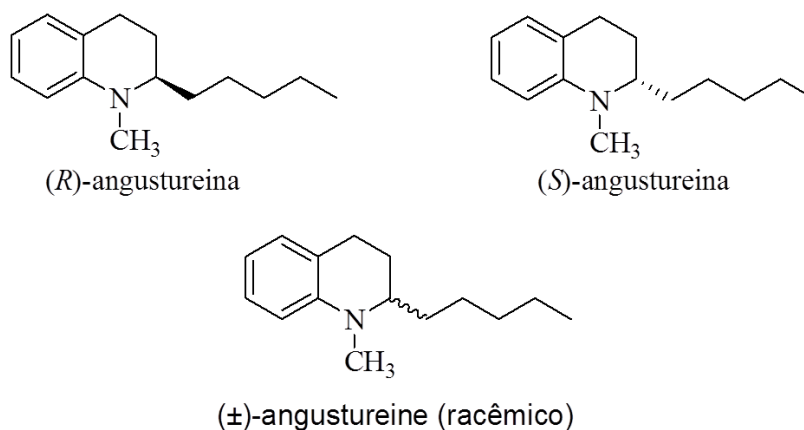


Figura 19- Estrutura química da angustureína. Enantiômeros (R) e (S) e mistura racêmica.

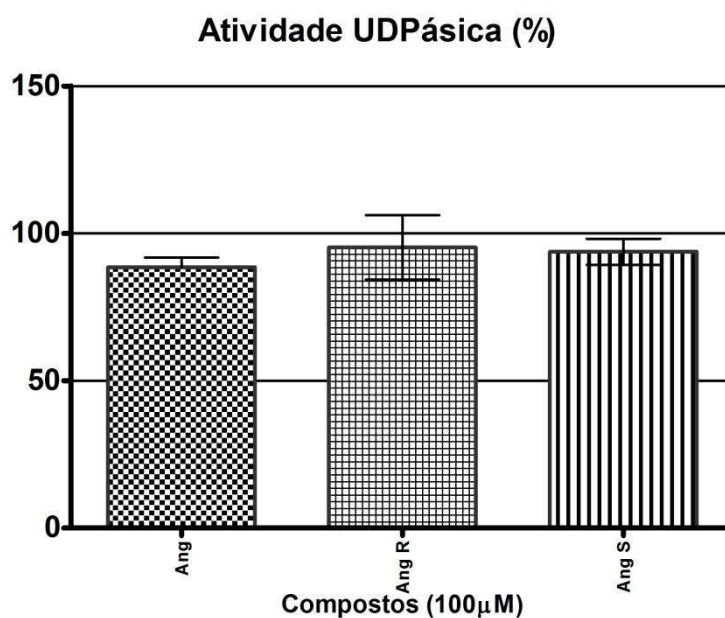


Figura 20 - Ensaio de inibição da atividade UDPásica da sNTPDase-1 pela Angusgureína. A determinação da atividade enzimática foi realizada pela medida da hidrólise de UDP por verde malaquita. Foi utilizado 100 μ M de UDP e 100 μ M de cada uma das preparações. O controle continha 1% DMSO, mesma concentração presente nas outras reações. Os ensaios foram feitos em triplicata. Os gráficos foram construídos com os dados de atividade normalizados em relação ao controle (100%) e submetidos a 1 way ANOVA utilizando o software GraphPad Prisma versão 5.01 *($P < 0,05$).

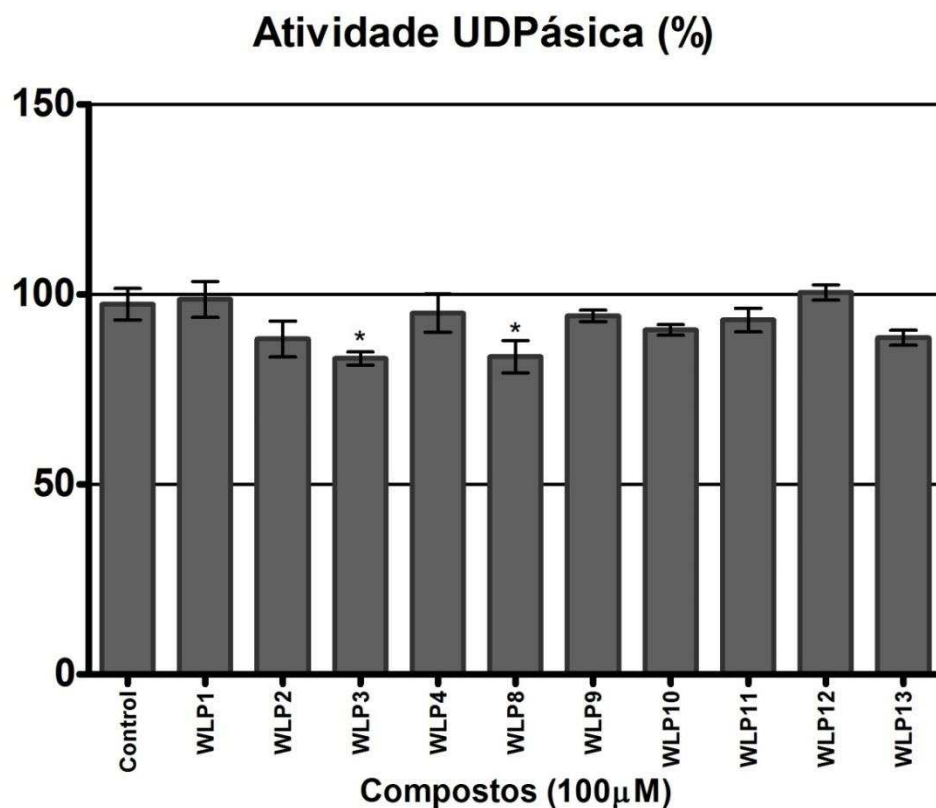


Figura 21- Ensaio de inibição da atividade UDPásica da sNTPDase-1 pelas Isobenzofuranonas. A determinação da atividade enzimática foi realizada pela medida da hidrólise de UDP por verde malaquita. Foi utilizado 100 μM de UDP e 100 μM de cada uma das preparações. O controle continha 1% DMSO, mesma concentração presente nas outras reações. Os ensaios foram feitos em triplicata. Os gráficos foram construídos com os dados de atividade normalizados em relação ao controle (100%) e submetidos a 1 way ANOVA utilizando o software GraphPad Prisma versão 5.01 *($P < 0,05$).

Avaliação da ação de compostos sobre epimastigotas de T. cruzi

Para iniciar os experimentos com os parasitos, primeiro foi feita uma curva de crescimento dos epimastigota em meio GRACE's, onde os parasitos foram semeados a 1×10^5 parasitos/mL em 10 mL do meio de cultura, e contados em câmara de Neubauer por 15 dias (figura 22).

Analisando-se o gráfico, pode-se observar que a fase lag de crescimento dos parasitos durou até, aproximadamente, o 3º dia, a fase log, do 4º ao 9º dia e a fase estacionária do 10º ao 13º dia, entrando em fase de morte celular. Para a realização dos ensaios os parasitos foram mantidos em fase log, na concentração de 5×10^6 parasitos/mL, como descrito em material e métodos.

A ação dos compostos testados foi avaliada pela inibição do crescimento dos epimastigotas em cultura, após 24, 48 e 72 horas. Para isso utilizamos o corante resazurina, principal componente do Alamar Blue® (O'brien *et al.*, 2000), reagente já utilizado na avaliação da atividade anti-*T. cruzi* de alguns compostos (Rolon *et al.*, 2006).

A resazurina é um indicador colorimétrico de proliferação celular baseado na sua redução pela atividade metabólica das células. O corante de cor azul (resazurina - forma oxidada) é reduzido, passando para a cor rosa (resorufina - forma reduzida) (figura 23), e esta mudança de cor pode ser medida pela leitura colorimétrica ou fluorimétrica (Ahmed *et al.*, 1994; O'brien *et al.*, 2000)

As duas variáveis que mais afetam a resposta das células à resazurina são o tempo de incubação e o número de células plaqueadas, sendo necessário padronizar esses parâmetros para cada tipo celular. Como a resazurina foi utilizada para estimar a toxicidade dos compostos para células VERO, bem como para formas epimastigotas de *T. cruzi*, inicialmente foram realizados experimentos para otimizar o número de células utilizadas, bem como o tempo de incubação necessário com o corante para cada tipo celular (figuras 24 e 25).

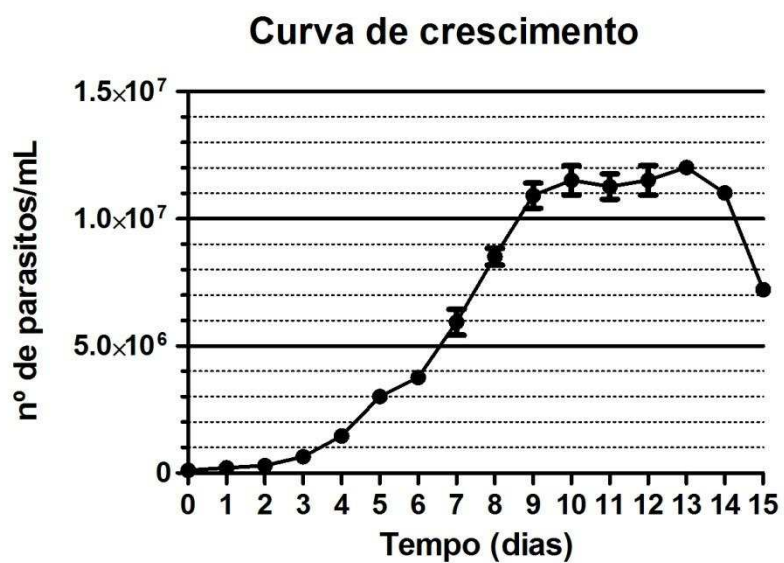


Figura 22- Curva de crescimento de epimastigotas de *T. cruzi*. Os parasitos foram cultivados em meio Grace's a 28°C durante 15 dias. Os dados são relativos à contagem média de quatro experimentos independentes.

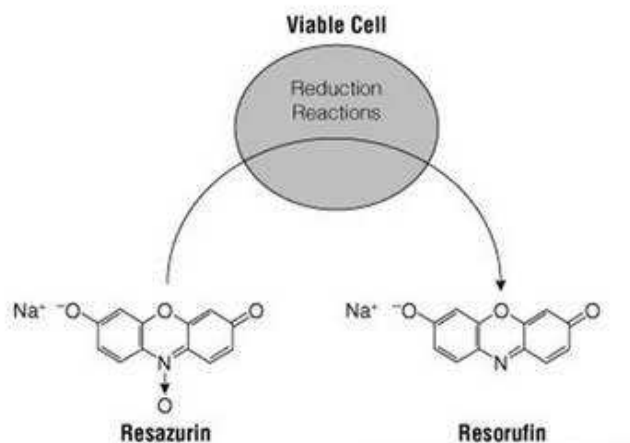


Figura 23- Redução do corante resazurina.

Para *T. cruzi*, as formas epimastigotas foram semeados em placas de 96 poços, fazendo uma diluição seriada a partir de 1×10^7 parasitos por poço. Após 24 h, 48 h e 72 horas de incubação foi adicionada a resazurina a cada poço. A reação foi lida a cada hora, até que o corante fosse completamente reduzido. Foram escolhidos os pontos com aproximadamente 80% de redução do corante, para evitar saturação durante os experimentos. Sendo assim, para os ensaios com os compostos escolhemos a concentração de 5×10^6 parasitos/mL (figura 24A-C) e as leituras foram feitas com 4h, 3h e 2h para as placas de 24 h, 48 h e 72h, respectivamente (figura 24D).

Para as células VERO, partiu-se da concentração de 1×10^5 células/poço para a diluição seriada. A placa foi incubada por 24 h, 48 h e 72 h a 37°C, 5% de CO₂. Após esse período, foi adicionada a resazurina, procedimento seguido de nova incubação a 37°C. A leitura da reação foi realizada a 570 nm e 600 nm, a cada hora, até que fosse alcançado cerca de 80% de redução. A escolha dos pontos se deu da mesma forma descrita para os epimastigotas. Sendo assim, para os ensaios com os compostos escolhemos a concentração de $2,5 \times 10^4$ células/mL (figura 25A-C) e as leituras foram feitas com 4 h, 3 h e 3 h para as placas de 24 h, 48 h e 72 h, respectivamente (figura 25D).

A princípio testaríamos somente os inibidores da sNTPDase-1 também nos parasitos, porém, optamos por também testar aqueles compostos com atividade biológica conhecida. Nem todos os compostos foram utilizados, pois os ensaios utilizando a resazurina como indicador de viabilidade ainda estão sendo melhor avaliados, que é o caso para as angustureínas, que ainda serão testadas. Quanto aos extratos e compostos inibidores da enzima, grande parte deles não está mais disponível no laboratório, portanto não foram testados. Ensaio preliminares foram realizados utilizando as isobenzofuranonas (anexo V), os intermediários de síntese do CIII, KS25 e KS39 (anexo VI), e os extratos disponíveis que inibiram a enzima (figura 18). Os compostos/extratos foram testados nos epimastigotas na concentração de 100 μ M a princípio (figura 26).

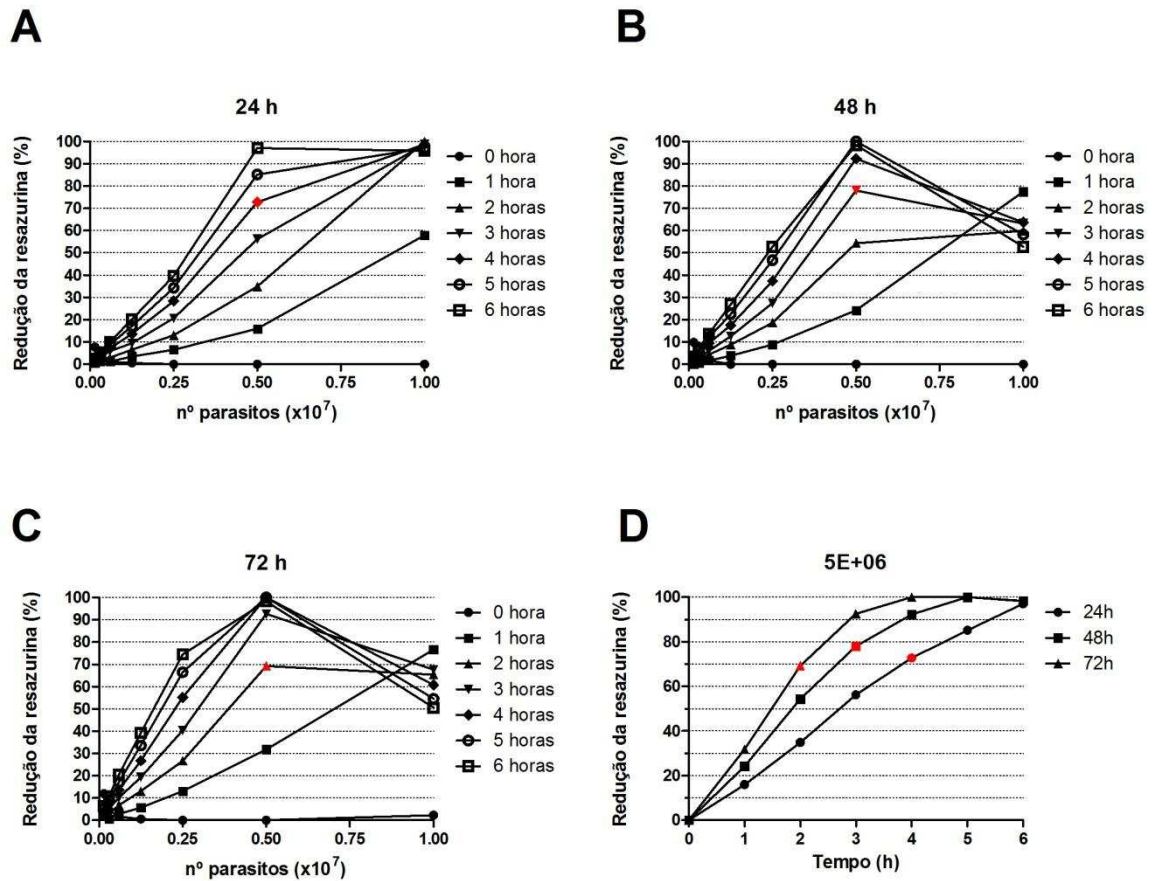


Figura 24- Padronização da Resazurina para epimastigotas de *T. cruzi*. (A-C) N° de parasitos x redução do corante. (D) Tempo de leitura x redução do corante. Epimastigotas foram contados em câmara de Neubauer. Foram feitas 7 diluições seriadas em triplicata na proporção de 1:2 (sendo 200 μ L de volume final em cada poço) e a placa então incubada por 24 h, 48 h e 72 horas a 28°C. Após esse período foram adicionados 20 μ L de resazurina 1 mM a cada poço. A reação foi lida de hora em hora. As leituras de absorbância foram feitas a 570 e 600 nm. A porcentagem de redução do corante foi calculada como descrito em material e métodos. Os pontos vermelhos foram os escolhidos para as análises.

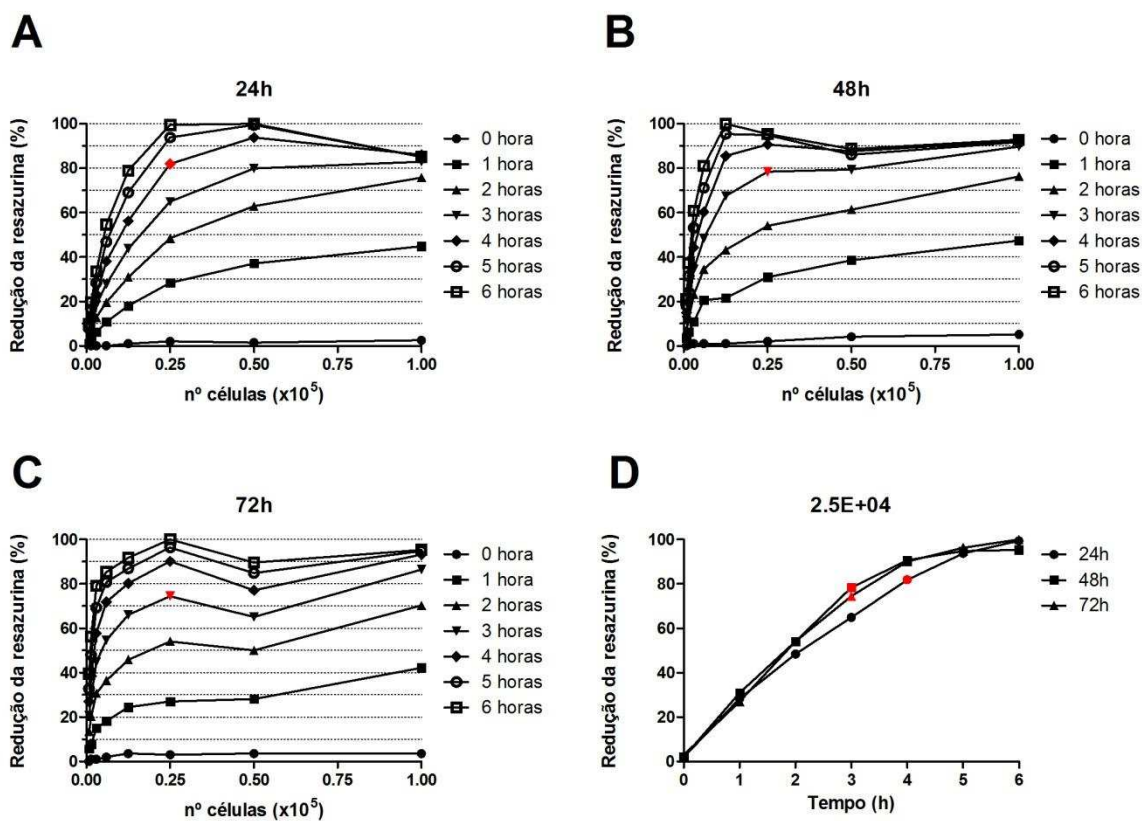


Figura 25- Padronização da Resazurina para células VERO. (A-C) Nº de células x redução do corante. (D) Tempo de leitura x redução do corante. Células VERO foram contados em câmara de Neubauer. Foram feitas 7 diluições seriadas em triplicata na proporção de 1:2 (sendo 200 µL de volume final em cada poço) e a placa então incubada por 24 h, 48 h e 72 horas a 28°C. Após esse período foram adicionados 20 µL de resazurina 1mM a cada poço. A reação foi lida de hora em hora. As leituras de absorbância foram feitas a 570 e 600 nm. A porcentagem de redução do corante foi calculada como descrito em material e métodos. Os pontos vermelhos foram os escolhidos para as análises.

As formas do *T. cruzi* diferem, por exemplo, quanto às proteínas de superfície, permitindo que as formas infecciosas escapem do sistema complemento, sendo, portanto, cruciais na infecção das células (Dosreis, 2011). Sendo assim, mesmo aqueles compostos que não afetaram os parasitos foram testados também nas células VERO (figura 27), pois serão testados posteriormente em ensaios de infecção, para avaliar os efeitos sobre os amastigotas e os tripomastigotas.

Como pode ser observado na figura 26, para epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y), o WLP8 até agora mostrou eficiência comparável à do benzonidazol, o fármaco de referência (cerca de 50% de inibição da redução da resazurina) (figura 26). Embora apresente uma citotoxicidade para células VERO cerca de três vezes maior do que benzonidazol (figura 27), este composto ainda é considerado um bom candidato, uma vez que os valores de EC50 para o parasita e LD50 para as células de mamífero ainda não foram estabelecidos (em progresso). Além disso, o efeito citotóxico parece ser revertido, após 72 horas, enquanto que o possível efeito tripanocida é mantido (figuras 26 e 27).

Em ensaios anteriores o WLP3 também apresentou atividade tripanocida de 100% em apenas 24h, porém, a quantidade de parasitos utilizada foi bem inferior (1×10^6). A redução da resazurina pelos epimastigotas parece ser lenta e por isso foi necessária a utilização de grande quantidade de parasitos. Acreditamos que isso possa ter interferido na atividade dos compostos, no sentido de mascarar a ação, por exemplo, do WLP3, visto que a concentração utilizada nos ensaios foi a mesma, porém para uma quantidade cinco vezes maior de parasitos.

Atividade tripanocida

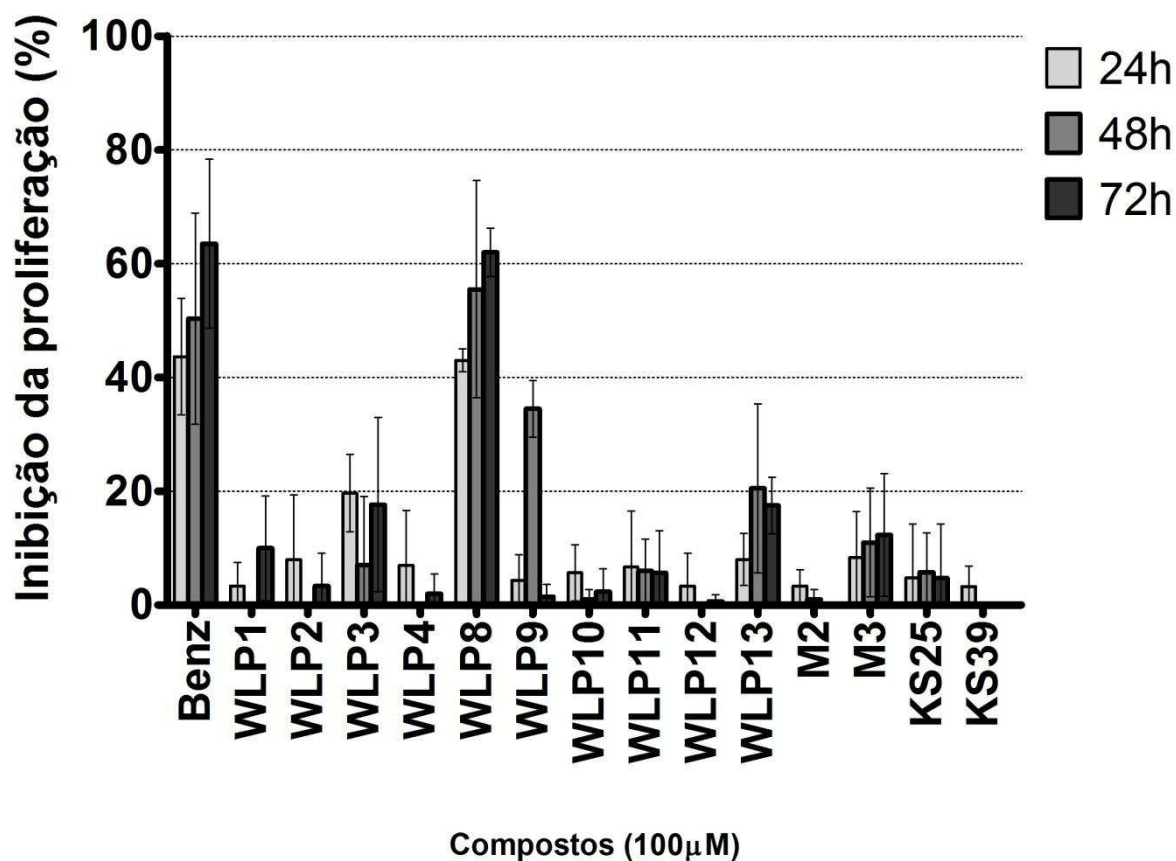


Figura 26- Ensaio de viabilidade de epimastigotas. Foram semeados 5×10^6 epimastigotas por poço. Logo após, $100 \mu\text{g}/100 \mu\text{M}$ dos extratos/compostos foram adicionados aos poços contendo os epimastigotas. As placas foram incubadas em estufa BOD, a 28°C , por 24 h, 48 h e 72 horas. Após esse período foram adicionados $20 \mu\text{L}$ de resazurina $1\text{mM}/\text{poço}$ e após 2, 3 ou 4 horas foi realizada a leitura da reação a 570nm e 600nm . Foram adicionados, a cada placa, controles negativos (meio) e (meio + DMSO), controles positivos (meio + parasitos) e (meio + DMSO + parasitos). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com no mínimo 3 repetições. A porcentagem de inibição da proliferação foi calculada conforme descrito em material e métodos.

Citotoxicidade VERO

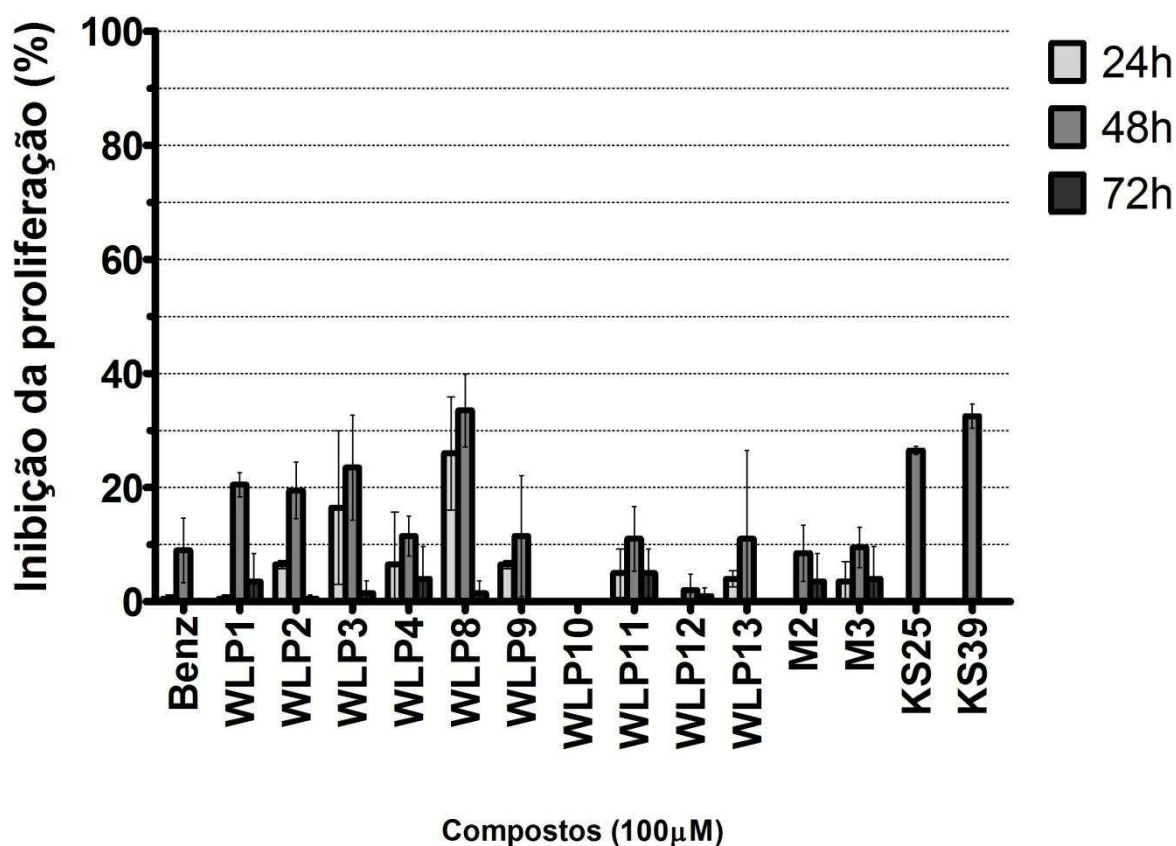


Figura 27- Ensaio de citotoxicidade em células VERO. Foram semeadas $2,5 \times 10^4$ células por poço. Logo após, $100 \mu\text{g}/100 \mu\text{M}$ dos extratos/compostos foram adicionados aos poços. As placas foram incubadas em estufa BOD, a 37°C , $5\% \text{CO}_2$ por 24 h, 48 h e 72 horas. Após esse período foram adicionados $20 \mu\text{L}$ de resazurina 1mM /poço e após 3 ou 4 horas foi realizada a leitura da reação a 570nm e 600nm . Foram adicionados, a cada placa, controles negativos (meio) e (meio + DMSO), controles positivos (meio + parasitos) e (meio + DMSO + parasitos). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com no mínimo 3 repetições. A porcentagem de inibição da proliferação foi calculada conforme descrito em material e métodos.

O WLP3 e o WLP8 foram também, entre as isobenzofuranonas, os únicos a inibir a enzima, mesmo que discretamente (figura 21). Além disso, os extratos M2 e M3 que inibiram a enzima (figura 18) apresentaram baixa atividade frente aos parasitos (figura 26). No entanto, isso não descaracteriza as NTPDases como alvo, pois devemos considerar outros fatores. Existem na membrana dos parasitos, outras ectonucleotidases (Zimmermann, 2001) que estariam ativas, mantendo a hidrólise de nucleotídeos no caso de a NTPDase estar inibida. Para confirmar futuramente se o efeito de um determinado composto sobre os parasitos possa estar relacionado ou não à enzima, seria interessante avaliar o seu efeito sobre a atividade da enzima no parasito, na presença de inibidores de outras ectonucleotidases. Dados recentes, mostram que além dos inativadores "clássicos" de ectoenzimas, há evidências para a co-existência de uma contra-via ATP-regeneradora, compreendendo enzimas das famílias adenilatoquinase (AK) e nucleosídeo difosfato cinase (NDPK / NME / NM23), e ATP sintase (Yegutkin, 2014), que deverá ser considerada nos ensaios biológicos.

Neste trabalho, foram testados ao todo quarenta e nove (49) compostos e dezessete (17) extratos frente à atividade da sNTPDase-1. Destes, dois (02) compostos e quatro (04) extratos aboliram por completo a atividade UDPásica, mesmo em concentrações de substrato 25 vezes maior, mostrando um alta capacidade inibitória. Também foi avaliada a ação sobre epimastigotas de *T. cruzi*, de doze (12) desses compostos e dois (02) extratos, sendo que um composto puro apresentou o melhor resultado, juntamente com a droga de referência, testada como controle.

6. Conclusões:

- A região N-terminal da NTPDase-1 parece não interferir no seu dobramento;
- A sNTPDase-1 recombinante nativa expõe a cauda hexa-his;
- É necessário confirmar a purificação da forma solúvel da sNTPDase-1 por *western blotting*, e avaliar a(s) modificação(es) nessa forma, se houver;
- A uréia em baixa concentração ajuda a estabilizar a proteína renaturada, nas condições testadas;
- A melhor condição testada para a expressão da sNTPDase-1 solúvel foi em meio LB/20°C/24h/0,5mM IPTG
- Extratos de folha de *B. coccolobifolia* foram capazes de abolir atividade UDPásica da sNTPDase-1
- O AA e o CIII-L também foram capazes de abolir a atividade UDPásica da sNTPDase-1, porém se mostraram instáveis em solução;
- A estereoquímica do CIII se mostrou fundamental para sua atividade inibitória;
- As condições de substrato testadas sugerem uma inibição do tipo não-competitiva ou incompetitiva;
- A porção L-glicosídica do CIII o tornaria mais específico comparado à quercetina
- O composto WLP8, inibidor parcial da sNTPDase-1, inibe a proliferação de epimastigotas de *T. cruzi* com eficiência comparável à do benzonidazol;
- A citotoxicidade apresentada pelo WLP8 é revertida pelas células VERO;

7. Referências

ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. **Jpn J Pharmacol**, v. 78, n. 2, p. 113-45, Oct 1998. ISSN 0021-5198 (Print) 0021-5198 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9829617> >.

ABBRACCHIO, M. P.; CERUTI, S. P1 receptors and cytokine secretion. **Purinergic Signal**, v. 3, n. 1-2, p. 13-25, Mar 2007. ISSN 1573-9538 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18404415> >.

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M., JR.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **J Immunol Methods**, v. 170, n. 2, p. 211-24, Apr 15 1994. ISSN 0022-1759 (Print) 0022-1759 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8157999> >.

ALVAREZ, J. M. et al. Chagas disease: still many unsolved issues. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 912965, 2014. ISSN 1466-1861 (Electronic) 0962-9351 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25104883> >.

AMATO NETO, V.; PASTERNAK, J. [Chagas disease centenary]. **Rev Saude Publica**, v. 43, n. 2, p. 381-2, Apr 2009. ISSN 1518-8787 (Electronic) 0034-8910 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19287879> >.

ANDRADE, Z. A. Immunopathology of Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 71-80, 1999. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677693> >.

AREAS, A. P. et al. Synthesis of cholera toxin B subunit gene: cloning and expression of a functional 6XHis-tagged protein in Escherichia coli. **Protein Expr Purif**, v. 25, n. 3, p. 481-7, Aug 2002. ISSN 1046-5928 (Print) 1046-5928 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12182829 >.

ASAI, T. et al. Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan Toxoplasma gondii. **J Biol Chem**, v. 270, n. 19, p. 11391-7, May 12 1995. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7744775> >.

ATKINSON, B. et al. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. **Blood Cells Mol Dis**, v. 36, n. 2, p. 217-22, Mar-Apr 2006. ISSN 1079-9796 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16476557 >.

BARROS, F. S. et al. Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in Entamoeba histolytica. **Arch Biochem Biophys**, v. 375, n. 2, p. 304-14, Mar 15 2000. ISSN 0003-9861 (Print) 0003-9861 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10700386> >.

BEHLING, E., B. . Flavonóide quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas. **Alim. Nutr**, v. 15, n. 3, p. 9, 2004.

BOURS, M. J. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacol Ther**, v. 112, n. 2, p. 358-404, Nov 2006. ISSN 0163-7258 (Print) 0163-7258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16784779> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976. ISSN 0003-2697 (Print) 0003-2697 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.

BRAUN, N. et al. Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. **Biochem J**, v. 351 Pt 3, p. 639-47, Nov 1 2000. ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11042118> >.

BRENEMAN, C. W., K. Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials. The need for high sampling density in formamide conformational analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 12, 1990.

BRONDYK, W. H. Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. **Methods Enzymol**, v. 463, p. 131-47, 2009. ISSN 1557-7988 (Electronic) 0076-6879 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19892171> >.

BUKAU, B.; HORWICH, A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. **Cell**, v. 92, n. 3, p. 351-66, Feb 6 1998. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9476895> >.

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. A 120-kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca(2+)-signaling factor for mammalian cells. **J Biol Chem**, v. 270, n. 10, p. 5172-80, Mar 10 1995a. ISSN 0021-9258 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7890627 >.

_____. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Annu Rev Microbiol**, v. 49, p. 175-200, 1995b. ISSN 0066-4227 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8561458 >.

_____. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Curr Opin Microbiol**, v. 1, n. 4, p. 461-5, Aug 1998. ISSN 1369-5274 (Print) 1369-5274 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10066513> >.

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. **Pharmacol Rev**, v. 24, n. 3, p. 509-81, Sep 1972. ISSN 0031-6997 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4404211 >.

_____. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. **Pharmacol Rev**, v. 58, n. 1, p. 58-86, Mar 2006. ISSN 0031-6997 (Print) 0031-6997 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16507883 >.

BURNSTOCK, G.; BOEYNAEMS, J. M. Purinergic signalling and immune cells. **Purinergic Signal**, Oct 29 2014. ISSN 1573-9546 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25352330> >.

CHAGAS, C. Nova Tripanozomíaze humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz [online]**. v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909. ISSN 0074-0276.

CHATELAIN, E. Chagas Disease Drug Discovery: Toward a New Era. **J Biomol Screen**, Sep 22 2014. ISSN 1552-454X (Electronic) 1087-0571 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25245987> >.

CHEN, J. et al. Cooperative effects of urea and L-arginine on protein refolding. **Protein Expr Purif**, v. 66, n. 1, p. 82-90, Jul 2009. ISSN 1096-0279 (Electronic) 1046-5928 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19233287> >.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 3, p. 286-96, Jun 2012. ISSN 1678-9849 (Electronic) 0037-8682 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22760123> >.

DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA, E. et al. Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. **Microbes Infect**, v. 10, n. 8, p. 850-7, Jul 2008. ISSN 1286-4579 (Print) 1286-4579 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18656412> >.

DE SOUZA, M. C. et al. The influence of ecto-nucleotidases on *Leishmania amazonensis* infection and immune response in C57B/6 mice. **Acta Trop**, v. 115, n. 3, p. 262-9, Sep 2010. ISSN 1873-6254 (Electronic) 0001-706X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399737> >.

DE SOUZA, R. F. et al. Recombinant *Leishmania (Leishmania) infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase NTPDase-2 as a new antigen in canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Acta Trop**, v. 125, n. 1, p. 60-6, Jan 2013. ISSN 1873-6254 (Electronic) 0001-706X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23022017> >.

DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int Rev Cytol**, v. 86, p. 197-283, 1984. ISSN 0074-7696 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6368447 >.

_____. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr Pharm Des**, v. 8, n. 4, p. 269-85, 2002. ISSN 1381-6128 (Print)
1381-6128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860366> >.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **Int J Cell Biol**, v. 2010, 2010. ISSN 1687-8884 (Electronic)
1687-8876 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20811486> >.

DETONI, M. L. et al. An antigenic domain of the *Leishmania amazonensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is associated with disease progression in susceptible infected mice. **Parasitol Res**, v. 112, n. 8, p. 2773-82, Aug 2013. ISSN 1432-1955 (Electronic)
0932-0113 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23681191> >.

DIAS, J. C.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 603-12, Jul 2002. ISSN 0074-0276 (Print)
0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12219120> >.

DIAZ, G.; DIAZ, M. A. N.; REIS, M. A. Enantioselective synthesis of both (-)-(R)- and (+)-(S)-angustureine controlled by enzymatic resolution. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 9, p. 7, 2013. ISSN 0103-5053. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-50532013000900014&script=sci_arttext >.

DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. **Chem Biol Interact**, v. 73, n. 1, p. 1-27, 1990. ISSN 0009-2797 (Print)
0009-2797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2406032> >.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. The role of Ca²⁺ in the process of cell invasion by intracellular parasites. **Parasitol Today**, v. 12, n. 2, p. 61-5, Feb 1996. ISSN 0169-4758 (Print).
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15275256 >.

DOMBROWSKI, K. E. et al. Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function. **Immunol Rev**, v. 161, p. 111-8, Feb 1998. ISSN 0105-2896 (Print)
0105-2896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9553768> >.

DOSREIS, G. A. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 2, p. 84-90, Feb 2011. ISSN 1414-431X (Electronic)
0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21243314> >.

EKMAN, P.; JAGER, O. Quantification of subnanomolar amounts of phosphate bound to seryl and threonyl residues in phosphoproteins using alkaline hydrolysis and malachite green. **Anal Biochem**, v. 214, n. 1, p. 138-41, Oct 1993. ISSN 0003-2697 (Print)
0003-2697 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8250216> >.

FIETTO, J. L. et al. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 316, n. 2, p. 454-60, Apr 2 2004. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15020239> >.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 81, n. 5, p. 755-9, 1987. ISSN 0035-9203 (Print)

0035-9203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3130683> >.

FIOCRUZ. A pesquisa de novas drogas para o tratamento da doença de Chagas. 2013. Disponível em: < <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=124> >. Acesso em: 01 de agosto.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Trop**, v. 115, n. 1-2, p. 22-7, Jul-Aug 2010. ISSN 1873-6254 (Electronic)

0001-706X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19646412> >.

GRAVINA, H. D. et al. In vitro assessment of the antiviral potential of trans-cinnamic acid, quercetin and morin against equid herpesvirus 1. **Res Vet Sci**, v. 91, n. 3, p. e158-62, Dec 2011. ISSN 1532-2661 (Electronic)

0034-5288 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21159355> >.

GUIDO, R. V.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Modern drug discovery technologies: opportunities and challenges in lead discovery. **Comb Chem High Throughput Screen**, v. 14, n. 10, p. 830-9, Dec 2011. ISSN 1875-5402 (Electronic)

1386-2073 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21843147> >.

GURUPRASAD, K.; REDDY, B. V.; PANDIT, M. W. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. **Protein Eng**, v. 4, n. 2, p. 155-61, Dec 1990. ISSN 0269-2139 (Print)

0269-2139 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2075190> >.

HANDA, M.; GUIDOTTI, G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). **Biochem Biophys Res Commun**, v. 218, n. 3, p. 916-23, Jan 26 1996. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8579614> >.

HOTEZ, P. J. et al. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 9, p. e300, 2008. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18820747> >.

IVANENKOV, V. V.; MURPHY-PIEDMONTE, D. M.; KIRLEY, T. L. Bacterial expression, characterization, and disulfide bond determination of soluble human NTPDase6 (CD39L2) nucleotidase: implications for structure and function. **Biochemistry**, v. 42, n. 40, p. 11726-35, Oct 14 2003. ISSN 0006-2960 (Print)

0006-2960 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14529283> >.

JACQUEMOND-COLLET, I. et al. Identification of the alkaloids of *Galipea officinalis* by gas chromatography-mass spectrometry. **Phytochem Anal**, v. 12, n. 5, p. 312-9, Sep-Oct 2001. ISSN 0958-0344 (Print)
0958-0344 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11705258> >.

KACZMAREK, E. et al. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. **J Biol Chem**, v. 271, n. 51, p. 33116-22, Dec 20 1996. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8955160 >.

KEGEL, B. et al. An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. **Neuropharmacology**, v. 36, n. 9, p. 1189-200, Sep 1997. ISSN 0028-3908 (Print)
0028-3908 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9364474 >.

KEMPF, B.; BREMER, E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. **Arch Microbiol**, v. 170, n. 5, p. 319-30, Oct 1998. ISSN 0302-8933 (Print)
0302-8933 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9818351> >.

LICHTY, J. J. et al. Reprint of: Comparison of affinity tags for protein purification. **Protein Expr Purif**, Sep 3 2011. ISSN 1096-0279 (Electronic)
1046-5928 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21893203> >.

LOGRADO, L. P. et al. Synthesis and cytotoxicity screening of substituted isobenzofuranones designed from anacardic acids. **Eur J Med Chem**, v. 45, n. 8, p. 3480-9, Aug 2010. ISSN 1768-3254 (Electronic)
0223-5234 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20537433> >.

MAIOLI, T. U. et al. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. **Parasitol Res**, v. 94, n. 3, p. 207-12, Oct 2004. ISSN 0932-0113 (Print)
0932-0113 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15378352> >.

MANQUE, P. A. et al. Identification and immunological characterization of three potential vaccinogens against *Cryptosporidium* species. **Clin Vaccine Immunol**, v. 18, n. 11, p. 1796-802, Nov 2011. ISSN 1556-679X (Electronic)
1556-679X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21918117> >.

MANQUE, P. A. et al. Identification and characterization of a novel calcium-activated apyrase from *Cryptosporidium* parasites and its potential role in pathogenesis. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31030, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22363541> >.

MARIOTINI-MOURA, C. et al. *Trypanosoma cruzi* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and

possible role in host cell adhesion. **Acta Trop**, v. 130C, p. 140-147, Nov 19 2014. ISSN 1873-6254 (Electronic) 0001-706X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24269744> >.

MARR, J. J.; DOCAMPO, R. Chemotherapy for Chagas' disease: a perspective of current therapy and considerations for future research. **Rev Infect Dis**, v. 8, n. 6, p. 884-903, Nov-Dec 1986. ISSN 0162-0886 (Print) 0162-0886 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3025994> >.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 2, p. e1508, 2012. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22348163> >.

MENG, F.; PARK, Y.; ZHOU, H. Role of proline, glycerol, and heparin as protein folding aids during refolding of rabbit muscle creatine kinase. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 33, n. 7, p. 701-9, Jul 2001. ISSN 1357-2725 (Print) 1357-2725 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390278> >.

MINISTÉRIODASAÚDE. Neglected diseases: the strategies of the Brazilian Ministry of Health. **Rev Saude Publica**, v. 44, n. 1, 2010.

MORENO, S. N. et al. Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. **J Exp Med**, v. 180, n. 4, p. 1535-40, Oct 1 1994. ISSN 0022-1007 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7931085 >.

MOURA, C. M. **Expressão heteróloga, purificação e busca de inibidores da NTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi***. 2010. 53 Dissertação (Mestrado). Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, <http://www.tede.ufv.br/tesesimplificado/>.

NAKAAR, V. et al. Targeted reduction of nucleoside triphosphate hydrolase by antisense RNA inhibits *Toxoplasma gondii* proliferation. **J Biol Chem**, v. 274, n. 8, p. 5083-7, Feb 19 1999. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9988756> >.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur J Biochem**, v. 267, n. 17, p. 5421-6, Sep 2000. ISSN 0014-2956 (Print) 0014-2956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10951200> >.

OGANESYAN, N. et al. Effect of osmotic stress and heat shock in recombinant protein overexpression and crystallization. **Protein Expr Purif**, v. 52, n. 2, p. 280-5, Apr 2007. ISSN 1046-5928 (Print) 1046-5928 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17126029> >.

PINSKY, D. J. et al. Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. **J Clin Invest**, v. 109, n. 8, p. 1031-40, Apr 2002. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11956240> >.

POLAK, A.; RICHLE, R. Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative benznidazole. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 72, n. 1, p. 45-54, Feb 1978. ISSN 0003-4983 (Print) 0003-4983 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/418744> >.

PORCINO, G. N. et al. Leishmania (Viannia) braziliensis nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1): localization and in vitro inhibition of promastigotes growth by polyclonal antibodies. **Exp Parasitol**, v. 132, n. 2, p. 293-9, Oct 2012. ISSN 1090-2449 (Electronic) 0014-4894 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22921497> >.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect Dis**, v. 1, n. 2, p. 92-100, Sep 2001. ISSN 1473-3099 (Print) 1473-3099 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11871482> >.

RAHMAN, M. A.; IMRAN, T. B.; ISLAM, S. Antioxidative, antimicrobial and cytotoxic effects of the phenolics of *Leea indica* leaf extract. **Saudi J Biol Sci**, v. 20, n. 3, p. 213-25, Jul 2013. ISSN 1319-562X (Print) 1319-562X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23961238> >.

RAHMAN, M. M.; GRAY, A. I. A benzoisofuranone derivative and carbazole alkaloids from *Murraya koenigii* and their antimicrobial activity. **Phytochemistry**, v. 66, n. 13, p. 1601-6, Jul 2005. ISSN 0031-9422 (Print) 0031-9422 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15955541> >.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol Rev**, v. 50, n. 3, p. 413-92, Sep 1998. ISSN 0031-6997 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9755289 >.

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-402, Apr 17 2010. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399979> >.

RIZZO, A. et al. Antimicrobial Effect of Natural Polyphenols With or Without Antibiotics on *Chlamydia pneumoniae* Infection In Vitro. **Microb Drug Resist**, Aug 16 2013. ISSN 1931-8448 (Electronic) 1076-6294 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23952319> >.

RODRIGUES COURA, J.; DE CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, Jan 2002. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11992141> >.

ROLON, M. et al. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitol Res**, v. 99, n. 2, p. 103-7, Jul 2006. ISSN 0932-0113 (Print) 0932-0113 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16506080> >.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nat Protoc**, v. 5, n. 4, p. 725-38, Apr 2010. ISSN 1750-2799 (Electronic)
1750-2799 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20360767> >.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning. A Laboratory Manual**. Third. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. ISBN 0-87969-576-5.

SANCHEZ, R. et al. Characterization of gdp1+ as encoding a GDPase in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. **FEMS Microbiol Lett**, v. 228, n. 1, p. 33-8, Nov 7 2003. ISSN 0378-1097 (Print)
0378-1097 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14612233> >.

SANSOM, F. M. et al. A bacterial ecto-triphosphate diphosphohydrolase similar to human CD39 is essential for intracellular multiplication of Legionella pneumophila. **Cell Microbiol**, v. 9, n. 8, p. 1922-35, Aug 2007. ISSN 1462-5814 (Print)
1462-5814 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17388784> >.

SANSOM, F. M. et al. Enzymatic properties of an ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase from Legionella pneumophila: substrate specificity and requirement for virulence. **J Biol Chem**, v. 283, n. 19, p. 12909-18, May 9 2008. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18337253> >.

SANSOM, F. M.; ROBSON, S. C.; HARTLAND, E. L. Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 72, n. 4, p. 765-81, Table of Contents, Dec 2008. ISSN 1098-5557 (Electronic)
1092-2172 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19052327> >.

SANTOS, R. F. et al. Influence of Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on Trypanosoma cruzi infectivity and virulence. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 3, p. e387, 2009. ISSN 1935-2735 (Electronic)
1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19255624> >.

SCHICKER, K. et al. A membrane network of receptors and enzymes for adenine nucleotides and nucleosides. **Biochim Biophys Acta**, v. 1793, n. 2, p. 325-34, Feb 2009. ISSN 0006-3002 (Print)
0006-3002 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18973777 >.

SCHMUNIS, G. A.; CRUZ, J. R. Safety of the blood supply in Latin America. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 1, p. 12-29, Jan 2005. ISSN 0893-8512 (Print)
0893-8512 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15653816> >.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Trop**, v. 115, n. 1-2, p. 14-21, Jul-Aug 2010. ISSN 1873-6254 (Electronic)
0001-706X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19932071> >.

SCHULTE AM ESCH, J., 2ND et al. Structural elements and limited proteolysis of CD39 influence ATP diphosphohydrolase activity. **Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 2248-58, Feb 23 1999. ISSN 0006-2960 (Print)
0006-2960 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10029517> >.

SCHUTTELKOPF, A. W.; VAN AALTEN, D. M. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 60, n. Pt 8, p. 1355-63, Aug 2004. ISSN 0907-4449 (Print)
0907-4449 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15272157> >.

SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de Trypanosoma cruzi virulentapara o camundongo branco. **Folia Clin. Biol.**, v. 20, p. 17, 1953.

STEVERDING, D. The history of Chagas disease. **Parasit Vectors**, v. 7, p. 317, 2014. ISSN 1756-3305 (Electronic)
1756-3305 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25011546> >.

STROBEL, G. et al. Isopestacin, an isobenzofuranone from Pestalotiopsis microspora, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**, v. 60, n. 2, p. 179-83, May 2002. ISSN 0031-9422 (Print)
0031-9422 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12009322> >.

TAFURI, W. L. [Pathogenesis of Chagas' disease]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 29, n. 4, p. 194-9, Jul-Aug 1987. ISSN 0036-4665 (Print)
0036-4665 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3130653 >.

TAN, F. et al. Induction of protective Th1 immune responses in mice by vaccination with recombinant Toxoplasma gondii nucleoside triphosphate hydrolase-II. **Vaccine**, v. 29, n. 15, p. 2742-8, Mar 24 2011. ISSN 1873-2518 (Electronic)
0264-410X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21315696> >.

TARDIEUX, I.; NATHANSON, M. H.; ANDREWS, N. W. Role in host cell invasion of Trypanosoma cruzi-induced cytosolic-free Ca²⁺ transients. **J Exp Med**, v. 179, n. 3, p. 1017-22, Mar 1 1994. ISSN 0022-1007 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8113670 >.

TAUSSKY, H. H.; SHORR, E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. **J Biol Chem**, v. 202, n. 2, p. 675-85, Jun 1953. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13061491> >.

TEIXEIRA, R. R. et al. Synthesis and antiproliferative activity of C-3 functionalized isobenzofuran-1(3H)-ones. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 1881-96, 2013. ISSN 1420-3049 (Electronic)
1420-3049 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23377131> >.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **J Comput Chem**, v. 31, n. 2, p. 455-61, Jan 30 2010. ISSN 1096-987X (Electronic) 0192-8651 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19499576> >.

TSUMOTO, K. et al. Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. **Biotechnol Prog**, v. 20, n. 5, p. 1301-8, Sep-Oct 2004. ISSN 8756-7938 (Print) 1520-6033 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15458311> >.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). **World Health Organ Fact Sheet 2014x**, v. 340, 2014. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> >.

WHO/TRS. Control of Chagas Disease. **Report of a WHO Expert Committee**, 2009.

YEGUTKIN, G. G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 49, n. 6, p. 473-97, Nov-Dec 2014. ISSN 1549-7798 (Electronic) 1040-9238 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25418535> >.

ZEBISCH, M.; STRATER, N. Characterization of Rat NTPDase1, -2, and -3 ectodomains refolded from bacterial inclusion bodies. **Biochemistry**, v. 46, n. 42, p. 11945-56, Oct 23 2007. ISSN 0006-2960 (Print) 0006-2960 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17910474> >.

_____. Structural insight into signal conversion and inactivation by NTPDase2 in purinergic signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 19, p. 6882-7, May 13 2008. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18458329> >.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 362, n. 4-5, p. 299-309, Nov 2000. ISSN 0028-1298 (Print) 0028-1298 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11111825> >.

_____. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, n. 1-2, p. 44-56, Jan-Feb 2001. ISSN 0272-4391. Disponível em: < <Go to ISI>://000168532400006 >.

ANEXO I

Parâmetros da NTPDase-1 selvagem de *T. cruzi* (TcNTPDase-1)

ProtParam

User-provided sequence:

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MKQSMARSRR	LKRPCISLTF	ALLCLFLVTV	VYITAYTVGK	FSMDARGREK	LDLTDRIIHS
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
MTKRFQECQA	QKQLLKNGHT	TARMALEIAQ	ETKKKLEMEL	GLMRNRNTLM	LQSVEECKKE
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
LELLKENGRG	AVTLALQLDR	LTKERQFYMD	AIAVVNGSSD	VGRRQTADVF	AAIAKEFDEW
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
EDAAQNKTEL	LTNCNNAMRR	YSIVFDAGST	GSRVHVFRYN	LTSTPHAGNF	SWNGTRPSLT
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
SFLRLDDELFF	VENYEPLSGL	ANPNDAVASL	SPLIEAAKAY	IPESLHACVP	IEMKATAGLR
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
RIGREHAEAV	LDVVRRLFAR	GPFWMQSELD	SVRILEGWEE	GPLAWLTVNY	LLGALNGDKN
<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>
TATILDGEGG	STQIVMHPSD	PKAIEAYAEF	SYALKVNGRS	FVYQHSYEG	NGLHAAKEQL
<u>430</u>	<u>440</u>	<u>450</u>	<u>460</u>	<u>470</u>	<u>480</u>
LQAVAAANTG	ANSKVQEANK	IATGTEATPG	ASADVAVDFAF	PCFPKGYVHT	ETGISNTRDG
<u>490</u>	<u>500</u>	<u>510</u>	<u>520</u>	<u>530</u>	<u>540</u>
GKVPSMEECS	ALFRRHVVRK	HQPCVSNSCG	FNGVFQPDIS	AVPMVPVYAF	SFYYDRLKPY

550 560 570 580 590 600
 IKDEVIRVQD VLDIASQVCR SMKSVRELLE QNDTKKNKGS LKPEMECFEL SYLFTLLRYG

 610 620 630 630
 FGFPEQKLH IAKKINGFET AWALGASLVS LEGQSA

Number of amino acids: 636

Molecular weight: 70778.9

Theoretical pI: 8.13

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 73

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 76

Atomic composition:

Carbon	C	3133
Hydrogen	H	4966
Nitrogen	N	876
Oxygen	O	934
Sulfur	S	29

Formula: C₃₁₃₃H₄₉₆₆N₈₇₆O₉₃₄S₂₉

Total number of atoms: 9938

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of M⁻¹ cm⁻¹, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 62060

Abs 0.1% (=1 g/l) 0.877, assuming ALL Cys residues appear as half cystines

Ext. coefficient 61310

Abs 0.1% (=1 g/l) 0.866, assuming NO Cys residues appear as half cystines

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).

>20 hours (yeast, in vivo).

>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 41.48

This classifies the protein as unstable.

Aliphatic index: 84.39

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.248

ANEXO II

Parâmetros da NTPDase-1 solúvel + AAs do pET 21b

ProtParam

User-provided sequence:

10	20	30	40	50	60
MTVGKFSMDA	RGREKLDLTD	RIHSMTKRF	QECQAQKQLL	KNGHTTARMA	LEIAQETKKK
70	80	90	100	110	120
LEMELGLMRN	RNTLMLQSVE	ECKKELELLK	ENGRGAVTLA	LQLDRLTKER	QFYMDAIAVV
130	140	150	160	170	180
NGSSDVGRRQ	TADVFAAIAK	EFDEWEDAAQ	NKTELLTNCN	NAMRRYSIVF	DAGSTGSRVH
190	200	210	220	230	240
VFRYNTSTP	HAGNFSWNG	T RPSLTSFLRL	DDELFEVENE	PLSGLANPND	AVASLSPLIE
250	260	270	280	290	300
AAKAYIPESL	HACVPIEMKA	TAGLRRIGRE	HAEAVLDVVR	RLFARGPFWM	QSELDsvRIL
310	320	330	340	350	360
EGWEEGPLAW	LTVNYLLGAL	NGDKNTATIL	DLGGGSTQIV	MHPSPDKAIE	AYAefSYALK
370	380	390	400	410	420
VNGRSFVYQ	HSYEGNGLHA	AKEQLLQAVA	ANNTGANSKV	QEANKIATGT	EATPGASADV
430	440	450	460	470	480
AVDAFPCFPK	GYVHTETGIS	NTRDGGKVPS	MEECSALFRR	HVVRKHQPCV	SNSCGFNGVF
490	500	510	520	530	540
QPDISAVPMV	PVYAFSfYD	RLKPYIKDEV	IRVQDVLdia	SQVCRSMKSV	RELLEQNDTK

550 560 570 580 590 600
KNKGSLKPEM ECFELSYLFT LLRYGFGFPP EQKLHIAKKI NGFETAWALG ASLVSLEGQS

610
ASSVDKLA LEHHHHHH

Number of amino acids: 618

Molecular weight: 68642.0

Theoretical pI: 6.57

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 75

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 71

Atomic composition:

Carbon C 3030

Hydrogen H 4780

Nitrogen N 856

Oxygen O 913

Sulfur S 26

Formula: $C_{3030}H_{4780}N_{856}O_{913}S_{26}$

Total number of atoms: 9605

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of $M^{-1} cm^{-1}$, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 58955

Abs 0.1% (=1 g/l) 0.859, assuming all pairs of Cys residues form cystines

Ext. coefficient 58330

Abs 0.1% (=1 g/l) 0.850, assuming all Cys residues are reduced

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).

>20 hours (yeast, in vivo).

>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 38.08

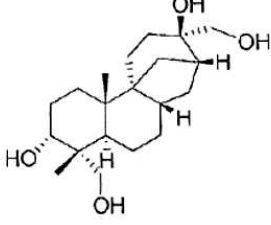
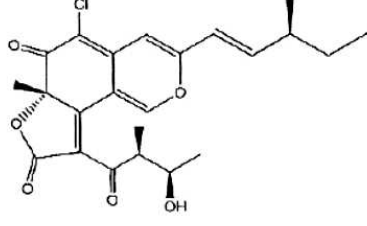
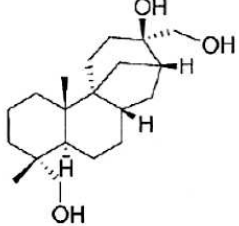
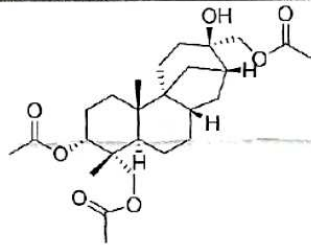
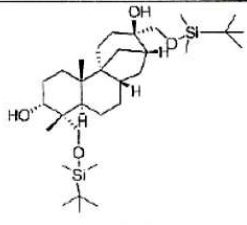
This classifies the protein as stable.

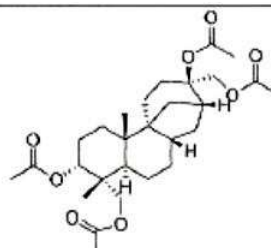
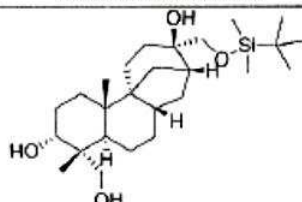
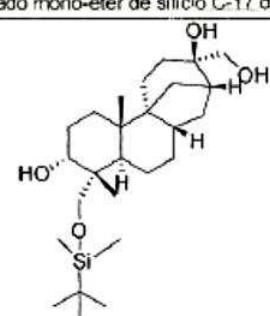
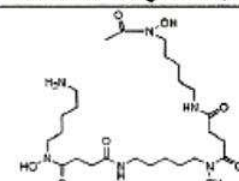
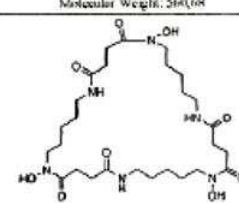
Aliphatic index: 82.12

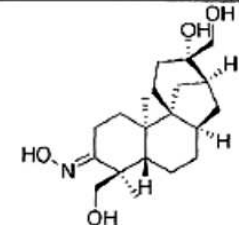
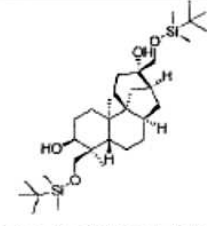
Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.318

ANEXO III

Compostos fornecidos pelo Prof. Paulo César Vieira

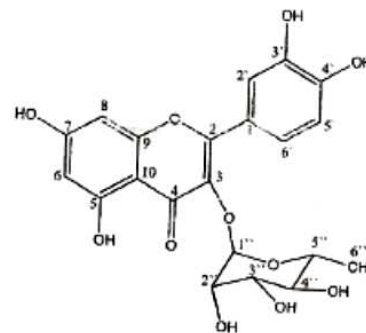
NOME/CÓDIGO AMOSTRA	MASSA	ESTRUTURA
Afi	10,8 mg	 <p>Afidicolina Molecular Weight: 338,48</p>
Chaeto A	10,9 mg	 <p>Chaetoviridina A Molecular Weight: 432,89</p>
SUBST.4	1 mg	 <p>Molecular Weight: 322,48 3-desóxi-afidicolina</p>
SUBST.7	2,9 mg	 <p>Molecular Weight: 464,59 afidicolina tri-acetilada</p>
SUBST.5	5 mg	 <p>Molecular Weight: 567,00 derivado éter de sílicio di-protetido da afidicolina</p>

SUBST.6	2 mg	 <p>Molecular Weight: 506,63 aflatoxina tetra- acetilada</p>
SUBST.2	1 mg	 <p>Molecular Weight: 452,74 derivado mono-éter de silício C-17 da aflatoxina</p>
SUBST.3	1 mg	 <p>derivado mono-éter de silício C-18 da aflatoxina Molecular Weight: 452,74</p>
desferrioxamina B (dex B)	1,2 mg	 <p>Molecular Weight: 560,68</p>
desferrioxamina E (dex E)	5,2 mg	 <p>Molecular Weight: 600,71</p>
SA_A7_Bu	8 mg	Extrato Actinobactéria RLe 7
SA_A7_AcO	9 mg	Extrato Actinobactéria RLe 7
SA_F25_Bu	8 mg	Extrato Fungo FLe 8.1
SA_F25_AcO	4 mg	Extrato Fungo FLe 8.1
22 AC 84	10,6 mg	Extrato Acetato 84 dias
22 HEX 84	9,2 mg	Extrato Hexano 84 dias
22 HEX 63	10,2 mg	Extrato Hexano 63 dias
22 HEX 21	11,0 mg	Extrato Hexano 21 dias
22 AC 21	12,0 mg	Extrato Acetato 21 dias
22 HEX 42	19,7 mg	Extrato Hexano 42 dias

GB4	1 mg	 <p>Molecular Weight: 351,48</p>
GB1	2mg	 <p>Molecular Weight: 567,00</p>

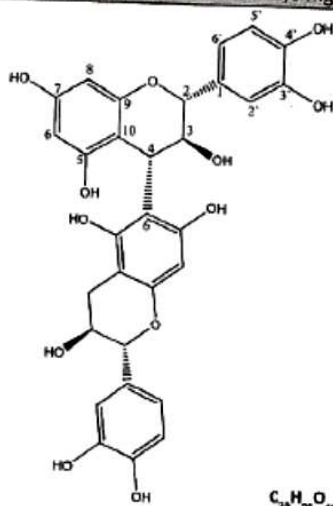
ALVO MOLECULAR:

Código	Massa (mg)
COMPOSTO I	1,0 mg
COMPOSTO II	1,0 mg
COMPOSTO III	0,5 mg
COMPOSTO IV	1,4 mg
BCFEA (extrato acetato)	15,2 mg
BCFE(extrato bruto)	15,0 mg
AA	5,0 mg
AArH	5,0 mg



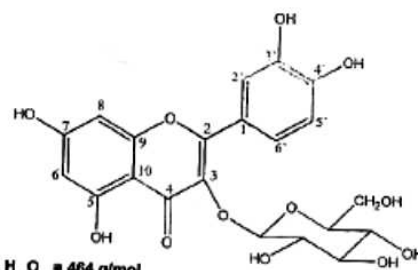
$C_{21}H_{28}O_{11} = 448 \text{ g/mol}$

COMPOSTO II - quercetina-3-O-L-ramnosideo



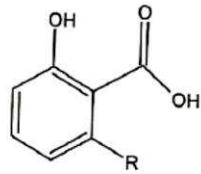
$C_{28}H_{28}O_{12} = 578 \text{ g/mol}$

COMPOSTO I - procianidina (dímero de catequinas)

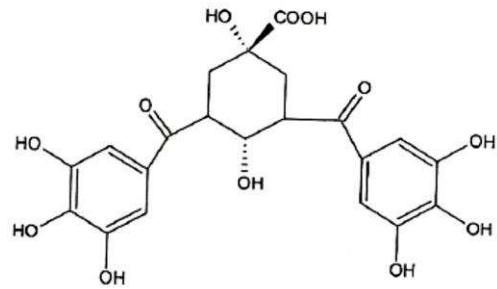


$C_{27}H_{28}O_{12} = 464 \text{ g/mol}$

COMPOSTO III - quercetina-3-O-L-glicopiranosídeo



AA= R 17:3 M= 369,2 g/mol ✗
 AArH= R 17:0 M=375,2 g/mol ✗

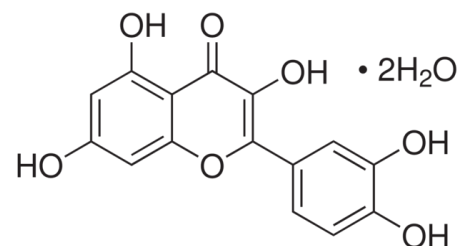


COMPOSTO IV - 3,5-di-O-galloylquinic acid

$C_{21}H_{26}O_{12}$ M= 464,38 g/mol

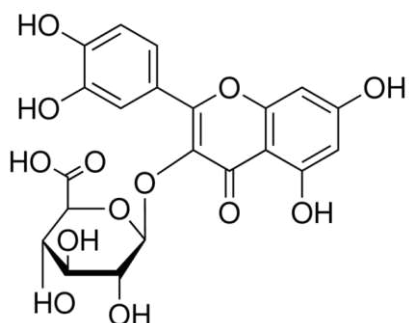
Código	Massa (mg)	Massa Molar	Estrutura
Substância CIII5 Foi avaliada e apresentou iribição frente ao protozoário	5,03 mg	464,33 g/mol	
Substância (-)Ep	4,15 mg	290,27 g/mol	
Substância Chy	21,0 mg	290,27 g/mol	
Substância CII5agI	10,04 mg	302,24 g/mol	

Quercetina dihidratada – 338.27 g/mol

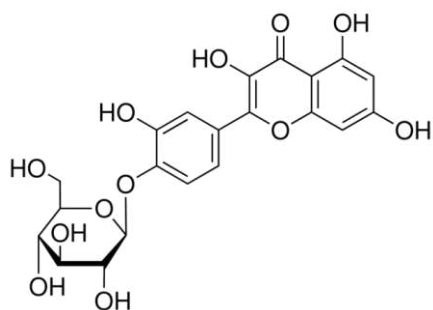


ANEXO IV

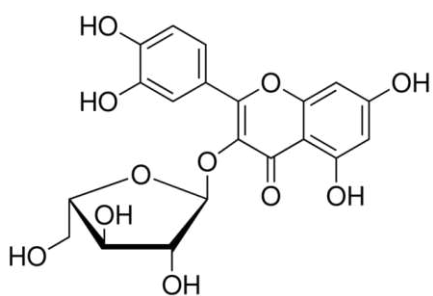
Compostos comerciais derivados de quercetina



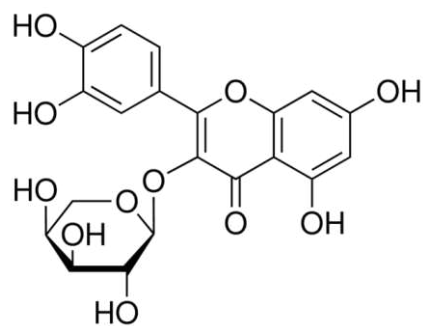
Quercetina 3-glucuronideo
(Miquelianina)



Spiraeosideo



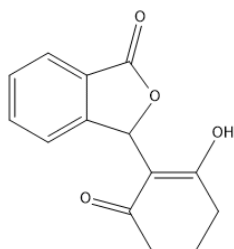
Avicularina



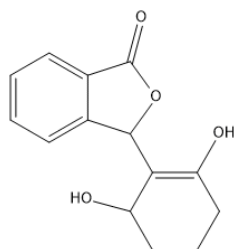
Quercetina 3-O- α -L-
arabinopiranosideo

ANEXO V

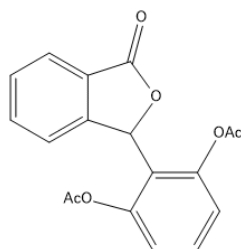
Isobenzofuranonas (WLPs)



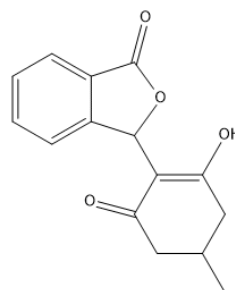
WLP1
(M=244.07)



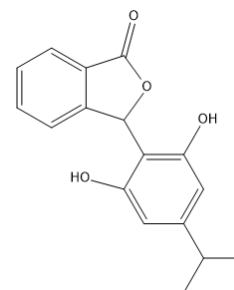
WLP2
(M=242.06)



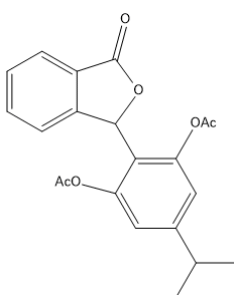
WLP3
(M=326.08)



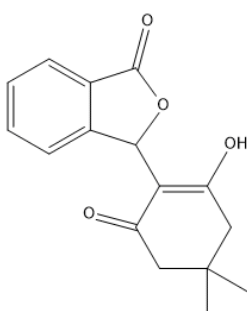
WLP4
(M=258.09)



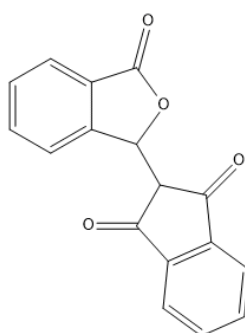
WLP8
(M=264.10)



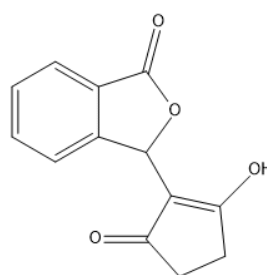
WLP9
(M=366.13)



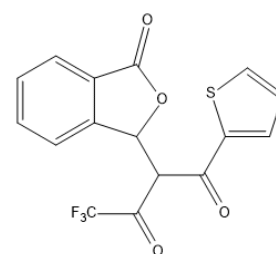
WLP10
(M=272.10)



WLP11
(M=278.06)



WLP12
(230.06)

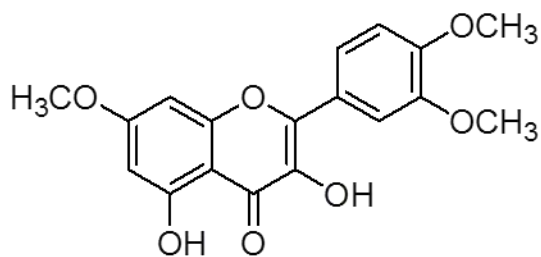


WLP13
(M=364.02)

ANEXO VI

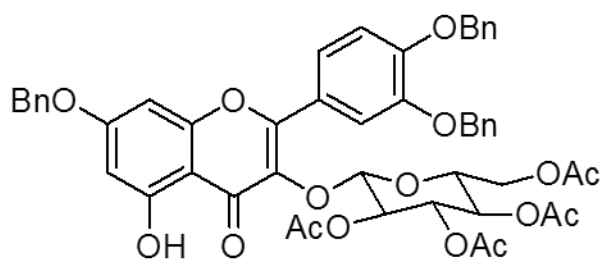
Intermediários de síntese do CIII-L

KS25



$C_{18}H_{16}O_7$
MM = 344,32 g/mol

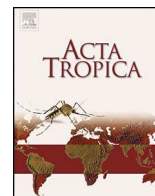
KS39



Fórmula: $C_{50}H_{46}O_{16}$
MM: 902,89 g/mol

Capítulo II

***Trypanosoma cruzi* NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE
DIPHOSPHOHYDROLASE 1 (TcNTPDase-1) BIOCHEMICAL
CHARACTERIZATION, IMMUNOLocalIZATION AND POSSIBLE
ROLE IN CELL ADHESION**



Trypanosoma cruzi nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion[☆]



Christiane Mariotini-Moura^{a,b}, Matheus Silva e Bastos^{a,b}, Felipe Freitas de Castro^{a,1}, Mellina Lanna Trindade^a, Raphael de Souza Vasconcellos^{a,b}, Myrian Augusta Araújo Neves-do-Valle^{a,b}, Bernardo Pereira Moreira^{a,1}, Ramon de Freitas Santos^{a,b,1}, Claudia Miranda de Oliveira^{a,b}, Luana Celina Seraphim Cunha^{a,3}, Xênia Macedo Souto^{a,2}, Gustavo Costa Bressan^a, Abelardo Silva-Júnior^g, Munira Muhammad Abdel Baqui^c, Maria Terezinha Bahia^d, Márcia Rogéria de Almeida^a, José Roberto Meyer-Fernandes^{e,f}, Juliana Lopes Rangel Fietto^{a,b,*}

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, CEP 36570-000 MG, Brazil

^b Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças Infecciosas – INBEQMeDI, Brazil

^c Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade De Medicina de Ribeirao Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, CEP 14090-900 SP, Brazil

^d Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas – NUPEB, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, CEP 35400-000 MG, Brazil

^e Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, CEP 21941-590 RJ, Brazil

^f Instituto Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem, IMBEB, Brazil

^g Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, CEP 36570-000 MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 January 2013

Received in revised form 5 November 2013

Accepted 11 November 2013

Available online 19 November 2013

Keywords:

Recombinant protein
Trypanosoma cruzi
Nucleoside triphosphate
diphosphohydrolase
Immunolocalization
Adhesion

ABSTRACT

Previous work has suggested that *Trypanosoma cruzi* diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) may be involved in the infection of mammalian cells and serve as a potential target for rational drug design. In this work, we produced recombinant TcNTPDase-1 and evaluated its nucleotidase activity, cellular localization and role in parasite adhesion to mammalian host cells. TcNTPDase-1 was able to utilize a broad range of triphosphate and diphosphate nucleosides. The enzyme's K_m for ATP (0.096 mM) suggested a capability to influence the host's ATP-dependent purinergic signaling. The use of specific polyclonal antibodies allowed us to confirm the presence of TcNTPDase-1 at the surface of parasites by confocal and electron microscopy. In addition, electron microscopy revealed that TcNTPDase-1 was also found in the flagellum, flagellum insertion region, kinetoplast, nucleus and intracellular vesicles. The presence of this enzyme in the flagellum insertion region and vesicles suggests that it may have a role in nutrient acquisition, and the widespread distribution of TcNTPDase-1 within the parasite suggests that it may be involved in other biological process. Adhesion assays using anti-TcNTPDase-1 polyclonal antibodies as a blocker or purified recombinant TcNTPDase-1 as a competitor revealed that the enzyme has a role in parasite–host cell adhesion. These data open new frontiers to future studies on this specific parasite–host interaction and other unknown functions of TcNTPDase-1 related to its ubiquitous localization.

© 2013 The Authors. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: NTPDas, nucleoside triphosphate diphosphohydrolase; TcNTPDase-1, *T. cruzi* NTPDase-1; NDP, nucleoside diphosphate; NTP, nucleoside triphosphate.

[☆] This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs, s/n, Viçosa, CEP-36570-000 MG, Brazil. Tel.: +55 031 31 38993042; fax: +55 031 31 38992374.

E-mail addresses: jufietto@ufv.br, jufietto@gmail.com (J.L.R. Fietto).

¹ Present address: Faculdade De Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, CEP 14090-900 SP, Brazil.

² Present address: Instituto Oswaldo Cruz-IOC-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, CEP 21040-360 RJ, Brazil.

³ Present address: Faculdade de Sergipe, FaSe – Faculdade de Sergipe, Aracaju, CEP 49020-490 SE, Brazil.

1. Introduction

Trypanosoma cruzi is a flagellate protozoan known to be the etiological agent of Chagas disease (Chagas, 1909). The World Health Organization estimates that 8 million people are infected with *T. cruzi* worldwide, predominantly in Latin America (WHO, 2010). The disease is expanding to non-Latin American countries and remains a serious health problem because it is difficult to diagnose and to treat the chronic form of the disease, and there is no vaccine.

Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolases (NTP-Dases) are enzymes that hydrolyze ATP and other tri- and diphosphate nucleosides (Plesner, 1995; Zimmermann, 1999). Extracellular nucleotides act as signaling molecules in the immune response of mammalian hosts, and they may be hydrolyzed by parasite ectonucleotidases. This hydrolysis could interfere with several events, such as ADP-dependent platelet aggregation and the ATP-dependent inflammatory response (Bours et al., 2006; de Almeida Marques-da-Silva et al., 2008; de Souza et al., 2010; Maioli et al., 2004; Sansom et al., 2008).

T. cruzi has ectonucleotidase activity on its surface, and an NTPDase gene was identified and cloned (TcNTPDase-1); subsequently, the recombinant protein was expressed in a bacterial system (Fietto et al., 2004; Santos et al., 2009). In these previous studies, we demonstrated a positive correlation between extracellular ATP hydrolysis and the infectivity and virulence of *T. cruzi*, and we suggested that TcNTPDase-1 would be a good target for rational drug design for Chagas disease chemotherapy, mainly because anti-TcNTPDase-1 antibodies decreased the infection (Santos et al., 2009). Other authors believe that high ecto-ATPase activity in pathogens is an adaptive parasitic behavior, and it has made these organisms more virulent because it could interfere with extracellular purinergic signals (Bisaggio et al., 2003; Sansom et al., 2007; Silverman et al., 1998). Based on the typical function of this family of proteins, it has been proposed that these enzymes can modulate biological responses induced by extracellular nucleotides and metabolites (Sansom et al., 2008). Furthermore, trypanosomatids are unable to synthesize purine rings *de novo* (Cohn and Gottlieb, 1997), depending instead on the salvage pathway (Borst and Fairlamb, 1998), in which NTPDases are suggested to have a role in extracellular purine acquisition (Berredo-Pinho et al., 2001).

Previously, we demonstrated that polyclonal antiserum against TcNTPDase-1 significantly decreased rates of *T. cruzi* *in vitro* infection. It did not, however, inhibit the enzymatic activity (nucleotidase activity) of the recombinant TcNTPDase-1 protein, suggesting a possible non-activity-dependent role for this enzyme in *in vitro* infection (Santos et al., 2009), possibly at an initial infection step, such as adhesion. In the present work, to better understand the role of TcNTPDase-1 in *T. cruzi* infection and in parasite biology, we expressed, purified and characterized the recombinant enzyme by its substrate preference and used it to investigate its immunolocalization and role in host cell-adhesion.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial heterologous expression and TcNTPDase-1 purification

The recombinant form of *T. cruzi* NTPDase-1 (Accession no. AY540630) was expressed in a bacterial heterologous system as described previously (Santos et al., 2009). The purification and protein refolding were performed following previously described protocols (Areas et al., 2002) with few modifications. The lysis buffer contained 50 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl and a protease inhibitor cocktail (aprotinin [1 µg/mL], pepstatin [1 µg/mL] and leupeptin [1 µg/mL]). Lysozyme (1 mg/mL) was added to facilitate

cell lysis, which was conducted using sonication (6 pulses of 10 s with 10 s intervals between each pulse of 20 Hz amplitude). The centrifugation steps were performed at 12,500 × g, and the pellet was solubilized and suspended in buffer (50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl) and stored at 4 °C for 24 h before use. A second purification step was performed using nickel affinity chromatography Ni-NTA-agarose (GE-Healthcare®). The equilibrium/wash buffer contained 50 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 to 20 mM imidazole, 8 M urea and 10 mM β-mercaptoethanol. The elution buffer contained 250 mM imidazole and decreasing concentrations of urea, with fixed concentrations for the other constituents.

2.2. TcNTPDase-1 activity

The enzymatic activity was measured using the malachite green method (Ekman and Jager, 1993) with modifications. The assays were conducted in a total reaction volume of 80 µL, including the activity buffer (50 mM Tris, pH 8.0; 50 mM HEPES, pH 8; 2.5 mM MgCl₂; 116 mM NaCl; 5.4 mM KCl; and 2.5 mM nucleotide) and 0.5 µg of purified TcNTPDase-1 for 30 min at 37 °C. TcNTPDase-1 presents linear hydrolysis until 1 h (data not shown). After the addition of the colorimetric reagent, the reactions were read at 650 nm. To determine the K_m and V_{MAX} values, 0.5 µg of purified TcNTPDase-1 were incubated in the same reaction medium described above in the presence of varying concentrations of ATP. The ATPase activity was measured at different periods of time, and the ATP hydrolysis did not exceed 10%. In these experiments, the ATPase activity was determined by measuring the hydrolysis of [γ -³²P] ATP (specific activity of approximately 10⁴ Bq/nmol ATP) (Lemos et al., 2000). To evaluate the stability of the refolded protein, each of three samples was divided into three different aliquots. From each sample, one aliquot was stored at -22 °C, another one at 4 °C and the last one at 22 °C. Then, enzymatic activity (UDPase) assays were performed for 20 consecutive days starting from time “zero” after purification. Before each test, all samples were kept on ice for 5 min.

2.3. Anti-TcNTPDase-1 polyclonal antiserum production and the purification of specific antibodies

The recombinant TcNTPDase-1 purified by nickel affinity chromatography was used to produce specific polyclonal antiserum as previously described (Santos et al., 2009). All of the procedures were performed according to the guidelines of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). The immune antiserum was used to purify specific anti-TcNTPDase-1 antibodies. To purify the specific IgGs against TcNTPDase-1 that were present in the polyclonal antiserum, the purified recombinant TcNTPDase-1 protein was coupled to CNBr-Sepharose Fast Flow 4B according to the manufacturer's instructions (GE®). Specific anti-TcNTPDase-1 IgGs were purified as described previously (Chandler, 2007).

2.4. Parasites

We used a *T. cruzi* Y strain isolated from an acute human case. This strain leads to low parasitemia and high mortality in mice (Silva and Nussenzweig, 1953). *T. cruzi* epimastigotes grown in LIT medium and frozen in liquid nitrogen were thawed and seeded in Grace's medium (Sigma) containing 5% fetal bovine serum (FBS) at 28 °C.

2.5. Western blot

To immunodetect the TcNTPDase-1 in *T. cruzi* protein extract, parasites grown in LIT medium were centrifuged at 786 × g for 5 min at 4 °C to remove the growth medium and resuspended in

PBS. A 10% SDS-PAGE gel was loaded with 20 µg of total protein extract from non-infective axenic epimastigotes. The proteins were separated by electrophoresis and blotted on a nitrocellulose membrane. We used anti-TcNTPDase-1 purified antibodies (1:1,000) as primary antibodies and anti-rabbit-IgG conjugated with FITC (Sigma®) as secondary antibodies (1:10,000).

2.6. Adhesion assay and blocking with anti-TcNTPDase-1 antibodies

A modification of the method previously described (Santos et al., 2009) was used to determine whether epimastigotes attached to VERO cell monolayers. Briefly, the epimastigote form of the parasite was grown in Grace's medium at 26 °C until the culture reached the mid-log phase of growth and was then resuspended in RPMI with 5% FBS. Epimastigotes (20:1 parasites per cell) were gently washed with PBS and placed in contact with VERO cells that had been previously cultured for 48 h in RPMI with 5% FBS, removed with trypsin and plated on sterile coverslips (13 mm) at 5×10^5 cells per coverslip. The parasites interacted with the cells for 30 min at 4 °C. The coverslips were gently washed with PBS at 4 °C, fixed with Bouin solution for 15 min, stained with Giemsa and analyzed by light microscopy (Santos et al., 2009). Anti-dog IgG (Santa Cruz Biotechnology®) was used as negative control, and VERO cells plus epimastigotes were used as positive control. The percentage of adhered parasites was determined by counting 300 cells, in triplicate, in the presence or absence of polyclonal anti-TcNTPDase-1 at a dilution ratio of 1:100. The adhesion assays were performed in three independent experiments.

2.7. Adhesion assays and inhibition by competition with recombinant TcNTPDase-1

The adhesion competition assays with TcNTPDase-1 were conducted at different protein concentrations (0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 µg/mL). The protein concentrations were determined by the Bradford method (Bradford, 1976) using 96-well microplates (Biorad®). VERO cells were cultured for 48 h on sterile, round, glass coverslips in a 24-well tissue culture plate at a density of 5×10^5 cells per coverslip in RPMI with FBS 5% at 37 °C with 5% CO₂. To study the inhibition of adhesion, VERO cells were incubated with the recombinant protein for 5 min. Epimastigotes were then centrifuged, counted and resuspended at the desired concentration in RPMI with 5% FBS and added to the cell monolayers as described above (Santos et al., 2009). Albumin (4 µg/mL), recombinant protein elution buffer and denatured TcNTPDase-1 (0.5 µg/mL, 5 min boiled at 95 °C) were used as negative controls, and VERO cells plus epimastigotes was used as a positive control. The percentage of adhered parasites was determined by counting 300 cells in triplicate in the presence or absence of TcNTPDase-1 at each recombinant protein concentration. The adhesion assays were performed as three independent experiments.

2.8. Immunolocalization of TcNTPDase-1 in epimastigotes by confocal laser scanning microscopy

The immunolocalization of TcNTPDase-1 in epimastigotes was performed with epimastigotes obtained as described above. The parasites were washed twice in PBS and settled onto glass slides containing 1% poly-lysine. After one wash with PBS, they were directly fixed for 10 min at room temperature with PBS containing 4% paraformaldehyde and then blocked in PBS plus 2% BSA. The samples were incubated with a purified polyclonal antibody against TcNTPDase-1 (dilution 1:50) in PBS plus 2% BSA for 1 h at room temperature. The slides were washed in blocking solution and subsequently incubated for 30 min at 37 °C with Alexa 488-conjugated

goat anti-rabbit IgG secondary antibody (Invitrogen Life Technologies) at a dilution of 1:400. The glass slides were mounted with Prolong Gold Antifade Reagent containing DAPI (Molecular Probes) and examined by confocal microscopy (Leica, SP5) at the Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto-USP, Ribeirao Preto, SP (Baqui et al., 2000).

2.9. Ultrastructural immunocytochemistry

For transmission electron microscopy analysis, epimastigotes were fixed in 4% paraformaldehyde, 0.5% glutaraldehyde, 5 mM calcium chloride, and 3.7% sucrose in a 100 mM sodium cacodylate buffer (pH 7.2). The samples were gradually dehydrated in alcohol at low temperatures, infiltrated, and finally set in LR White resin at 60 °C. Ultrathin sections were collected on nickel grids of 300 mesh and incubated for 20 min at room temperature in 50 mM ammonium chloride in PBS at pH 7.2. Next, the sections were incubated in PBS (pH 8.0) containing 1.5% albumin and 0.01% Tween 20 for 20 min at room temperature and then overnight in the presence of purified anti-TcNTPDase1 (1:100 or 1:50 as indicated) except for control grids. The grids were washed in PBS and finally incubated (1:30) with a secondary anti-rabbit IgG produced in goat and conjugated with 10 nm gold particles for 60 min. The ultrathin sections were contrasted with solutions of 3% uranyl acetate and 0.2% lead citrate. All of the materials were observed and photographed in a transmission electron microscope (Zeiss EM 109) at the Núcleo de Microscopia e Microanálise at Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

2.10. Statistical analysis

The data were statistically analyzed using the ANOVA Holm–Sidak method using SigmaPlot software, Version 11.0 2008, and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results and discussion

3.1. TcNTPDase-1 heterologous expression, purification and biochemical characterization

The TcNTPDase-1 gene was previously described by our group (Fietto et al., 2004), and its protein was demonstrated to be a virulence factor and facilitator of infectivity (Santos et al., 2009). To expand on the TcNTPDase-1 studies and biochemical characterization, we expressed the recombinant TcNTPDase-1 in a bacterial system and used it in biochemical and biological studies. The purified recombinant protein presented only one protein band in a Coomassie blue-stained gel as previously shown (Santos et al., 2009). The recombinant protein was purified in its active form and showed a greater ability to hydrolyze diphosphate nucleosides over their respective triphosphate nucleosides (Fig. 1A and B). A substrate specificity characterization demonstrated that TcNTPDase-1 is a genuine apyrase enzyme. The hydrolysis intensity followed the order GDP = UDP > GTP = UTP > ADP = ATP (Fig. 1A), consistent with the results shown for ATP and ADP in a previous study from our group (Santos et al., 2009). The refolding and temperature stability tests using UDP as a substrate showed that the recombinant TcNTPDase-1 was more stable when stored at 4 °C than at room temperature (22 °C) or at a freezing temperature (–22 °C) (Fig. 1B). Furthermore, the activity increased until five days after purification, remained stable until approximately day 10, and then decreased after this time, descending to levels lower than 50% of the highest activity (obtained at day 5 after purification).

Previous studies have reported the expression of the human NTPDases 5 and 6 in bacterial systems, and we observed similarities between the profiles of TcNTPDase-1 and these enzymes with

A

Table 1: Substrate Specificity of *T. cruzi* NTPDase-1

Substrate	nmol Pi x mg ⁻¹ x min ⁻¹
ATP	84.3 ± 13.9
ADP	142.3 ± 59.2
AMP	0
GTP	633.6 ± 175.1
GDP	1335.6 ± 321.4
UTP	533.0 ± 149.0
UDP	1224.1 ± 120.9

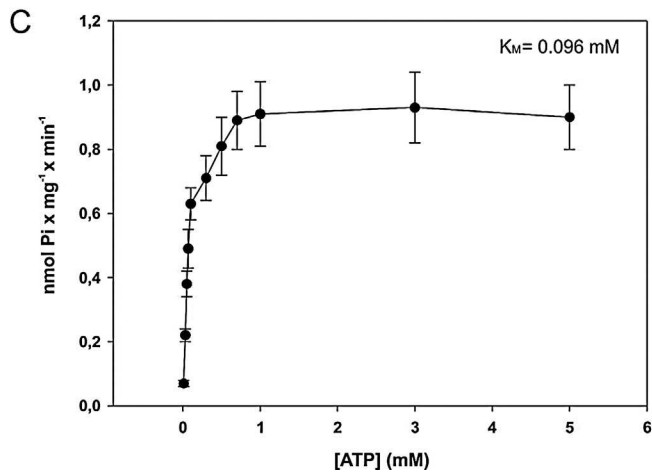
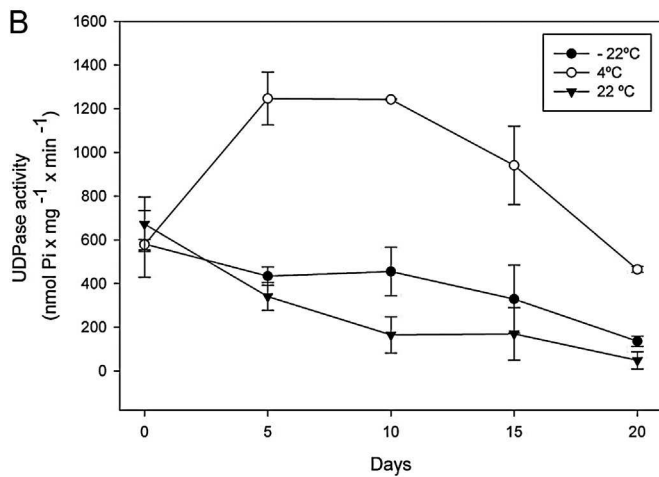


Fig. 1. Heterologous TcNTPDase-1 substrate specificity, stability and K_m . Enzyme activity was assayed using the malachite green method in a reaction buffer containing 50 mM HEPES, 50 mM Tris, 116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂ and 2.5 mM substrate, with the pH adjusted to 8.0. The results are the means \pm SD from at least three independent experiments. After TcNTPDase-1 purification, each of the three samples was aliquoted and stored to verify the ideal storage temperature. Activity assays were performed for 20 days using UDP as a substrate (B). (C) The K_m for ATP. Activity was determined by measuring the hydrolysis of [γ -³²P] ATP. The results are the means \pm SD from at least three independent experiments.

some distinctions. The human NTPDase 6 hydrolyzes GDP more effectively than UDP and GTP more effectively than UTP, whereas TcNTPDase-1 hydrolyzes GDP and UDP equally well; likewise, it hydrolyzes GTP and UTP equally well. Similar observations can be made from the study of human NTPDase 5 (Ivanenkov et al., 2003; Murphy-Piedmonte et al., 2005; Santos et al., 2009).

It is important to note that the hydrolytic capabilities assayed using an excess of substrate and a long time reaction (Fig. 1A) may not be directly related to the sensitivity to or affinity for the nucleotides, as demonstrated in the kinetic test with recombinant TcNTPDase-1, using ATP as the substrate. In this assay, we verified a K_m of 0.096 mM (Fig. 1C), whereas the K_m for UDP was almost 10 times higher (data not shown), suggesting that we cannot rule out the importance of ATP hydrolysis, even though it had the lowest hydrolysis intensity in the substrate specificity assay (Fig. 1A). These data strengthen an idea proposed in our previous works (Fietto et al., 2004; Santos et al., 2009), in which we suggested that the hydrolytic activity of this enzyme might have a role in modulating the host ATP-dependent purinergic signaling, such as that involved in the immune system. This supposition is based only on the K_m for ATP (e.g., CD39 K_m for ATP is 0.01–0.2 mM) (Zimmermann et al., 2012) and P2 receptors EC₅₀, that would allow its desensitization by TcNTPDase activity (e.g., P₂X₇ EC₅₀ for ATP is 0.1 mM) (Khakh et al., 2001). Nevertheless, because we used a purified protein, the real role in physiological conditions needs to be better characterized in future studies. The importance of these receptors in triggering the immune response of the host is well known (Bours et al., 2006; Burnstock, 2007). Recent studies have demonstrated the importance of purine receptors in the elimination of intracellular pathogens such as *Leishmania*. It has been shown that, during infection, the host cell increases its expression of these receptors, but they are inactive or have their activation blocked by an unknown mechanism (Chaves et al., 2009; Marques-da-Silva et al., 2011).

3.2. Immunodetection and immunolocalization of TcNTPDase-1 using specific antibodies

We purified specific antibodies using affinity chromatography, and these antibodies were able to detect the recombinant TcNTPDase-1. Western blotting analysis revealed a single band of approximately 70 kDa in epimastigotes (non-infective form) (Fig. 2A). This molecular weight is compatible with the weight of TcNTPDase-1 previously predicted by our group (Fietto et al., 2004).

Assays of *in vitro* enzymatic activity using the anti-TcNTPDase-1 antibody had not previously shown inhibitory effect against the recombinant protein, suggesting that this antibody might recognize a protein homologous to TcNTPDase-1 or that it might bind to TcNTPDase-1 in a region inessential for enzymatic activity (Santos et al., 2009). The antiserum, however, was able to inhibit the *in vitro* infectivity by approximately 50%, suggesting that binding to these other regions of TcNTPDase-1 still affects the infective ability of the trypomastigote.

To better understand the cellular role and localization of TcNTPDase-1, we used the purified antibodies to localize TcNTPDase-1 in the *T. cruzi* epimastigotes by confocal microscopy. We observed a distribution of TcNTPDase-1 throughout the epimastigote cell bodies in both non-permeabilized paraformaldehyde-fixed and acetone-fixed cells (data not shown), indicating that the protein is located on the cell surface of the parasite (Fig. 2B). Additionally, strong staining was observed in the inner middle parasite's body (white arrow), near the flagellar pocket region. This result could suggest a role for TcNTPDase-1 in the acquisition of nucleosides and purines because the flagellar pocket is the major region involved in endocytic and exocytic

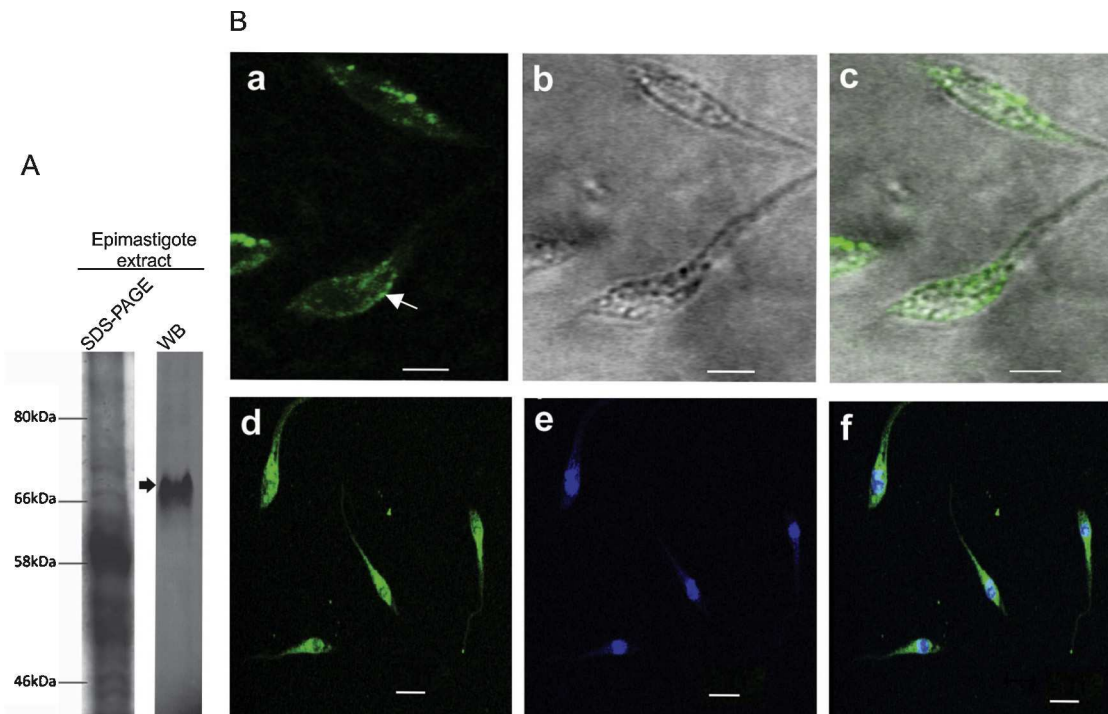


Fig. 2. Immunodetection of TcNTPDase-1 in *T. cruzi*. (A) Western blot (WB) analysis of TcNTPDase-1 expression in epimastigote extract. After incubation with rabbit antibodies anti-NTPDase-1 (1:10,000) and anti-IgG conjugated with FITC (1:10,000), nitrocellulose membranes were analyzed in FLA 5100 (Fujifilm®). The SDS-PAGE gel was stained with Coomassie blue. (B) TcNTPDase-1 distribution in epimastigotes by confocal microscopy. Non-permeabilized parasites were fixed and stained with anti-TcNTPDase-1 (1:50) and visualized with Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (a, d) (white arrow indicates the inner middle body), phase contrast (b) and merged (c, f). Nuclei and kinetoplasts were labeled with DAPI (e). Bar = 5 μ m.

activities in epimastigotes (Field and Carrington, 2009; Landfear and Ignatushchenko, 2001).

The subcellular localization of the enzyme in the epimastigote form was determined by immunoelectron microscopy using purified polyclonal antibodies against TcNTPDase-1. In an ultrastructural analysis, gold particles were visualized predominantly in the cell body, nucleus, flagellum and flagellar pocket region (Fig. 3). The presence of TcNTPDase-1 in the flagellum insertion region recapitulates the data suggested by the confocal images (Fig. 2B) and reinforces the possible role of this protein in nutrient acquisition by epimastigotes because they are a replicative form of the parasite, which has a metabolism that requires high levels of purines and derivatives to replicate DNA, transcribe RNA and execute other purine-dependent pathways (Berens et al., 1981).

Staining was also observed in the kinetoplast, in cytoplasmic vesicles and, to a lesser extent, on the external cell surface (white arrowhead) and inner cell surface (black arrowhead) (Fig. 3). No staining was observed in the control assay (e.g., Fig. 3H). The vesicular localization of this enzyme could be reservosomes. A recent and specific reservosome proteomic study revealed the presence of TcNTPDase-1 in these organelles (Sant'Anna et al., 2009). These data reinforce the possible involvement of TcNTPDase-1 in the metabolic nutrition of epimastigotes because reservosomes are described as multivesicular bodies that are the main site for the storage of ingested proteins and lipids, as well as for secretory proteins that are synthesized by protozoans. Nevertheless, TcNTPDase-1 vesicular localization requires further investigation. In addition, TcNTPDase-1 has a signal peptide in its amino-terminal domain (Fietto et al., 2004). The peptide signal suggests TcNTPDase-1 may also be secreted, but this cannot be currently verified experimentally.

The observed cell surface localization is in accord with previous data that described NTPDase activity on the cell surface of *T. cruzi* (Bernardes et al., 2000; Bisaggio et al., 2003; Fietto

et al., 2004; Meyer-Fernandes et al., 2004; Santos et al., 2009). Furthermore, immunolocalization using non-homologous anti-*T. gondii* NTPDase1 antibodies revealed the presence of a NTPDase-homologous protein on the surface of *T. cruzi* (Fietto et al., 2004). Our data support this observation with ultrastructural immunolocalization using specific purified antibodies, and the lower level of surface detection is related to this post-inclusion technique.

The spread profile of TcNTPDase-1 subcellular localization is reinforced by recent findings showing similar ubiquitous localization of an NTPDase in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* promastigotes, suggesting their involvement with various biological processes within these parasites (Detoni et al., 2013; Porcino et al., 2012).

3.3. TcNTPDase-1 may play a role in parasite adhesion to mammalian cells

Ectonucleotidases are very important for many biological processes, and their importance in infections caused by pathogens, including protozoa such as *T. cruzi* (Sansom et al., 2008), has been studied. We demonstrated that a high ratio of extracellular ATP/ADP hydrolysis is important for the trypomastigote-stage parasite to maintain the ability to infect VERO cells (Santos et al., 2009). In that work, we found that the partial inhibition of ecto-ATPDase activity decreased *in vitro* infectivity and parasite virulence. Alternately, the antibodies produced against the recombinant TcNTPDase-1 did not inhibit the ATPDase activity of the recombinant protein or the ecto-ATPDase activity in live parasites. However, the same antibodies were able to inhibit an *in vitro* infection, suggesting a specific role for TcNTPDase-1 that would be partially independent of enzymatic activity.

In this work, we used recombinant TcNTPDase-1 and specific polyclonal antibodies to evaluate its biological role at the early

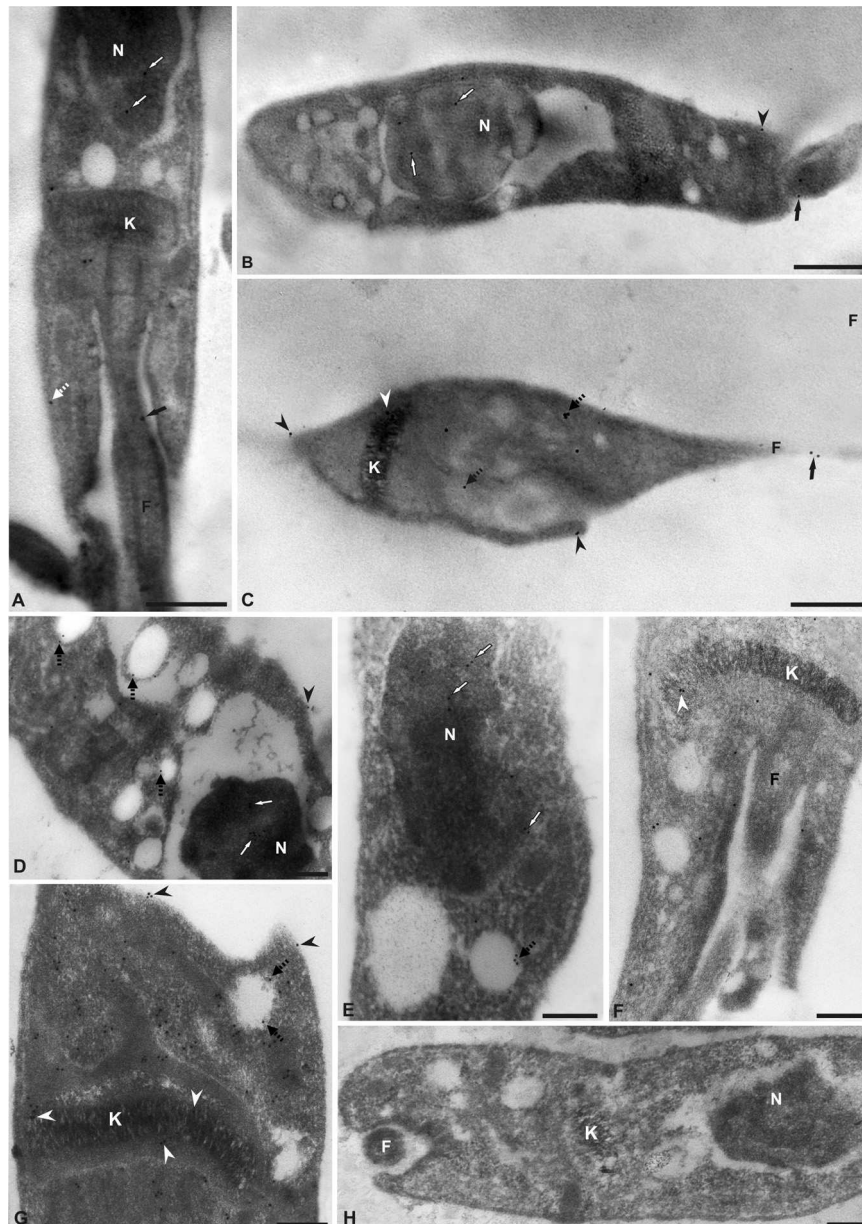


Fig. 3. Ultrastructural analysis of TcNTPDase-1 subcellular localization in epimastigotes. (A–G) Electromicrographs using polyclonal anti-TcNTPDase-1 (1:110 A–C, and 1:50 D–G) and anti-IgG conjugated to 10 nm colloidal gold. TcNTPDase-1 is shown in the nucleus (N) (white arrows), kinetoplast (K) (white arrowhead), internal vesicles (dashed black arrow), flagellum (F) (black arrow), flagellum insertion region (panel F surrounding the flagellum), and outer and inner cell surface (black arrowheads and dashed white arrow, respectively). No staining was observed in the control (H). Bars: A, C–H=0.2 μ m; B=0.5 μ m.

stage of infection in mammalian cells, specifically in the adhesion step.

The adhesion assays were performed using epimastigotes at the log phase of growth. Direct adhesion assays were performed using VERO cells as a model. To avoid internalization, the assays were conducted at 4°C for 30 min as previously described (Bisaggio et al., 2003). The adhesion assays were conducted either with cells that had been previously incubated in the presence of purified recombinant protein in a competition assay (Fig. 4A) or with epimastigotes that had been previously incubated with purified anti-TcNTPDase-1 to directly block native TcNTPDase-1 (Fig. 4B). In the presence of increasing amounts of the recombinant protein (Fig. 4A), we observed a significant dose-dependent inhibition of epimastigote adhesion, suggesting the presence of binding sites on the host cell that would be partially blocked by recombinant TcNTPDase-1.

Furthermore, the nucleotidase activity of the recombinant protein could also influence this event. There was no inhibitory effect when the assay was performed in the presence of an unrelated protein (albumin) or denatured TcNTPDase-1 (Fig. 4A). The parasites that had been previously incubated with purified polyclonal anti-TcNTPDase-1 antibodies (Fig. 4B) exhibited a significant decrease in motility (data not shown) and a significant decrease in adhesion (compared to the controls) in the absence of antibodies or in the presence of an unrelated antibody (anti-dog IgG). The effects of anti-TcNTPDase-1 are specific and independent of the conserved portion of IgGs, as shown by the fact that the control using unrelated anti-IgG did not differ from the control without any antibodies (Fig. 4B). Although the decrease in motility could contribute to the observed decrease in adhesion.

These results suggest that TcNTPDase-1 could participate in cell adhesion. We can envision three scenarios that would explain

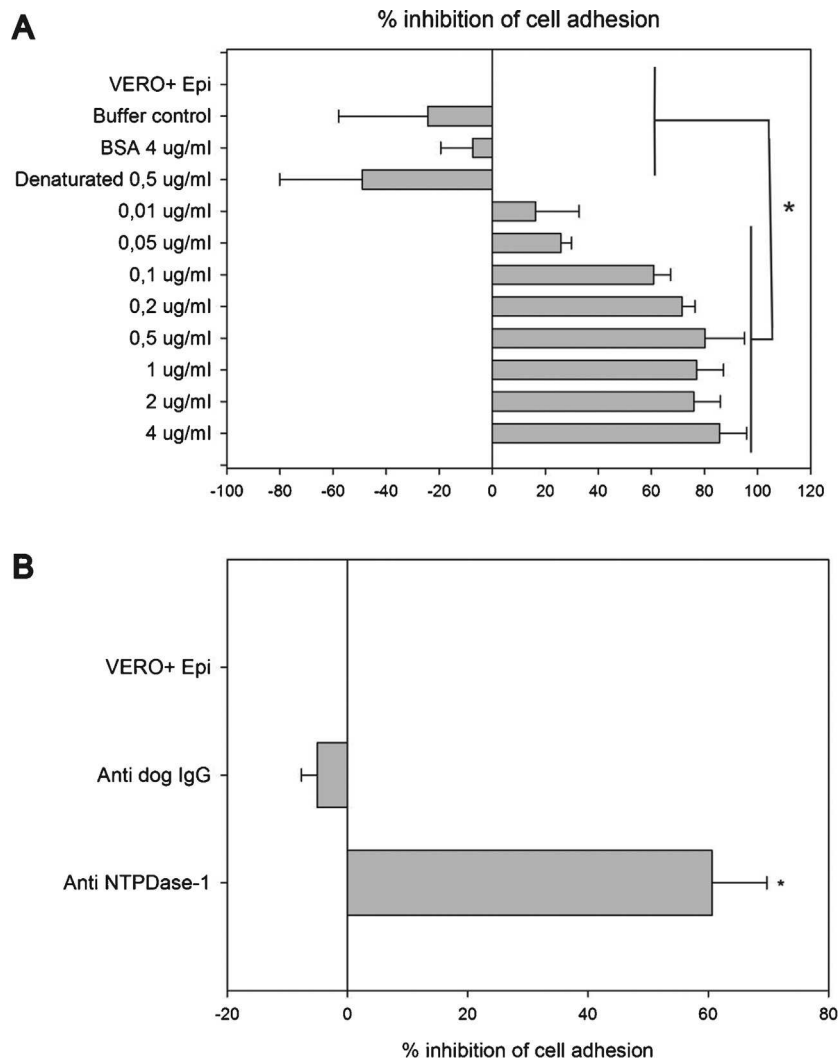


Fig. 4. Participation of TcNTPDase-1 in cell adhesion. (A) Adhesion assays by competition with TcNTPDase-1. VERO cells were previously placed in contact with various concentrations of recombinant protein for 5 min (0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Epimastigotes were then added (20 parasites per cell). (B) Adhesion assays in the presence or absence of polyclonal anti-TcNTPDase-1. Epimastigotes were previously incubated with antibodies for 10 min and then placed in contact with the VERO cells (20:1). After incubation, coverslips were washed, fixed, stained and analyzed by light microscopy. Albumin (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA), the elution buffer of the recombinant protein (Buffer control), denatured TcNTPDase-1 (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Anti-dog-IgG (Santa Cruz Biotechnology®) and VERO cells with epimastigotes only (VERO + Epi) were used as controls. The percentage of adhered parasites was determined by counting 300 cells in triplicate on each coverslip tested. The results are the means \pm SD from at least three independent experiments.

this hypothesis: firstly, antibodies may bind to the modulatory regions of the enzyme, thus preventing it from responding to certain stimuli; alternately, the action of antibody binding could generate a steric hindrance on the surface of the parasite, impairing its adhesion to host cells; finally, there could be a synergic interaction between the enzyme and a host receptor, and the anti-TcNTPDase-1 would also be capable of inhibiting the adhesion to the host cell. All three hypotheses are currently under investigation.

4. Conclusions

Our results provide new information regarding TcNTPDase-1 nucleotidase activity, demonstrating its ability to use a broad range of triphosphate and diphosphate nucleosides. Additionally, we used specific antibodies to provide new data regarding several aspects of subcellular localization. The ubiquitous localization of TcNTPDase-1 in epimastigotes highlights the need to investigate the participation of this enzyme in other processes, in addition to

its possible roles in both purine acquisition and virulence. Furthermore, we demonstrated that TcNTPDase-1 could be involved in host cell adhesion. This specific parasite–host interaction and the possible unknown functions of TcNTPDase-1 (related to its ubiquitous localization in replicative parasite cells) merit further study.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for financial support and FFC and XMS fellowships. We thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support and MRA, CMM, MSB, JRMF, JLRF and BPM fellowships. MMAB received financial support from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and thanks Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) for RFS, RSV, LCSC, MANV and MLT fellowships.

References

- Areas, A.P., Oliveira, M.L., Ramos, C.R., Sbrogio-Almeida, M.E., Raw, I., Ho, P.L., 2002. Synthesis of cholera toxin B subunit gene: cloning and expression of a functional 6xhis-tagged protein in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 25, 481–487.
- Baqui, M.M., Milder, R., Mortara, R.A., Pudles, J., 2000. *In vivo* and *in vitro* phosphorylation and subcellular localization of trypanosomatid cytoskeletal giant proteins. *Cell Motil. Cytoskeleton* 47, 25–37.
- Berens, R.L., Marr, J.J., LaFon, S.W., Nelson, D.J., 1981. Purine metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3, 187–196.
- Bernardes, C.F., Meyer-Fernandes, J.R., Saad-Nehme, J., Vannier-Santos, M.A., Peres-Sampaio, C.E., Vercesi, A.E., 2000. Effects of 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid on *Trypanosoma cruzi* proliferation and Ca(2+) homeostasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32, 519–527.
- Berredo-Pinho, M., Peres-Sampaio, C.E., Crispim, P.P., Belmont-Firpo, R., Lemos, A.P., Martiny, A., Vannier-Santos, M.A., Meyer-Fernandes, J.R., 2001. A Mg-dependent Ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. *Arch. Biochem. Biophys.* 391, 16–24.
- Bisaggio, D.F., Peres-Sampaio, C.E., Meyer-Fernandes, J.R., Souto-Pradon, T., 2003. Ecto-ATPase activity on the surface of *Trypanosoma cruzi* and its possible role in the parasite–host cell interaction. *Parasitol. Res.* 91, 273–282.
- Borst, P., Fairlamb, A.H., 1998. Surface receptors and transporters of *Trypanosoma brucei*. *Annu. Rev. Microbiol.* 52, 745–778.
- Bours, M.J., Swennen, E.L., Di Virgilio, F., Cronstein, B.N., Dagnelie, P.C., 2006. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther.* 112, 358–404.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Burnstock, G., 2007. Purine and pyrimidine receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 1471–1483.
- Chagas, C., 1909. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1, 159–218.
- Chandler, J.P., 2007. Purification and Characterization of Antibodies. Making and Using Antibodies: A Practical Handbook. CRC Press and Taylor & Francis Group, New York.
- Chaves, S.P., Torres-Santos, E.C., Marques, C., Figliuolo, V.R., Persechini, P.M., Coutinho-Silva, R., Rossi-Bergmann, B., 2009. Modulation of P2x(7) purinergic receptor in macrophages by *Leishmania amazonensis* and its role in parasite elimination. *Microbes Infect.* 11, 842–849.
- Cohn, C.S., Gottlieb, M., 1997. The acquisition of purines by trypanosomatids. *Parasitol. Today* 13, 231–235.
- de Almeida Marques-da-Silva, E., de Oliveira, J.C., Figueiredo, A.B., de Souza Lima Jr., D., Carneiro, C.M., Rangel Fietto, J.L., Crocco Afonso, L.C., 2008. Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. *Microbes Infect.* 10, 850–857.
- de Souza, M.C., de Assis, E.A., Gomes, R.S., Marques da Silva Ede, A., Melo, M.N., Fietto, J.L., Afonso, L.C., 2010. The influence of ecto-nucleotidases on *Leishmania amazonensis* infection and immune response in C57b/6 mice. *Acta Trop.* 115, 262–269.
- Detoni, M.L., Fessel, M.R., Maia, A.C., Porcino, G.N., Quellis, L.R., Faria-Pinto, P., Marques, M.J., Juliano, M.A., Juliano, L., Diniz, V.A., Corte-Real, S., Gonçalves-da-Costa, S.C., Souza, C.S., Vasconcelos, E.G., 2013. An antigenic domain of the *Leishmania amazonensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is associated with disease progression in susceptible infected mice. *Parasitol. Res.* 112 (8), 2773–2782.
- Ekman, P., Jager, O., 1993. Quantification of subnanomolar amounts of phosphate bound to seryl and threonyl residues in phosphoproteins using alkaline hydrolysis and malachite green. *Anal. Biochem.* 214, 138–141.
- Field, M.C., Carrington, M., 2009. The trypanosome flagellar pocket. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 775–786.
- Fietto, J.L., DeMarco, R., Nascimento, I.P., Castro, I.M., Carvalho, T.M., de Souza, W., Bahia, M.T., Alves, M.J., Verjovski-Almeida, S., 2004. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316, 454–460.
- Ivanenkov, V.V., Murphy-Piedmonte, D.M., Kirley, T.L., 2003. Bacterial expression, characterization, and disulfide bond determination of soluble human NTPDase6 (CD3912) nucleotidase: implications for structure and function. *Biochem.* 42, 11726–11735.
- Khakh, B.S., Burnstock, G., Kennedy, C., King, B.F., North, R.A., Seguela, P., Voigt, M., Humphrey, P.P., 2001. International Union of Pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol. Rev.* 53, 107–118.
- Landfear, S.M., Ignatushchenko, M., 2001. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 115, 1–17.
- Lemos, A.P., Peres-Sampaio, C.E., Guimaraes-Motta, H., Silva, J.L., Meyer-Fernandes, J.R., 2000. Effects of naturally occurring polyols and urea on mitochondrial F0F1 ATPase. *Z. Naturforsch. C* 55, 392–398.
- Maioli, T.U., Takane, E., Arantes, R.M., Fietto, J.L., Afonso, L.C., 2004. Immune response induced by new world *Leishmania* species in C57b/6 mice. *Parasitol. Res.* 94, 207–212.
- Marques-da-Silva, C., Chaves, M.M., Chaves, S.P., Figliuolo, V.R., Meyer-Fernandes, J.R., Corte-Real, S., Lameu, C., Ulrich, H., Ojcius, D.M., Rossi-Bergmann, B., Coutinho-Silva, R., 2011. Infection with *Leishmania amazonensis* upregulates purinergic receptor expression and induces host-cell susceptibility to UTP-mediated apoptosis. *Cell. Microbiol.* 13, 1410–1428.
- Meyer-Fernandes, J.R., Saad-Nehme, J., Peres-Sampaio, C.E., Belmont-Firpo, R., Bisaggio, D.F., Do Couto, L.C., Fonseca De Souza, A.L., Lopes, A.H., Souto-Pradon, T., 2004. A Mg-dependent ecto-ATPase is increased in the infective stages of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.* 93, 41–50.
- Murphy-Piedmonte, D.M., Crawford, P.A., Kirley, T.L., 2005. Bacterial expression, folding, purification and characterization of soluble NTPDase5 (CD3914) ecto-nucleotidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1747, 251–259.
- Plesner, L., 1995. Ecto-ATPases: identities and functions. *Int. Rev. Cytol.* 158, 141–214.
- Porcino, G.N., Carvalho-Campos, C., Maia, A.C., 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., 2012. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1): localization and *in vitro* inhibition of promastigotes growth by polyclonal antibodies. *Exp. Parasitol.* 132, 293–299.
- Sansom, F.M., Newton, H.J., Crikis, S., Cianciotto, N.P., Cowan, P.J., d'Apice, A.J., Hartland, E.L., 2007. A bacterial ecto-triphosphate diphosphohydrolase similar to human CD39 is essential for intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Cell. Microbiol.* 9, 1922–1935.
- Sansom, F.M., Robson, S.C., Hartland, E.L., 2008. Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host–pathogen interactions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 765–781.
- Sant'Anna, C., Nakayasu, E.S., Pereira, M.G., Lourenco, D., de Souza, W., Almeida, I.C., Cunha, E.S.N.L., 2009. Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservoirs. *Proteomics* 9, 1782–1794.
- Santos, R.F., Possa, M.A., Bastos, M.S., Guedes, P.M., Almeida, M.R., Demarco, R., Verjovski-Almeida, S., Bahia, M.T., Fietto, J.L., 2009. Influence of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e387.
- Silva, L.H., Nussenzweig, V., 1953. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.* 20, 191–207.
- Silverman, J.A., Qi, H., Riehl, A., Beckers, C., Nakaar, V., Joiner, K.A., 1998. Induced activation of the *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase leads to depletion of host cell ATP levels and rapid exit of intracellular parasites from infected cells. *J. Biol. Chem.* 273, 12352–12359.
- WHO, 2010. Chagas disease: control and elimination, sixty-third world health assembly, April, 22 ed.
- Zimmermann, H., 1999. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 231–236.
- Zimmermann, H., Zebisch, M., Sträter, N., 2012. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal.* 3, 437–502.

Capítulo III

Leishmania infantum ECTO-NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE
DIPHOSPHOHYDROLASE-2 IS AN APYRASE INVOLVED IN
MACROPHAGE INFECTION AND EXPRESSED IN INFECTED DOGS



Leishmania infantum Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 is an Apyrase Involved in Macrophage Infection and Expressed in Infected Dogs

Raphael De Souza Vasconcellos^{1,2}, Christiane Mariotini-Moura^{1,2}, Rodrigo Saar Gomes³, Tiago Donatelli Serafim^{3^{na}}, Rafaela de Cássia Firmino⁴, Matheus Silva e Bastos^{2,4}, Felipe Freitas de Castro^{4^{nb}}, Claudia Miranda de Oliveira⁴, Lucas Borges-Pereira^{4^{nc}}, Anna Cláudia Alves de Souza⁴, Ronny Francisco de Souza⁴, Gabriel Andres Tafur Gómez⁵, Aimara da Costa Pinheiro⁶, Talles Eduardo Ferreira Maciel^{4,7}, Abelardo Silva-Júnior⁵, Gustavo Costa Bressan⁴, Márcia Rogéria Almeida⁴, Munira Muhammad Abdel Baqui⁸, Luís Carlos Crocco Afonso², Juliana Lopes Rangel Fietto^{2,4*}

1 Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil, 2 Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças Infecciosas (INBEQMeDI), São Carlos, São Paulo, Brazil, 3 Departamento de Ciências Biológicas – ICEB/, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil, 4 Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil, 5 Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil, 6 Centro de Zoonoses de Governador Valadares, Governador Valadares, Minas Gerais, Brazil, 7 Núcleo de Bioinformática, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil, 8 Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Abstract

Background: Visceral leishmaniasis is an important tropical disease, and *Leishmania infantum chagasi* (synonym of *Leishmania infantum*) is the main pathogenic agent of visceral leishmaniasis in the New World. Recently, ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases) were identified as enablers of infection and virulence factors in many pathogens. Two putative E-NTPDases (~70 kDa and ~45 kDa) have been found in the *L. infantum* genome. Here, we studied the ~45 kDa E-NTPDase from *L. infantum chagasi* to describe its natural occurrence, biochemical characteristics and influence on macrophage infection.

Methodology/Principal Findings: We used live *L. infantum chagasi* to demonstrate its natural ecto-nucleotidase activity. We then isolated, cloned and expressed recombinant rLicNTPDase-2 in bacterial system. The recombinant rLicNTPDase-2 hydrolyzed a wide variety of triphosphate and diphosphate nucleotides (GTP > GDP = UDP > ADP > UTP = ATP) in the presence of calcium or magnesium. In addition, rLicNTPDase-2 showed stable activity over a pH range of 6.0 to 9.0 and was partially inhibited by ARL67156 and suramin. Microscopic analyses revealed the presence of this protein on cell surfaces, vesicles, flagellae, flagellar pockets, kinetoplasts, mitochondria and nuclei. The blockade of E-NTPDases using antibodies and competition led to lower levels of parasite adhesion and infection of macrophages. Furthermore, immunohistochemistry showed the expression of E-NTPDases in amastigotes in the lymph nodes of naturally infected dogs from an area of endemic visceral leishmaniasis.

Conclusions/Significance: In this work, we cloned, expressed and characterized the NTPDase-2 from *L. infantum chagasi* and demonstrated that it functions as a genuine enzyme from the E-NTPDase/CD39 family. We showed that E-NTPDases are present on the surface of promastigotes and in other intracellular locations. We showed, for the first time, the broad expression of LicNTPDases in naturally infected dogs. Additionally, the blockade of NTPDases led to lower levels of *in vitro* adhesion and infection, suggesting that these proteins are possible targets for rational drug design.

Citation: Vasconcellos RDS, Mariotini-Moura C, Gomes RS, Serafim TD, Firmino RdC, et al. (2014) *Leishmania infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 is an Apyrase Involved in Macrophage Infection and Expressed in Infected Dogs. PLoS Negl Trop Dis 8(11): e3309. doi:10.1371/journal.pntd.0003309

Editor: Paul Andrew Bates, Lancaster University, United Kingdom

Received: May 9, 2014; **Accepted:** October 2, 2014; **Published:** November 13, 2014

Copyright: © 2014 Vasconcellos et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors gratefully acknowledge the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support from grant number CNPq/CAPES 552459/2011-9 URL <http://www.cnpq.br/> and <http://www.capes.gov.br/> and FAPEMIG grant number APQ-00754-11 and APQ-02437-10 <http://www.fapemig.br/>. We thank FAPEMIG for FFdC, LBP fellowships; CNPq for JLRF, MRA, LCCA, MSeB and ACAdS, and CMM fellowships; and CAPES for CMDO, RDSV and RfDS fellowships. MMAB received financial support from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) URL www.fapesp.br/. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: jufietto@ufv.br; jufietto@gmail.com

^{¶a} Current address: Wellcome Trust Centre for Molecular Parasitology and Institute of Infection, Immunity and Inflammation, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom

^{¶b} Current address: Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

^{¶c} Current address: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is a disease that, if not treated, is usually fatal. It affects thousands of people per year worldwide. The majority of cases occur in poor areas of underdeveloped or developing countries. This disease is considered an emergent public health problem because it is spreading to large urban centers in the endemic areas and because immune-deficient AIDS patients are highly susceptible [1]. There are few drugs, most of them highly toxic, to treat VL. Thus, the development of new drugs and other strategies to block, control and prevent the disease are still needed [2,3].

Several parasites, including *Leishmania*, are dependent on the purine salvage pathway to synthesize purine nucleotides, which are required for the synthesis of nucleic acid and other important biological molecules [4]. The ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases are suggested to participate in the purine salvage pathway through the hydrolysis of extracellular nucleoside tri and diphosphates, leading to the production of nucleoside monophosphates. The ecto-5'-nucleotidases can then convert the nucleoside monophosphates to nucleosides, which can be taken into the cells to be used in intracellular purine nucleotide synthesis [5,6]. In general, enzymes from the purine salvage pathway are considered good targets for rational drug design for diseases associated with pathogens that depend on this pathway [7].

The role of E-NTPDases in infectivity, virulence or purine acquisition of the pathogenic protozoan parasites has been investigated in *Trypanosoma cruzi* [8], *Toxoplasma gondii* [9] and the species of *Leishmania* that causes tegumental leishmaniasis [6,10–12]. These studies suggested that the E-NTPDases have key roles in parasite infections through the subversion of extracellular nucleotide signaling pathways, particularly those involving ATP and ADP. In mammals, E-NTPDases participate in the control of purinergic signaling [13], and parasites seem to have developed a similar system to control host responses associated with purinergic signaling.

A previous study from our group and sequences deposited in GenBank demonstrate the presence of members of this protein family in trypanosomatids, such as *T. cruzi* and *Leishmania major* [14].

In this work, we studied the E-NTPDases of *L. infantum chagasi*. To study the nucleotidase activity, we compared the natural ecto-nucleotidase activity of the live parasites with the recombinant E-NTPDase named rLicNTPDase-2 of *L. infantum chagasi*. In addition, we investigated the subcellular localization of this protein and evaluated its involvement in macrophage infection and its natural expression in tissues from dogs with canine visceral leishmaniasis. These approaches provided important steps towards the elucidation of the role of this protein in *Leishmania* infection and could open new fields for the rational design of new drugs or other biotechnological applications.

Materials and Methods

Bioinformatics and phylogenetic analyses

Initially, representatives of trypanosomatids ENTPDases from the GenBank database were assessed. These included the following

accession numbers of selected sequences: *Leishmania major* gi68124641 and gi68125368; *L. infantum* gi146079011, gi134068433 (both from JPCM5 strain); *Leishmania braziliensis* gi134059793 and gi134060473; *T. cruzi* giAAS75599.1. These sequences were aligned with representatives of the mammalian ENTPDases using CLC Workbench version 6.9.1. The representatives of the mammalian ENTPDases were selected based on a previous publication [15]. The signal peptides were predicated using SignalP 3.0 and TMAP. The trees and alignments were built with CLC Workbench version 6.9.1.

The phylogenetic analyses of the full length coding regions of the Trypanosomatids ENTPDases (TpNTPDases) were conducted using a Blast search of the *L. infantum* TpNTPDase-1 and TpNTPDase-2 (gi146079011, gi134068433) using NCBI, Tri-TrypDB, KEGG, UniProtKB/Swiss-Prot and OrthoMCL data banks. The sequences were selected with a threshold of 1E-20 for the expectancy value and using the full-length coding region (containing the start methionine, the 5 ACRs and lengths compatible with the known reference enzymes). Redundancy was eliminated using an in-house script. As an out-group we used the *Toxoplasma gondii* NTPDase (Q27895.1). The sequences were aligned using the software MUSCLE v3.8.31 [16], and the alignments were inspected manually by using MEGA 5.2 [17]. The program ProtTest v2.4 [18] was utilized to estimate the best amino acid substitution model (JTT +I +G) [19]. The phylogenetic trees were constructed using the Bayesian inference (BI) method with the software MrBayes v3.1.2 [20] with two chains of a Markov Chain Monte Carlo algorithm (MCMC) and 10 million generations, sampling every 1000 generations. A stationary distribution, analyzed by Tracer software (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>) was achieved after 1 million generations. Then, 10% of the trees were used to produce the consensus tree. The average standard deviations of the split frequencies were 0.003060. The trees were visualized and edited using FigTree v.1.4.0. At the same time, another phylogenetic analysis was performed using the Maximum Likelihood method (ML) based on the JTT substitution model using MEGA5 software. The initial tree(s) for the heuristic search were obtained by the Neighbor-Joining method to generate a matrix of pairwise distances estimated using the JTT +I +G substitution model. A discrete Gamma distribution was used to model the evolutionary rate differences among sites (4 categories (+G, parameter = 3.2088)). Both trees (built by MrBayes and ML methods) showed the same topology. The final tree shown was based on 29 amino acid sequences from the MrBayes method with the addition of bootstrap analysis from ML method. The branch lengths are measured in the number of substitutions per site.

Cloning of rLicNTPDases ectodomain

Clones containing the complete ORF of NTPDase-2 of *Leishmania infantum chagasi* M2682 (AFX98106.1) were produced previously [21]. Briefly, the signal peptide prediction performed using Signal-P [22] showed a probable cleavage site between amino acid residues G31 and F32. TMAP [23] showed a transmembrane segment between the amino acids L17 and L40. From these analyses, the amino acid residue region between L41 and E425 was classified as belonging to the ectodomain. For

Author Summary

Visceral leishmaniasis is a dangerous and important, but neglected, tropical disease that affects millions of people, mainly in underdeveloped and developing countries. Presently, there are no vaccines against Leishmaniasis, and the few drugs with which the disease is treated have low efficacy and high side effects. The pathogenic agent of this disease in the New World is *Leishmania infantum chagasi*. In this work, we studied a protein from this parasite named ENTPDase-2. We expressed it in a bacterial system, purified it and characterized it as a genuine nucleotidase of the ENTPDase family. This protein seems to be localized at the surface of the parasite and in other intracellular locations. ENTPDase seems to facilitate *in vitro* infection because its blockade leads to lower levels of infection of macrophages. In addition, the protein is found in naturally infected dogs. A previous study demonstrated that ENTPDase-2 from *L. infantum chagasi* is a good antigen for immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. We have now studied this protein in greater depth and suggest that it may be a good target for drug development.

PCR-based cloning in the pET21b (+) vector (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), the following primers pairs were designed: 5'-agtagctagcatgctgctctcccca-3' and 5'-agctcgagttccatcttgagcaggaa-3'. The 5' regions flanking the ectodomain (bold) for both primers. The primers have restriction sites for *NheI* and *XhoI* endonucleases (underlined). The PCR product and the vector were digested with the same enzymes and ligated using T4 DNA ligase [24]. *E. coli* DH5 α cells were transformed with the recombinant plasmid by the method of chemical processing. The positive clones were identified by colony PCR, digestion and sequencing with the T7 promoter and terminator. rLicNTPDase-1 (the segment between the amino acid 28 and 677) was cloned in the same manner as Lic-NTPDase-2, using (FW 5'atacatatgaaccgcttcagtcg 3' and RV 5'atctcgagggtaagagagaggag 3') as the primers and the *NdeI* and *XhoI* enzymes.

Recombinant rLicNTPDase-2 heterologous expression and purification

The recombinant plasmid was purified from the DH5 α cells. The construct pET21b/NTPDase-2 was used to transform *E. coli* strain BL21 (DE-3) RIL for protein expression. The confirmed clones were tested for expression in SOC medium. The pre-inoculum was grown overnight in 5 mL of LB medium containing 50 μ g/ml ampicillin. The culture was then transferred to 0.5 L of SOC medium, and the cells grew until the OD₆₀₀ reached 0.6. The induction was triggered with 0.25 mM IPTG and carried out for one hour at 37°C. The induced culture was aliquoted and centrifuged. The pellets of 100 mL aliquots (approximately 0.9 g cells) were stored at -80°C until use. For lysis, 4 mL of lysis buffer (100 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl) plus protease inhibitors (Aprotinin, Leupeptin and pepstatin at 1 μ g/mL) and lysozyme (1 mg/mL) was added to the pellets. After 30 minutes on ice, the sample was sonicated for six cycles of 10 seconds at 20 Hz and centrifuged at 12500 g for 30 minutes. The pellets containing the inclusion bodies were resuspended in 20 mL of wash buffer (50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 2 M urea), followed by another centrifugation step at 12500 g. This step was repeated once more. The remaining pellet, which contained a high concentration of the protein of interest in insoluble inclusion bodies, was dissolved in denaturing buffer (50 mM Tris pH 8.0,

500 mM NaCl, 10 mM imidazole and 8 M urea) and further purified by nickel affinity chromatography on an FPLC Akta Purifier GE. The sample was eluted with buffer containing 50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, and 300 mM imidazole. The eluate was diluted ten times (10x) in refolding buffer (100 mM Tris pH 8.0, 600 mM NaCl, 1 mM GSSG, 2 mM GSH and 33% glycerol) and stored at 4°C. The activity assays were performed 24 hours later.

Determination of protein concentration

The protein concentration was determined using a microplate-based Bradford method [25]. BSA was used for the standard curve. The concentration was confirmed by separation of 1 μ g of BSA and 1 μ g of the isolated protein using 10% SDS-PAGE and comparing the intensity of the bands after staining with Coomassie blue.

Recombinant rLicNTPDase-2 enzymatic activity

The enzyme activity assay was performed by a colorimetric method for the determination of inorganic phosphate (Pi) (malachite green method) [26]. The assay was performed in 50 mM Tris buffer pH 8.0, 50 mM HEPES pH 8.0, and 3 mM MgCl₂ or CaCl₂ (as indicated in the text), 116 mM NaCl, 5.4 mM KCl and 2.5 mM nucleotide. To determine the pH dependence, in addition to the reagents mentioned, the buffer also contained 50 mM MES. The pH was adjusted for each reaction. The reaction was initiated with 1 μ g of protein and incubated for 30 minutes at 37°C until it was stopped with 0.1 M HCl. For the determination of the concentration of free orthophosphate, the colorimetric reagent (0.2% malachite green and 10% ammonium molybdate 1:3, both dissolved in 4 M HCl) was added. The blank reaction contained all reagents except the protein, which was added after stopping the reaction. The experiments using inhibitors were performed with the following concentrations: 300 μ M of ARL, 300 μ M of gadolinium chloride, 100 μ M suramin, 2 mM sodium azide, or 3 μ M of ammonium molybdate. Each inhibitor was used in separate tests.

Anti-rLicNTPDase-2 polyclonal antiserum production and purification

The purified recombinant rLicNTPDase-2 was used to produce a polyclonal antiserum by immunization of a young adult female rabbit, purchased from the Universidade Federal de Viçosa (UFV) rabbit warren. Prior to the immunization, a blood sample was obtained from the ear marginal vein (pre-immune serum). Three immunizations were performed by the intradermal route, using 200 μ g/500 μ L with intervals of 21 and 15 days. The first immunization included an equal volume (500 μ L) of complete Freund's adjuvant (Sigma), and the two subsequent immunizations included incomplete adjuvant. The immune serum was recovered 7 days after the third immunization. The pre-immune serum and immune antiserum were evaluated by dot blotting analysis, which showed recognition of rLicNTPDase-2 up to 1:160,000. Only the immune serum was able to recognize the recombinant rLicNTPDase-2. The total IgG was purified by the caprylic acid method [27].

Parasite culture and growth

L. infantum promastigotes M2682 previously frozen in liquid nitrogen were thawed and seeded in Grace's medium (Sigma Cell Culture) at 25°C. The starter cultures consisted of 1 \times 10⁵ *Leish*/mL in GRACE's medium (pH 6.5) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 2 mM L-

glutamine. The parasites were grown at 25°C for five days until use. The slides were stained with the panoptic stain.

Western blot and SDS-PAGE analyses

Western blot assay and SDS-PAGE were performed as previously described by Russel *et al* [28]. For the Western blot, to recognize the recombinant proteins in the recombinant expression and purification assays, we used the monoclonal antibody anti-hexa-histidine as the primary antibody (GE Healthcare) and, as secondary antibodies, either anti-rabbit-IgG conjugated with FITC Sigma or anti-rabbit-IgG conjugated with peroxidase. A solution of 0.3% BSA was used for blocking. Image acquisition was performed in Phosphoimage (Fujifilm) at 475 nm for FITC staining. The peroxidase activity was detected as chromogenic staining using DAB.

Ecto-NTPDase activity in live parasites

L. infantum chagasi (M2682) were grown in Graces' medium. Parasites from the log phase were washed and suspended in reaction buffer. Ecto-NTPDase activities were measured according to the previous work using *T. cruzi* parasites [14]. Briefly, the hydrolysis of ATP, ADP, AMP, GTP, GDP, UTP and UDP was measured by incubation of live parasites for 1 h at 30°C in reaction buffer (50 mM Hepes-Tris, 116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 5.5 mM D-glucose, 5.0 mM MgCl₂) in presence of 5 mM nucleotide. The reaction was stopped by adding 0.1 M ice-cold HCl and the suspensions were centrifuged. Inorganic phosphate (Pi) was measured in aliquots of the supernatant using the malachite green method [26].

Adhesion assays and infection of J774 macrophages

J774 macrophages were grown in CTCMC medium at 37°C, 5% CO₂. The cells were seeded in 24-well plates, 1 mL containing 1.0×10⁶ cells per well, and were allowed to adhere for 90–120 min. The medium was removed, and the wells were washed twice with sterile PBS to remove the non-adherent cells. To perform the infection, we used 3–5×10⁶ parasites/mL (3 to 5 parasites per macrophage) for 30 minutes (adhesion) or for 3 hours (infection). The parasites were suspended in CTCMC containing 10% FBS, then the wells were washed twice with sterile PBS to remove free parasites. The cultures were maintained at 37°C and 5% CO₂.

Immunolocalization of LicNTPDases in epimastigotes by confocal laser scanning microscopy

Immunolocalization in promastigotes during exponential phase growth was performed by confocal laser scanning microscopy, by methods similar to those previously described [29,30]. The live parasites were washed twice in PBS and allowed to settle onto glass slides coated with 1% poly-lysine. After one wash with PBS, parasites were fixed with PBS containing 4% paraformaldehyde for 10 min. The samples were washed with cold PBS and blocked with 2% BSA/PBS for 30 min following incubation with the purified polyclonal antisera against rLicNTPDase-2 (dilution 1:50) in 2% BSA/PBS for 1 hour at room temperature. The slides were washed in blocking solution and subsequently incubated for 30 min at 37°C with Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (Invitrogen Life Technologies) at a dilution of 1:4000. The glass slides were mounted with Prolong Gold Antifade Reagent (Molecular Probes) and examined by confocal microscopy (Leica, SP5) at the Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto-USP, Ribeirao Preto, SP.

Ultrastructural immunocytochemistry

For transmission electron microscopy analysis, log phase promastigotes were fixed in 4% paraformaldehyde, 1% glutaraldehyde, 5 mM calcium chloride, and 3.7% sucrose in a 100 mM sodium cacodylate buffer (pH 7.2). The samples were gradually dehydrated in alcohol at low temperatures, infiltrated, and finally embedded in LR White resin at 60°C. Ultrathin sections were collected on nickel grids of 300 mesh and incubated for 20 min at room temperature in 50 mM ammonium chloride in PBS at pH 7.2. Next, the sections were incubated in PBS at pH 8.0 containing 1.5% albumin and 0.01% Tween 20 for 20 min at room temperature and then overnight in the presence of purified anti-rLicNTPDase-2 (1:400), this antibody was omitted from the control grids. The grids were washed in PBS and finally incubated with a 1:30 dilution of a secondary 10 nm gold-conjugated goat anti-rabbit IgG for 60 min. The ultrathin sections were contrasted with solutions of 3% uranyl acetate and 0.2% lead citrate. All of the samples were observed and photographed in a transmission electron microscope (Zeiss EM 109) at the Núcleo de Microscopia e Microanálise at Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

Immunohistochemical assays

rLicNTPDase-2 was immunodetected in tissues from naturally infected dogs. Prescapular lymph nodes from 48 dogs previously diagnosed with canine visceral leishmaniasis were collected from Governador Valadares, Minas Gerais, Brazil, an endemic area of Brazil. All procedures and experimental animal protocols were conducted in accordance with Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL/COBEA). The tissues were processed histologically and immunostained using an indirect immunoperoxidase technique. Specifically, the paraplast resin (SIGMA) from the 4.5 μM sections was removed by two passages in xylol for 30 minutes and then hydrated in decreasing alcoholic solutions (100%, 90%, 80% and 70%) for 5 minutes. The endogenous peroxidase was blocked with 3% hydrogen peroxide in methanol for 30 minutes at room temperature. The sections were washed with PBS pH 7.4 and the antigen recovery was carried out with 1 mg/mL trypsin in PBS pH 7.4 for 10 minutes at 37°C. To block the nonspecific binding sites, we incubated the slides with normal goat serum diluted 1:10 in PBS pH 7.4 in a humid chamber for 45 minutes at room temperature. After this, rabbit IgG anti-rLicNTPDase-2 (1:2000) was added for 24 hours at 4°C in the humid chamber. The sections were washed in PBS pH 7.4, and then, the secondary antibody, anti-rabbit IgG produced in Goat-HRP conjugate.(1:10), was added. Finally, the sections were washed in PBS pH 7.4 for 10 minutes and placed immediately into the revealing solution (1 mg of diaminobenzidine, 1 μL of 30v H₂O₂ in 1 mL of PBS pH 7.4) for 5 minutes. After another wash, the sections were counterstained with Harris hematoxylin 1:10 in PBS pH 7.4 for 20 seconds and subsequently dehydrated in alcohol, cleared in xylene and mounted with Entellan between the slide and coverslip. The resulting slides were mounted and observed using a Nikon ECLIPSE E6003 binocular optical microscope.

Ethics statement

The Ministry of Health, through the Brazilian National Health Foundation (FUNASA) and, State and Local Health Departments, performs control of visceral leishmaniasis centered on the reduction of vector density and elimination of infected dogs. The dogs used in this study were from Brazilian program of control visceral leishmaniasis. Dogs were diagnosed with leishmaniasis and sacrificed as provided in the Decree no. 51,838, of March 14,

1963, and in the Resolution No. 1000, of May 11, 2012. According to Brazilian law in this specific situation there is no need for registration by an ethic committee in animal experimentation.

Results/Discussion

Sequence comparisons between trypanosomatids ENTPDases and mammalian E-NTPDases

Mining the *L. infantum* genome (strain JPCM5), we found two putative isoforms of ENTPDases named as guanosine diphosphatase (gi 146079011) and nucleoside diphosphatase or ATP diphosphohydrolase (gi 146081775). These two putative proteins were aligned with those of *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi* and the mammalian E-NTPDases representative of isoforms 1 to 8 from human and mouse (Figure S1). The mammalian ENTPDase representatives were selected according previous work [15]. As shown in figure 1, these ENTPDases form two distinct clades. One of them includes the mammalian ENTPDases 1, 2, 3, 4, 7 and 8 and the other clade includes mammalian ENTPDases 5 and 6 and ENTPDases representative of the trypanosomatids. Due to the higher similarity between the single *T. cruzi* ENTPDase-1 [14] and the *Leishmania* guanosine diphosphatase, we designated this group as trypanosomatids NTPDase-1 (TpNTPDase-1). All analyzed TpNTPDases-1 are predicted to be ~70 kDa proteins and have an additional amino domain absent in other ENTPDases included in this work (Figure S1 and Figure S2). The other branch of the *Leishmania* NTPDases was named trypanosomatid NTPDase-2 (TpENTPDase-2) and includes the *Leishmania* proteins predicted to be ~40 kDa (Figure 1).

Analyzing the amino acid identity between mammalian and trypanosomatid ENTPDases, it is clear that they are very divergent achieving the highest level of identity between *Mus musculus* ENTPDases-5 and *L. braziliensis* TpNTPDases-2 (29.05%). In this analysis, we used the protein sequences of TpNTPDases-1 and TpNTPDases-2 from *Leishmania major*, *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*. The sequences were considered complete if they had approximately 425 amino acid residues for the TpNTPDases-2 or at approximately 670 amino acid residues for the TpNTPDases-1 and if they contained the initial methionine, the stop codon and Apyrase Conserved Regions (ACRs) 1–5, which are the amino acids involved in the catalytic site of these enzymes [29]. Considering the *Leishmania* and *Vannia* complexes [31], the TpNTPDases-2 exhibit ~92% identity between species of the same complex (*L.(L.) major* and *L.(L.) infantum chagasi*) and approximately ~77–79% identity between species from distinct complexes: e.g. *L.(L.) major* or *L.(L.) infantum chagasi* compared with *L.(V.) braziliensis*. The TpNTPDases-1 show ~90% identity between enzymes from the same *Leishmania* complex and 67–69% between species from different complexes.

To expand the trypanosomatid ENTPDase analysis, we searched for TpNTPDases in the protein data banks. Initially, we found 82 TpNTPDases with *e-values* lower than 10^{-20} , although after exclusion of redundant sequences, incomplete sequences or sequences without the 5 ACRs, only 29 sequences used in the next step of the phylogenetic analyses. Considering all amino acids in the primary sequences, we found 850 sequence elements, but only 354 were used in the construction of the tree because the others were found in positions with gaps. The trees were constructed using the Bayesian inference (BI) and Maximum Likelihood (ML) methods, and both resulted in the same topology. These results reinforce the precision of these data. As shown in Figure S2, the TpNTPDases formed two distinct clades: one of

them, clade 1, was related to the TpNTPDases-1 (syn. guanosine diphosphatase at the genome annotation) and the other, clade 2, was related to the TpNTPDases-2 (syn. ATP diphosphohydrolases at the genome annotation). This clade separation presents strong statistical support with a posterior probability (PP) = 100 to BI and bootstrapping value (BV) = 100 to ML for clade 1 and posterior probability (PP) = 99 to BI and bootstrapping value (BV) = 98 to ML for clade 2. It is possible to note that each clade is formed from two groups: one from *Leishmania* genus and another from the *Trypanosoma* genus (statistical support PP = 100 and BV = 100). *T. cruzi* remains as the unique trypanosomatid that has only one TpNTPDase, the NTPDase-1 present in clade 1 (XP_809354.1, AAS75599.1 and EKF98171.1). This expansion of the TpNTPDase molecular analyses could contribute to future studies of these enzymes by the research community.

It is noteworthy that there are differences between the ACRs of TpNTPDases-1 and TpNTPDases-2, even within one isoform in different species (Figure 2). We can hypothesize that these differences could be related to the biochemical differences observed among the ecto-nucleotidase activities of different *Leishmania* species because the ACRs are present in the catalytic sites of these enzymes [10]. It is important to emphasize the necessity to fully evaluate this hypothesis in the future.

Cloning and expression of the soluble domain of rLicNTPDase

As the first step of characterization of the *L. infantum chagasi* NTPDase-2 (rLicNTPDase-2), we amplified and cloned the full coding region of LicNTPDase-2 from M2682 strain in the pGEM vector using the *L. infantum* JPCM5 strain (LiNTPDase) as a reference. Then, we sequenced the rLicNTPDase-2 gene and compared this sequence with the reference strain sequence. The nucleotide identity between these genes is greater than 99.7%. In spite of the low level of divergence between the DNA sequences, the differences in nucleotide sequences reveal one significant non-conserved change in the primary sequence of respective proteins. At position 420, close to ACR5, we found an F in the M2682 strain and an S in the JPCM5 strain (GenBank GIs: JX075891 and 146081774, respectively). We do not have any biochemical data to indicate whether this change could reflect differences in ENTPDase activities of these proteins, but it is reasonable to expect that the ACR5 region has a role in the NTPDase activity in this family [32]. Thus, we believe that the study of this point mutation could be a good focus of future investigations.

The soluble/ecto domain of rLicNTPDase-2 (L41 to E425) was cloned into the bacterial expression vector pET21b (+). The expression was performed in *E. coli* BL21 (DE3) RIL cells. This construct displayed a satisfactory overexpression of the recombinant protein (Figure 3). The recombinant protein was refolded and purified by affinity chromatography, resulting in a unique band protein with the expected molecular weight of 43.96 kDa as visualized by silver staining (Figure 3C). The expression of rLicNTPDase-2 was confirmed by Western blot (Figure 3B and C).

Biochemical characterization of rLicNTPDase-2

Two of the main characteristics of ENTPDases are the ability to use a broad range of nucleotides as substrates and the dependence on divalent cations, mainly calcium or magnesium, as cofactors [33,34]. The first step of the rLicNTPDase-2 biochemical characterization was analysis of the substrate specificity using calcium or magnesium as co-factors. The rLicNTPDase-2 nucleotidase activity was determined using the substrates ATP, ADP, GTP, GDP, UTP and UDP. To rule out the possibility that

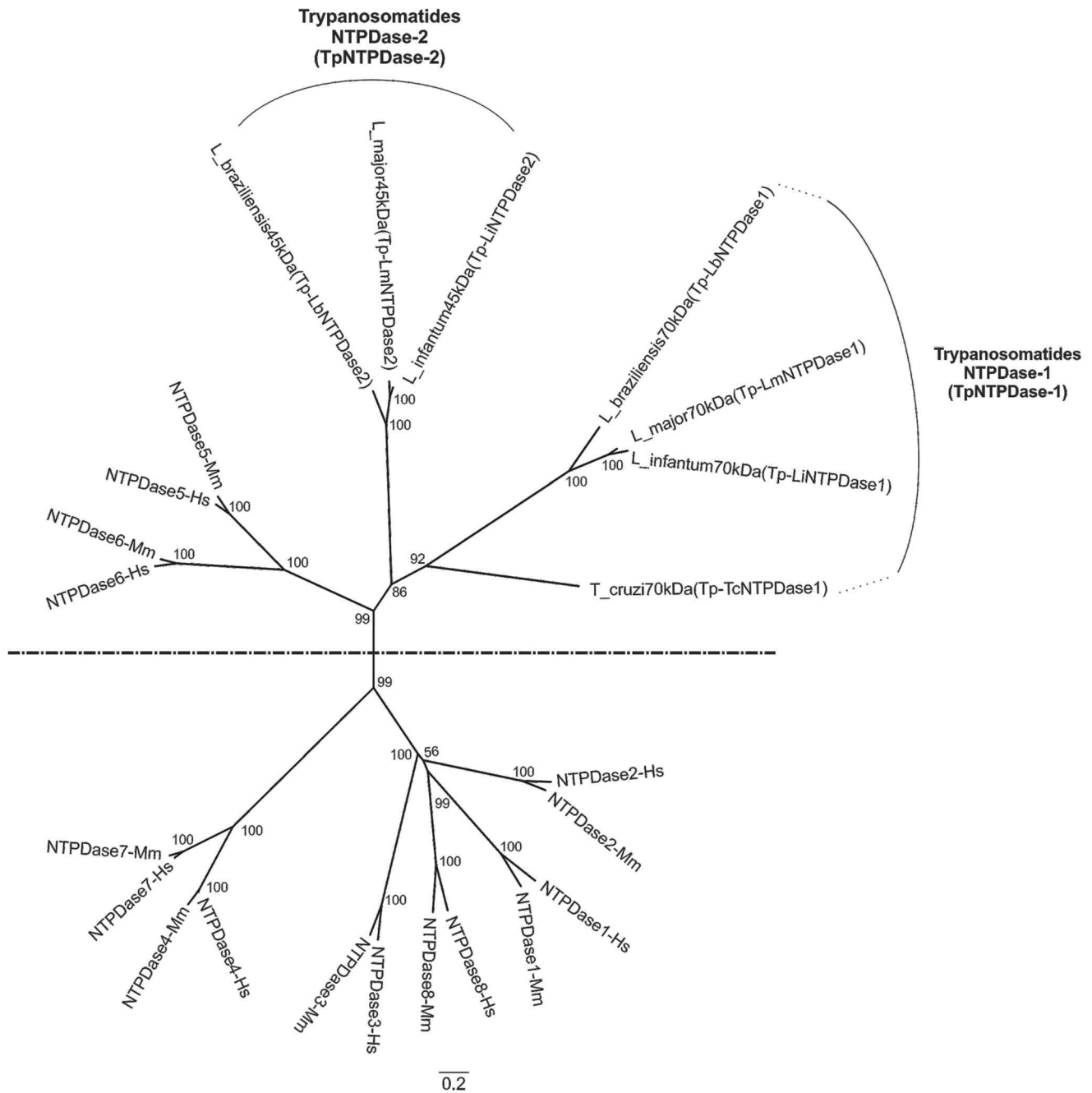


Figure 1. Phylogenetic tree using representatives of the ENTPDases from mammals and Trypanosomatids (*Leishmania* and *T. cruzi*). ENTPDase sequences were aligned by the CLC workbench program and used to construct the phylogenetic tree using the Neighbor Joining method with bootstrap analysis (number in the branches). *Mus musculus* (Mm); *Homo sapiens* (Hs). Trypanosomatids have two ENTPDases with exception of *T. cruzi*, which has only one ENTPDase in databank. Trypanosomatid ENTPDases are more similar to mammalian ENTPDases isoforms 5 and 6 and are grouped at the upper branch of the tree. doi:10.1371/journal.pntd.0003309.g001

the protein preparation contained any phosphatases, an assay performed using p-nitrophenylphosphate (*p*NPP), a substrate of acid and alkaline phosphatases, showed no detectable activity. rLicNTPDase-2 was capable of hydrolyzing all tested triphosphate and diphosphate nucleotides. Under the tested conditions (excess substrate), we observed the highest activity for GTP and the least activity for ATP. The enzyme showed maximum activity between the first and second day after refolding (Figure 4A). Additionally, as shown in Figure 4B, the enzyme did not discriminate between

calcium or magnesium ions as cofactors. To assess whether this promiscuity would depend only on a divalent cation regardless of the ion, we tested other divalent cations as cofactors (nickel and zinc), and both abolished the ATPase activity. Despite the potent rLicNTPDase-2-mediated hydrolysis of GTP, the nucleotides ATP, ADP, UTP and UDP are the most studied due to their important roles in cell signaling processes. We can assume that the hydrolysis of ADP could inhibit the activation of P2Y₁, P2Y₁₂ and P2Y₁₃ [35]. These P2 receptors are involved

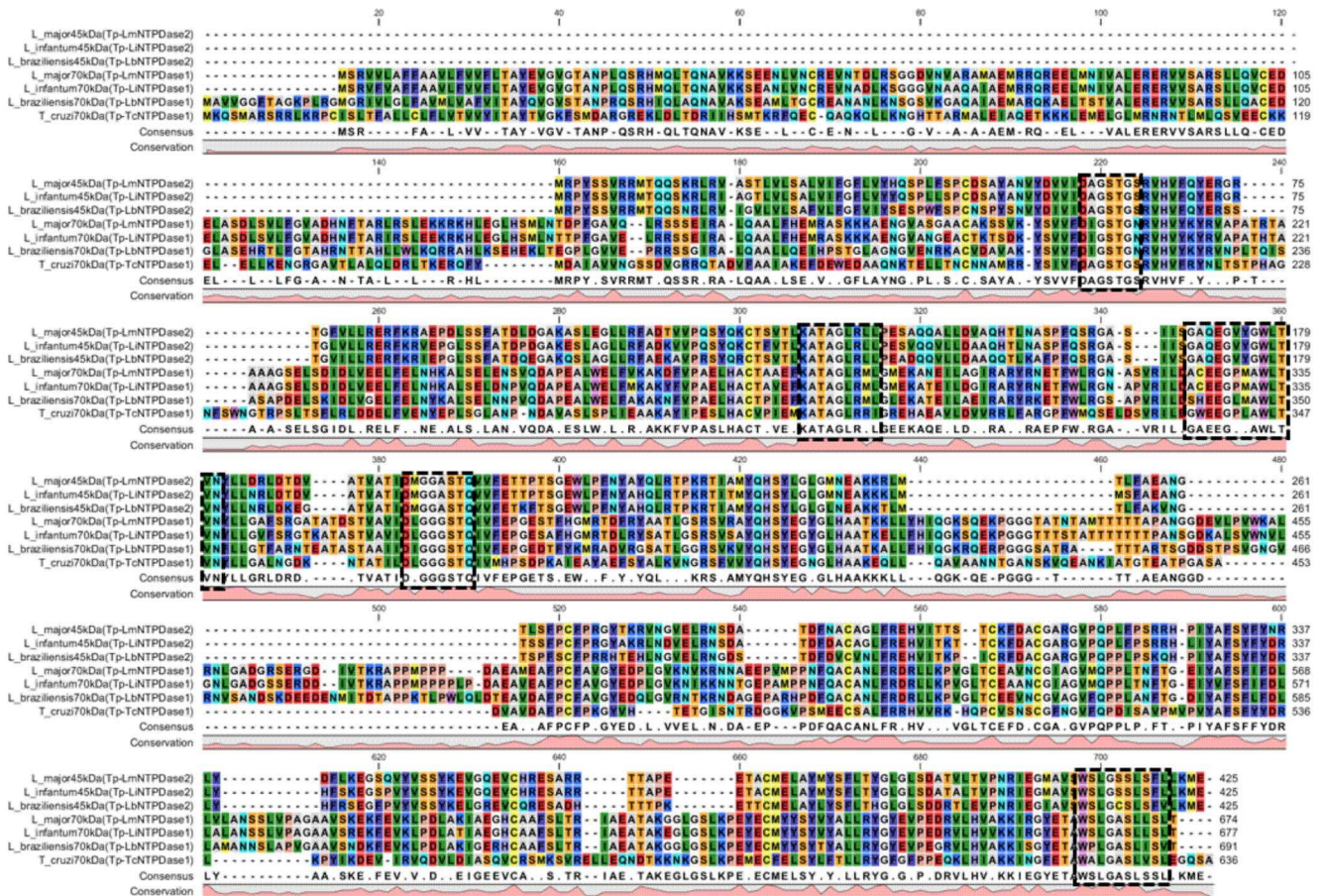


Figure 2. Alignment of representatives of TpNTPDases-1 and TpNTPDases-2. TpNTPDases from *L. infantum* (Li), *L. braziliensis* (Lb), *L. major* (Lm) and *T. cruzi* (Tc) were aligned using the CLC main workbench and manually inspected. The ACRs are shown in dashed line rectangles. The prevalent amino acids are shown in the consensus line and the level of conservation of each position at the primary sequences of proteins is shown in the conservation box.
doi:10.1371/journal.pntd.0003309.g002

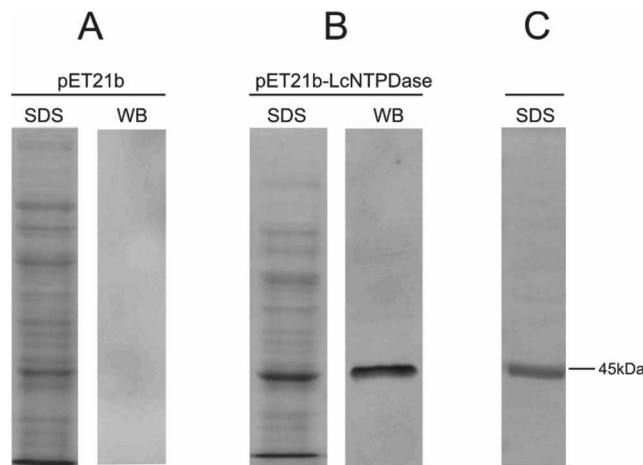


Figure 3. Analyses of expression and purification of rLiNTPDase-2. (A) Protein extract from *E. coli* carrying the empty vector pET21b. (B) Protein extract from *E. coli* carrying the vector pET21b plus rLiNTPDase-2. (C) Purified rLiNTPDase-2 (3 μg) stained by the silver method. SDS lanes indicate samples analyzed after SDS (10%)-PAGE stained with Coomassie blue. WB lanes indicate the same SDS-PAGE samples analyzed by Western blot using anti-His produced in rabbit as primary antibody (1:4000) and anti-rabbit-IgG conjugated with FITC as secondary antibody (1:6000). The nitrocellulose membrane was analyzed using an FLA 5100 (Fujifilm) instrument at 475 nm, with a blue filter.
doi:10.1371/journal.pntd.0003309.g003

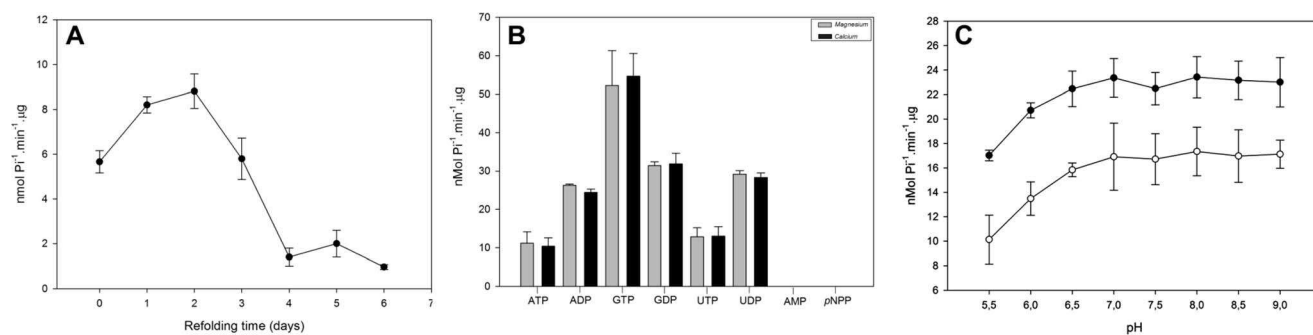


Figure 4. rLic-NTPDase-2: refolding, substrate preference and pH dependence. (A) Refolding assay- the enzymatic activity was measured just after the refolding (zero point) and up to six days later using ADP as the substrate. (B) The preference for different substrates was assessed in the presence of the cofactors calcium (grey bars) or magnesium (black bars). Inset shows the hydrolysis values with SD. (C) ATP (open circles) and ADP (black circles) were used to evaluate enzymatic activity as a function of pH. The pH-dependence test was performed in buffer containing 50 mM MES, 50 mM Tris, 50 mM HEPES, 3 mM MgCl₂, 116 mM NaCl, 5.4 mM KCl and 2.5 mM nucleotide. The SDs represent the those from the average of three independent experiments performed in triplicate. The free phosphate released was measured using the malachite green method. doi:10.1371/journal.pntd.0003309.g004

with the production of the inflammatory mediators TNF- α , IL-1 and IL-2 [35–37]. Furthermore, hydrolysis of ADP would provide a substrate for the ecto-5'-nucleotidase, which could hydrolyze AMP to adenosine. A2 receptors are activated by adenosine, leading to anti-inflammatory effects such as inhibition of the production of TNF- α , IL-6 and IL-8 [37]. The difference in response to experimental infection with *Leishmania* has been attributed to its ability to hydrolyze nucleotides, resulting in decreased production of interferon- γ and TNF by the lymph nodes and reduced proliferation of spleen cells and germinal centers [10]. Therefore, the mechanism of infection of *L. infantum chagasi* could involve facilitation by regulation of inflammation through NTPDases and another ectonucleotidase.

We next studied the influence of pH on the nucleotidase activity of rLicNTPDase-2. To evaluate the influence of pH on the nucleotide hydrolysis by rLicNTPDase-2, we performed enzymatic activity assays with ATP and ADP under different pH conditions, ranging from 5.5 to 9.0, using magnesium as cofactor (Figure 4C). The enzyme activity was not affected by the variation in pH. This

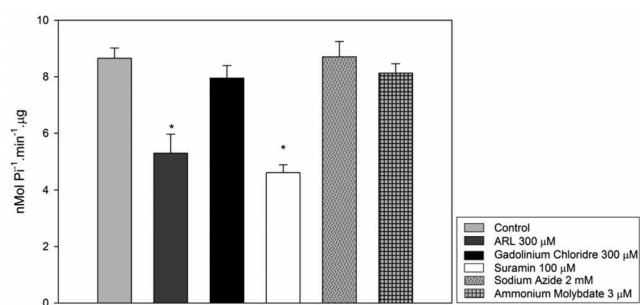


Figure 5. rLicNTPDase-2 ATPase activity in the presence of known partial inhibitors of ENTPDases and a 5'-nucleotidase inhibitor. Purified rLicNTPDase-2 was assayed in the absence of inhibitors (control column) or in the presence of inhibitors: ARL 67156 (ARL) 300 μ M, gadolinium chloride 300 μ M, suramin 100 μ M, sodium azide 2 mM and ammonium molybdate 3 μ M (a 5'-nucleotidase inhibitor). The SDs represent those from the average of three independent experiments performed in triplicate. The free phosphate released was measured using the malachite green method. Statistical analyses were performed using ANOVA, and the significant differences between the control and inhibitors assays are shown with asterisks ($p < 0.05$). doi:10.1371/journal.pntd.0003309.g005

result suggests that this enzyme could be active in different pH environments that occur during the *Leishmania* biological cycle.

Enzymatic activity assays with apyrase inhibitors

To prove that rLicNTPDase is a genuine apyrase, we tested various partial inhibitors of E-NTPDases described in previous works. We used the following agents: ARL 67156 (6-N, N-Diethyl-bc-dibromomethylene-D-adenosine-5-triphosphate), considered to be a selective inhibitor of ecto-ATPase and able to partially inhibit the NTPDase-1 of *T. cruzi* [8,38]; gadolinium, a lanthanide capable of inhibiting the ecto-NTPDase of the electric organ of *Torpedo* [39]; suramin, a naphthylurea polysulfone compound that has been shown to be a partial inhibitor of the ecto-ATPase and the NTPDase-1 of *T. cruzi* [8,40]; sodium azide, a mitochondrial ATPase inhibitor that is also able to partially inhibit the ecto-ATPase of *T. cruzi* [14] and ammonium molybdate, an inhibitor of 5'-nucleotidase and acid phosphatase [41]. ARL 67156 and suramin partially inhibited the enzyme activity, approximately 38.5% and 46.83%, respectively (Figure 5). No significant inhibition was observed using the other tested compounds. On the other hand, a previous study using live promastigotes from *L. infantum* demonstrated a significant inhibition of ecto-ADPase (80%) and ecto-ATPase activity (24%) by sodium azide [42]. This conflicting result may be explained by an action of azide on ecto-nucleotidases or NTPDases other than the isoform named here as LicNTPDase-2. Another possibility is that under the conditions assayed in live parasites, this isoform could be partially inhibited by azide. Regarding the recombinant enzyme NTPDase-1 of *T. cruzi*, the compound that showed the greatest inhibition was 100 μ M suramin (~50%), while 300 μ M gadolinium inhibited only approximately 20% of the activity [8]. These results indicate that despite belonging to the same family and having the five ACR conserved regions, there are differences in the sensitivity of the ENTPDases from different parasites to inhibitors.

Our results shown that rLicNTPDase-2 is truly an apyrase, which has five conserved regions and hydrolyzes tri and diphosphate nucleotides. Under the conditions used, all nucleotides tested were hydrolyzed. Because of the importance of uridine and adenine nucleotides in purinergic signaling and the evidence of the ability of this enzyme to hydrolyze them, we suggest that the enzyme could modulate the host's immune system by decreasing the inflammatory response. Additionally, the NTPDase enzymes

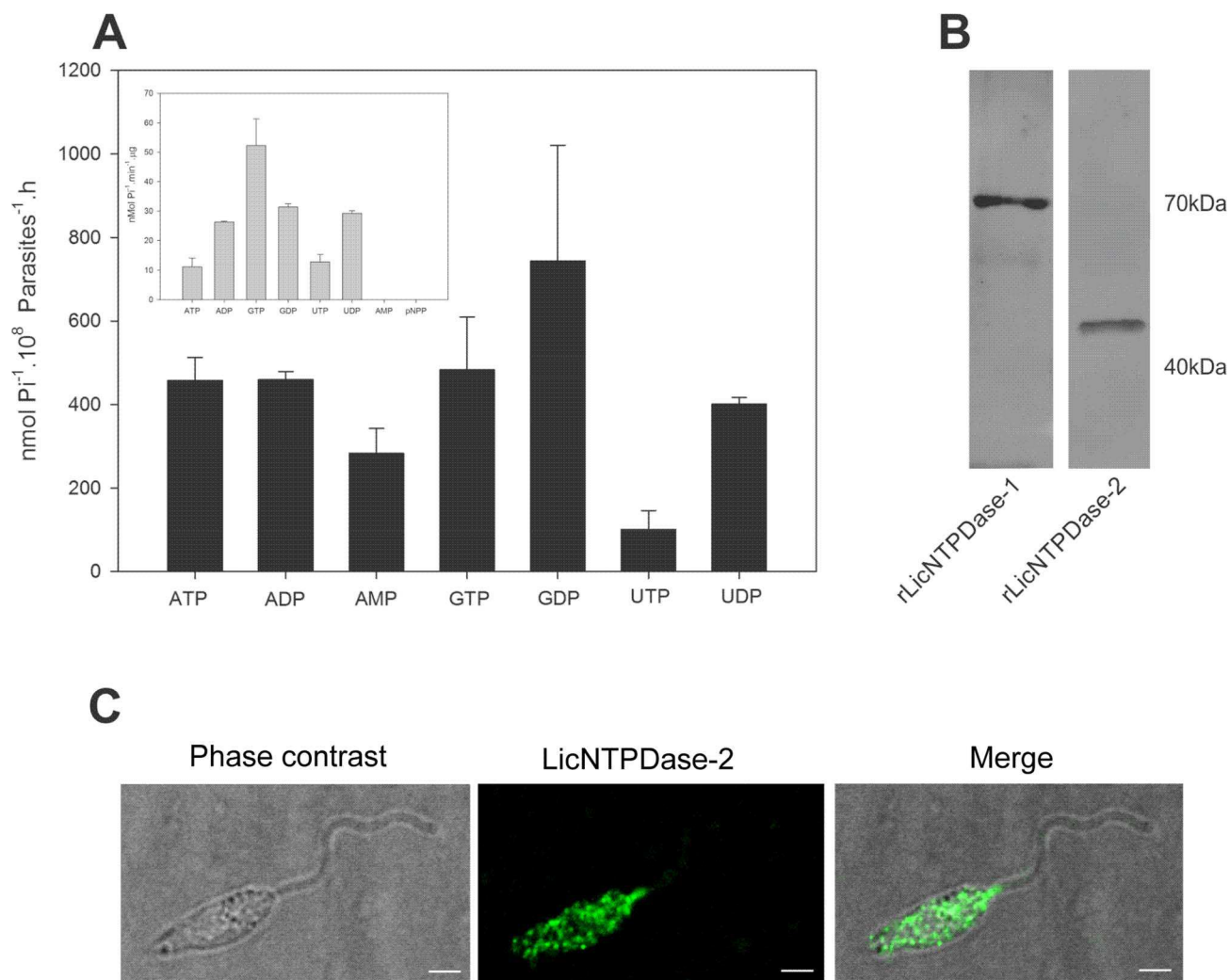


Figure 6. *L. infantum chagasi* promastigote ecto-nucleotidase activity and surface ENTPDase localization using anti-rLicNTPDase-2. (A) The promastigote ecto-nucleotidase activity assays were performed in live total promastigotes from log phase growth using different substrates and Mg²⁺ as cofactor. The activities of recombinant enzyme (rLicNTPDase-2) are shown in the inset box. The SDs represent those of the average of three independent experiments performed in triplicate. The free phosphate released was measured using the malachite green method. (B) Western blotting using anti-rLicNTPDase-2 recognizes both recombinant isoforms rLicNTPDase-1 and rLicNTPDase-2. Purified rLicNTPDase-1 and rLicNTPDase-2 were run in 10% SDS-PAGE and blotted onto a nitrocellulose membrane. The membrane was incubated with purified rabbit polyclonal antibodies to anti-rLicNTPDase-2 (1:100) as the primary antibody and with anti-rabbit IgG conjugated with FITC (1:10,000) as the secondary antibody. (C) Distribution of ENTPDases at the surface of *L. infantum chagasi* promastigotes. Non-permeabilized cells fixed with paraformaldehyde were incubated with anti-rLicNTPDase-2 (1:50) as primary antibody and with Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:400) as secondary antibody. The glass slides were mounted with Prolong Gold Antifade Reagent (Molecular Probes) and examined by confocal microscopy (Leica, SP5). Bar scale = 2 μ m. doi:10.1371/journal.pntd.0003309.g006

have been shown to be important in virulence and replication of trypanosomatids [8,11,14,43–45]. In this context, studies of these proteins may help to develop new approaches to therapy. In particular, the study of the crystal structure could contribute to the rational design of new drugs and in better understanding of enzymatic properties of this protein.

Ecto-nucleotidase activity, expression and localization of rLicNTPDases in *L. infantum chagasi* promastigotes

To evaluate the presence of ecto-nucleotidase activity in *L. infantum chagasi*, we analyzed general ecto-nucleotidase activities directly on live promastigotes. As shown in Figure 6A, the parasites were able to hydrolyze all tested nucleotides (ATP,

ADP, AMP, GTP, GDP, UTP and UDP). The hydrolysis of ATP was similar to ADP, GTP, GDP and UDP. UTPase activity was the lowest ecto-nucleotidase activity observed using this approach. These results indicate that this parasite possesses broad ecto-nucleotidase activity on its surface because no permeabilization was made in this assay. Using another *L. infantum* strain (BH46) and a reaction medium with a different composition, Maia *et al.* [42] found similar results indicating a broad ecto-nucleotidase activity in *L. infantum* promastigotes.

The recombinant enzyme activity was compared with the activity of live promastigotes (Figure 6A-inset). The results indicate a similarity in the broad substrate preference pattern, but differences in the rates of hydrolysis, possibly due to the presence of other ectonucleotidases or of unknown parasite surface

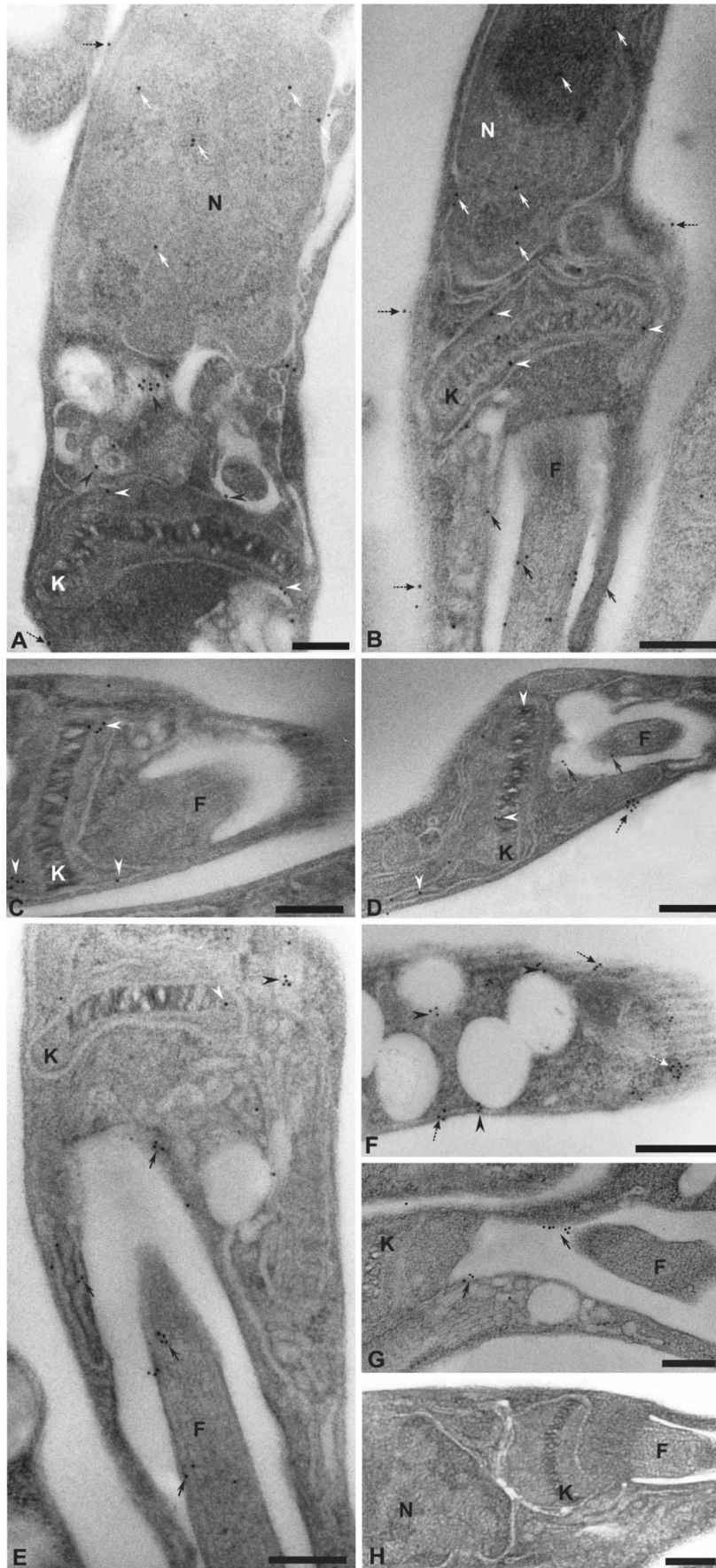


Figure 7. Sub-cellular localization of ENTPDases in *L. infantum chagasi* promastigotes. Electron micrographs using polyclonal antibodies to rLicNTPDase-2 anti-IgG conjugated to 10 nm colloidal gold (A–H). Letters and symbols indicate different localizations: nucleus (N) (white arrow), mitochondria and kinetoplasts (K) (white arrowhead), internal vesicles (black arrowhead), flagellum (F) and flagellar pocket (black arrow) and cell surface (dashed black arrow). No staining was observed in the control (H). Bars: A, C, F, G = 0.1 μm and B = 0.3 μm , C, D and E, H 0.2 μm . doi:10.1371/journal.pntd.0003309.g007

environment factors. The hydrolysis of AMP occurs only in the parasite and is due the action of other ectonucleotidases because the NTPDases are unable to hydrolyze monophosphate nucleosides.

E-NTPDases encoded by *Leishmania major*, *Leishmania infantum*, and *Leishmania braziliensis* have either a predicted N-terminal transmembrane domain suggesting that they may be anchored on the membrane surface of the parasite or an N-terminal signal peptide to be secreted [45]. Then, to determine the localization of these proteins in the surface of the parasite we performed immunofluorescence in non-permeabilized cells using purified antibody against recombinant E-NTPDase. This antibody recognized both recombinant isoforms rLic NTPDase-1 and rLic NTPDase-2 in Western blotting analysis (Figure 6B) and because of this we cannot distinguish between these isoforms in any immunolocalization assays. Confocal microscopy analysis showed that these proteins are localized to the cell body surface, most concentrate at the anterior end of the cell and no fluorescence were observed in the flagella. This pattern distribution is similar to previously shown for NTPDase in *T. cruzi* [30], in *Leishmania (Viannia) braziliensis* [43] and in *Leishmania amazonensis* [46].

The next step in this work was a detailed investigation of the localization of the TpNTPDases by electron microscopy to confirm the presence of ENTPDases on the cell surface, as observed by the ecto-nucleotidase activity (Figure 6A) and confocal data (Figure 6C). Figure 7A–G shows the presence of the protein on the cell surface, nucleus, flagellum and flagellar pocket region. Additionally, the gold particles stained the kinetoplast, mitochondria and internal vesicles. No staining was observed in the control assay (Figure 7H). The intracellular localization profile is similar to recent studies of *L. braziliensis* and *L. amazonensis* promastigotes [43,47] and *T. cruzi* [30]

epimastigotes and reinforces the ubiquitous localization of these proteins and the requirement for further investigations in this area.

Recombinant rLicNTPDase2 influence *L. infantum chagasi* adhesion to and infection of macrophages

Previous work demonstrated a possible participation of the trypanosomatid ENTPDases in host infection. Here, we evaluated the influence of rLicNTPDase-2 and the polyclonal antibodies against this recombinant protein in the adhesion and infection of *L. infantum chagasi* in cultured macrophages. The non-related protein bovine serum albumin (BSA) and pre-immune serum were used as negative controls. When the macrophages were treated with the recombinant enzyme before the addition of parasites, there was a 48.3% reduction of adhesion and 43.91% reduction of infection (Figure 8 A–B). However, parasite proliferation (Figure 8C) was not influenced by any treatments, demonstrating that the effect observed in the adhesion step does not seem to influence the viability of internalized parasites. Taken together, these results suggest the possible existence of binding sites (e.g., receptors) for rLicNTPDase2 in the macrophages that may facilitate adherence and infection. Specifically, by binding to these receptors, the recombinant enzyme would most likely prevent the interaction of the parasite enzyme with the macrophage (Figure 8). However, we cannot exclude other possible explanations as discussed by Mariotini-Moura and co-workers [30]. Anti-rLicNTPDase-2 was also able to significantly reduce the adhesion (48.41% at 1:100 dilution and 40.1% at 1:50 dilution of the hyperimmune serum) and infection (45.4% at 1:100 and 37.7% at 1:50). We can speculate that the antibodies would bind to the parasite rLicNTPDases 1 and/or 2, preventing its interaction with a putative macrophage receptor. However, we cannot ignore other hypothesis such as the presence of unknown molecules that could

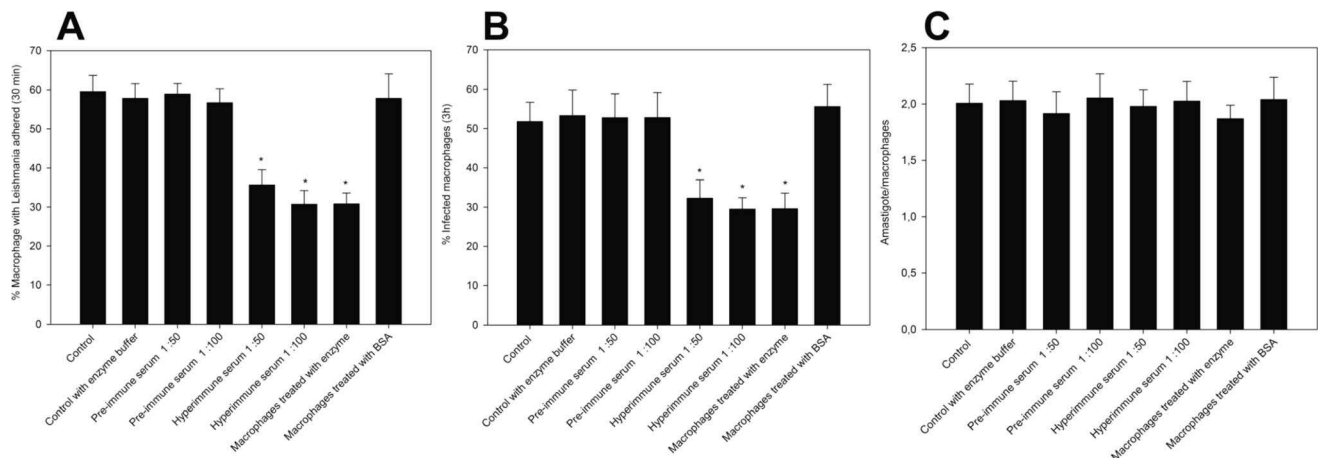


Figure 8. Evaluation of role of LicNTPDases in the infection and adhesion of *L. infantum chagasi* to macrophages. (A) Adhesion of *Leishmania* promastigotes to macrophages. (B) Infection of macrophages by *Leishmania* promastigotes. (C) Treatment did not affect the amount of parasites in macrophages. In all assays (A, B and C): Macrophages treated with polyclonal antiserum anti-rLicNTPDase-2 prior to the infection or with the purified rLicNTPDase-2 before the contact with parasites are compared with macrophages treated with the parasites in the absence of intervention. Control = adhesion and infection assay without any intervention. Control with enzyme buffer = adhesion and infection assay in the presence of the buffer to suspend rLicNTPDase-2. BSA was used as a non-related protein. The data reflect the mean + SE from three analyzed slides from each of three independent assays. The asterisks indicate significant differences ($p < 0.05$) between the control and other samples. doi:10.1371/journal.pntd.0003309.g008

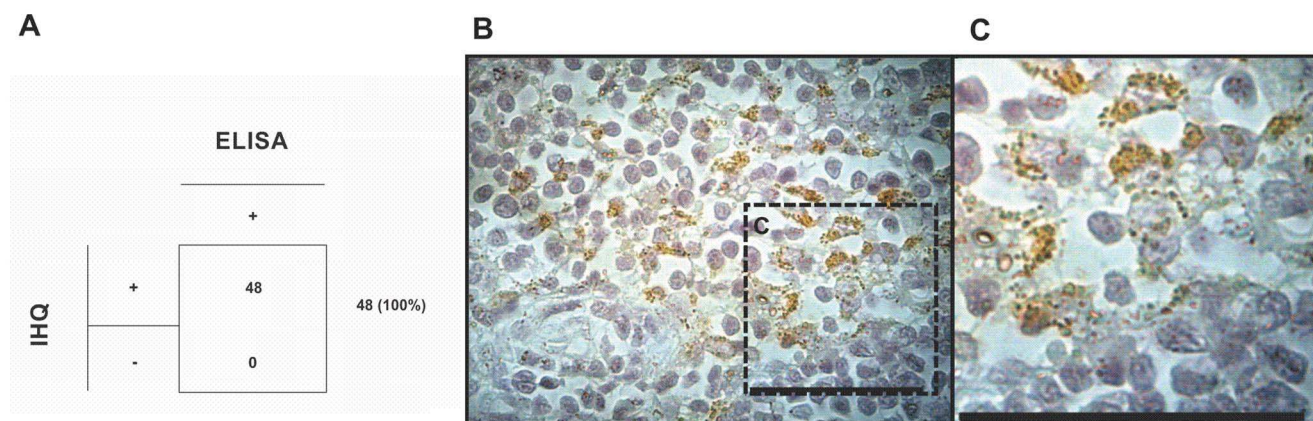


Figure 9. Immunohistochemistry using anti-rLicNTPDase-2 in the lymph nodes of naturally infected dogs. (A) Lymph nodes from 48 *Leishmania*-positive dogs were evaluated by immunohistochemistry (IHC) using anti-rLicNTPDase-2. The results of the IHC are compared with ELISA data of the same samples using a Biomanguinhos Kit. (B) An example of IHC result using polyclonal anti-rLicNTPDase-2. (C) The zoom of section C is from image B.
doi:10.1371/journal.pntd.0003309.g009

interfere with the binding of rLicNTPDase to the host cells. Regardless of the mechanism, this area needs to be further investigated.

rLicNTPDases are expressed in naturally infected dogs

In our previous work, we demonstrated that the recombinant Lic-NTPDase-2 is a good novel antigen for immunological diagnosis of canine visceral leishmaniasis [21]. That work suggested the presence of active *Leishmania* in dogs but only via an indirect method because we used the recombinant protein as a target to measure the levels of specific antibodies in samples of serum from dogs. Here, we directly investigated the presence of amastigotes in naturally infected dogs. *Leishmania* can infect many different organs of mammalian hosts. In this work, we used immunohistochemistry with antibodies against rLic-NTPDase-2 to directly evaluate the expression of LicNTPDases in the lymph nodes of naturally infected dogs (Figure 9). In this approach, 45 samples (95.7%) showed immunoperoxidase staining, directly demonstrating the presence of the recognized antigen in the tissue. These data show for the first time the expression of LicNTPDases in tissues from naturally infected dogs and corroborate previous data from our group that demonstrated the potential application of rLicNTPDase-2 in the diagnosis of canine Leishmaniasis [21].

Conclusions

In this work we expanded the study of ENTPDases from *L. infantum chagasi* (syn. *L. infantum*). The bioinformatics studies shown the presence of two ENTPDase paralogs (named here as NTPDase-1 and NTPDase-2) in kinetoplastids, except for *T. cruzi*, in which only one member of this family (the known NTPDase-1 described previously) was observed [14]. In the context of the low levels of identity with mammalian ENTPDases and the previous knowledge of the *T. cruzi* NTPDase-1, we propose here a new nomenclature for the trypanosomatid ENTPDases: TpNTPDase-1 for the trypanosomatid ENTPDases more similar to *T. cruzi* ENTPDase-1 (~70 kDa proteins) and TpNTPDase-2 for the lower molecular weight isoform (~40 kDa), which is absent from *T. cruzi*.

In addition, a new search for TpNTPDases in the molecular protein databanks demonstrated that trypanosomatids, in general, have the two isoforms of TpNTPDases and that *T. cruzi*

remains as a unique trypanosomatid that possesses only the TpNTPDase-1 isoform.

The biochemical characterization of recombinant Lic-NTPDase-2 shows that it is a genuine nucleotidase/apyrase from the CD39/GDA1 family because the enzyme hydrolyzes a broad spectrum of tri and diphosphate (but not monophosphate) nucleotides, is dependent on divalent cations (Mg^{++} or Ca^{++}) and is partially inhibited by known CD39 family partial inhibitors. In addition, we showed that live *L. infantum chagasi* promastigotes have ecto-nucleotidase activity, and the immunolocalization shows the expected ENTPDases on the surface of promastigotes. However, our results also indicated a broad intracellular expression of the ENTPDases, opening new fields of investigation into other previously unknown biological roles. This point is interesting because we observed the presence of these enzymes in unexpected localizations such as the kinetoplastids, mitochondria and nuclei.

In addition we investigated the role of rLicNTPDase-2 during the adhesion to and infection of host cells, and our results demonstrated that this protein participates in these processes, most likely acting as a facilitator of infection as previously observed for *T. cruzi* infection [9,30]. Furthermore, the importance of ENTPDases in natural infection was indicated by direct detection of their expression in tissues from naturally infected dogs. Taken together, these results reinforce the application of rLicNTPDase-2 in the diagnosis of visceral leishmaniasis as previously described [21] and may suggest that the ENTPDases could be used in other biotechnological applications including drug and vaccine development. Both applications are under investigation in our research group.

The NTPDase enzymes have been shown to be important in virulence and replication of trypanosomatids [8,11,14,43–45]. In this context, research on these proteins may help to develop new approaches to therapy for this disease. In particular, the elucidation of the crystal structure could contribute to the rational design of new drugs and better understanding of how these enzymes participate in the host-pathogen interaction.

Supporting Information

Figure S1 Alignment of the ENTPDases from mammals and Trypanosomatids (*Leishmania* and *T. cruzi*). EN-

TPDase sequences were aligned by the CLC workbench program. The alignment was manually inspected guided by the ACRs pairing. The two putative proteins from *L. infantum* genome were aligned with those of *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi* and the mammalian ENTPDases representative of isoforms 1 to 8 from human and mouse. GeneBank accession numbers: NTPDase1-Hs_gi|1842120|, NTPDase1-Mm_gi|6753346|, NTPDase2-Hs_gi|5114239|, NTPDase2-Mm_gi|36312789|, NTPDase3-Hs_gi|13817037|, NTPDase3-Mm_gi|36312771|, NTPDase4-Hs_gi|3153211|, NTPDase4-Mm_gi|18093090|, NTPDase5-Hs_gi|3335102|, NTPDase5-Mm_gi|5139519|, NTPDase6-Hs_gi|32966069|, NTPDase6-Mm_gi|83921570|, NTPDase7-Hs_gi|9623384|, NTPDase7-Mm_gi|9858131|, NTPDase8-Hs_gi|37813200|, NTPDase8-Mm_gi|35293542|, L_major45 kDa XP_001681917, L_infantum45 kDa L_braziliensis45 kDa XP_001562178, L_major70 kDa XP_001681345, L_infantum70 kDa XP_001463665, L_braziliensis70 kDa gi|XP_001562788, Teruzi70 kDa_gi|45685733|. *Mus musculus* (Mm); *Homo sapiens* (Hs). (TIF)

Figure S2 Phylogenetic analysis performed by Bayesian inference based in 29 amino acid sequences of Trypanosomatids NTPDases (TpNTPDase) proteins. The phylogenetic tree was constructed using the Bayesian inference

(BI) method with the software MrBayes v3.1.2. The values of posteriori probability (PP) were calculated using the best tree, and are expressed in percentages beside of each node. *Bootstrapping* values (BV) are also expressed in percentages below of some node. The BV represent the percentage of trees in which the associated species clustered together in the tree produced by Maximum likelihood method. Species names are represented by the first letter of genus, capitalized, (L to *Leishmania* and T to *Trypanosoma*) followed by name of the species. Strains are underlined and the sequences IDs in bold correspond to the sequences extracted either from the NCBI or TriTrypDB. The outgroup taxon is *Toxoplasma gondii*.

(TIF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RDSV JLRF RFdS FFdC MMAB MRA GCB ASJ LCCA CMM CMdO. Performed the experiments: RDSV CMM RSG TDS RdCF MSeB ACAdS RFdS AdCP FFdC MMAB GATG LBP TEFM CMdO. Analyzed the data: RDSV JLRF TEFM RFdS TDS RSG MMAB LCCA MRA. Contributed reagents/materials/analysis tools: MRA ASJ GCB MMAB LCCA. Wrote the paper: RDSV JLRF CMM RFS MMAB TEFM LCCA GCB ASJ MRA.

References

- Jarvis JN, Lockwood DN (2013) Clinical aspects of visceral leishmaniasis in HIV infection. *Curr Opin Infect Dis* 26: 1–9.
- Stauch A, Duerr HP, Dujardin JC, Vanaerschot M, Sundar S, et al. (2012) Treatment of visceral leishmaniasis: model-based analyses on the spread of antimony-resistant *L. donovani* in Bihar, India. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1973.
- Barrett MP, Gilbert IH (2002) Perspectives for new drugs against trypanosomiasis and leishmaniasis. *Curr Top Med Chem* 2: 471–482.
- Marr JJ, Berens RL, Nelson DJ (1978) Purine metabolism in *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis*. *Biochim Biophys Acta* 544: 360–371.
- Cohn CS, Gottlieb M (1997) The acquisition of purines by trypanosomatids. *Parasitol Today* 13: 231–235.
- Berredo-Pinho M, Peres-Sampaio CE, Chrispim PP, Belmont-Firpo R, Lemos AP, et al. (2001) A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. *Arch Biochem Biophys* 391: 16–24.
- Datta AK, Datta R, Sen B (2008) Antiparasitic chemotherapy: tinkering with the purine salvage pathway. *Adv Exp Med Biol* 625: 116–132.
- Santos RF, Possa MA, Bastos MS, Guedes PM, Almeida MR, et al. (2009) Influence of Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e387.
- Asai T, Miura S, Sibley LD, Okabayashi H, Takeuchi T (1995) Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 270: 11391–11397.
- Maioli TU, Takane E, Arantes RM, Fietto JL, Afonso LC (2004) Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. *Parasitol Res* 94: 207–212.
- de Almeida Marques-da-Silva E, de Oliveira JC, Figueiredo AB, de Souza Lima Junior D, Carneiro CM, et al. (2008) Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. *Microbes Infect* 10: 850–857.
- de Souza MC, de Assis EA, Gomes RS, Marques da Silva Ede A, Melo MN, et al. (2010) The influence of ecto-nucleotidases on *Leishmania amazonensis* infection and immune response in C57B/6 mice. *Acta Trop* 115: 262–269.
- Mizumoto N, Kumamoto T, Robson SC, Sevigny J, Matsue H, et al. (2002) CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat Med* 8: 358–365.
- Fietto JL, DeMarco R, Nascimento IP, Castro IM, Carvalho TM, et al. (2004) Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* 316: 454–460.
- Robson SC, Sevigny J, Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2: 409–430.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32: 1792–1797.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, et al. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731–2739.
- Abascal F, Zardoya R, Posada D (2005) ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21: 2104–2105.
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* 8: 275–282.
- Huelsbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- de Souza RF, Dos Santos YL, de Souza Vasconcellos R, Borges-Pereira L, Caldas IS, et al. (2013) Recombinant *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase NTPDase-2 as a new antigen in canine visceral leishmaniasis diagnosis. *Acta Trop* 125: 60–66.
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340: 783–795.
- Milpetz F, Argos P, Persson B (1995) TMAP: a new email and WWW service for membrane-protein structural predictions. *Trends Biochem Sci* 20: 204–205.
- Sambrook TMEFFJ (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3v: 2231.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
- Ekman P, Jager O (1993) Quantification of subnanomolar amounts of phosphate bound to seryl and threonyl residues in phosphoproteins using alkaline hydrolysis and malachite green. *Anal Biochem* 214: 138–141.
- Chandler JP (2007) *Purification and Characterization of Antibodies. Making and using antibodies: A practical handbook*. Gary C. Howard TJDGI, San Francisco, California, USA; Matthew R. Kaser, editor. New York: CRC Press and Taylor & Francis Group.
- Russel JSDW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1, 2 and 3: 2231.
- Zimmermann H (2001) Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Development Research* 52: 44–56.
- Mariotini-Moura C, Bastos MS, de Castro FF, Trindade ML, de Souza Vasconcellos R, et al. (2014) *Trypanosoma cruzi* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TeNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion. *Acta Trop* 130C: 140–147.
- Rotureau B (2006) Ecology of the leishmania species in the Guianan ecoregion complex. *Am J Trop Med Hyg* 74: 81–96.
- Handa M, Guidotti G (1996) Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun* 218: 916–923.
- Plesner L (1995) Ecto-ATPases: identities and functions. *Int Rev Cytol* 158: 141–214.
- Zimmermann H (1999) Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. *Trends Pharmacol Sci* 20: 231–236.
- Aslam M, Sedding D, Koshty A, Santoso S, Schulz R, et al. (2013) Nucleoside triphosphates inhibit ADP, collagen, and epinephrine-induced platelet aggregation: role of P2Y(1) and P2Y(1)(2) receptors. *Thromb Res* 132: 548–557.
- Burnstock G (2007) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64: 1471–1483.

37. Abbraccio MP, Burnstock G (1998) Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol* 78: 113–145.
38. Crack BE, Pollard CE, Beukers MW, Roberts SM, Hunt SF, et al. (1995) Pharmacological and biochemical analysis of FPL 67156, a novel, selective inhibitor of ecto-ATPase. *Br J Pharmacol* 114: 475–481.
39. Escalada A, Navarro P, Ros E, Aleu J, Solsona C, et al. (2004) Gadolinium inhibition of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity in Torpedo electric organ. *Neurochem Res* 29: 1711–1714.
40. Bisaggio DF, Peres-Sampaio CE, Meyer-Fernandes JR, Souto-Padron T (2003) Ecto-ATPase activity on the surface of *Trypanosoma cruzi* and its possible role in the parasite-host cell interaction. *Parasitol Res* 91: 273–282.
41. Gottlieb M, Dwyer DM (1983) Evidence for distinct 5'- and 3'-nucleotidase activities in the surface membrane fraction of *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 7: 303–317.
42. Maia AC, Porcino GN, Detoni Mde L, Emidio NB, Marconato DG, et al. (2013) An antigenic domain within a catalytically active *Leishmania infantum* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is a target of inhibitory antibodies. *Parasitol Int* 62: 44–52.
43. Porcino GN, Carvalho-Campos C, Maia AC, Detoni ML, Faria-Pinto P, et al. (2012) *Leishmania (Viannia) braziliensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1): localization and in vitro inhibition of promastigotes growth by polyclonal antibodies. *Exp Parasitol* 132: 293–299.
44. Meyer-Fernandes JR, Saad-Nehme J, Peres-Sampaio CE, Belmont-Firpo R, Bisaggio DF, et al. (2004) A Mg-dependent ecto-ATPase is increased in the infective stages of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 93: 41–50.
45. Sansom FM, Robson SC, Hartland EL (2008) Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions. *Microbiol Mol Biol Rev* 72: 765–781, Table of Contents.
46. Pinheiro CM, Martins-Duarte ES, Ferraro RB, Fonseca de Souza AL, Gomes MT, et al. (2006) *Leishmania amazonensis*: Biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. *Exp Parasitol* 114: 16–25.
47. Detoni ML, Fessel MR, Maia AC, Porcino GN, Quellis LR, et al. (2013) An antigenic domain of the *Leishmania amazonensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is associated with disease progression in susceptible infected mice. *Parasitol Res* 112: 2773–2782.