

VICTOR HUGO FERRAZ DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE NTPDases 1 e 2 POR
DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS DE *Leishmania infantum*
chagasi E PRODUÇÃO DE ANTISOROS POLICLONAIS CONTRA
rLicNTPDase2**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

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

T

S586a
2018
Silva, Victor Hugo Ferraz da, 1993-
Avaliação da expressão de NTPDases 1 e 2 por diferentes
formas evolutivas de *Leishmania infantum chagasi* e produção
de antisoros policlonais contra rLicNTPDase2 / Victor Hugo
Ferraz da Silva. – Viçosa, MG, 2018.
x, 83 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Enzimas. 2. Hidrólise. 3. Leishmaniose visceral.
4. Regulação da expressão gênica. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

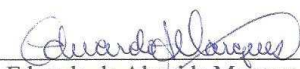
CDD 22. ed. 572.793

VICTOR HUGO FERRAZ DA SILVA

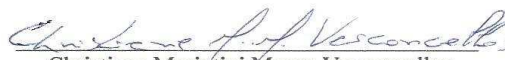
**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE NTPDases 1 e 2 POR
DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS DE *Leishmania infantum*
chagasi E PRODUÇÃO DE ANTISOROS POLICLONAIS CONTRA
rLicNTPDase2**

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

APROVADA: 22 de fevereiro de 2018.



Eduardo de Almeida Marques da Silva



Christiane Mariotini Moura Vasconcellos



Juliana Lopes Rangel Fietto
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Aos meus avós Mario e Suzete pelo exemplo de vida.

A minha mãe e minha madrinha pelo esforço e amor dedicado em minha criação.

Aos meus tios pelo apoio.

A minha noiva pela força e por seu imenso carinho.

A Universidade Federal de Viçosa e ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutal por toda estrutura cedida.

Ao CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro.

A minha orientadora Juliana Lopes Rangel Fietto por ter me aceito, confiado em mim e pela paciência que teve comigo.

Aos Professores Leandro Licursi e Raphael Vasconcellos pela disposição em ajudar sempre que precisei.

A Nancy, Joice, Walmir, Anna e Duda que me ajudaram em diversos momentos durante essa caminhada.

Aos demais colegas do LIMA e LBB pela convivência e experiências compartilhadas ao longo destes 2 anos.

Ao Sr. Valdir e a Dayse pela boa vontade em nos atender.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”
Isaac Newton

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP- Adenosina Difosfato

AMP- Adenosina Monofosfato

ATP- Adenosina Trifosfato

E-NTPDase- Ecto Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase

GTP- Guanina Trifosfato

IL-12- Interleucina 10

IL-2- Interleucina 2

IL-8- Interleucina 8

INF- γ - Interferon Gama

L. i chagasi- Leishmania infantum chagasi

L amazonenses- Leishmania amazonenses

L braziliensis- Leishmania braziliensis

L major- Leishmania major

LicNTPDase1- Ecto Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase 1 de *Leishmania infantum chagasi*

LicNTPDase2- Ecto Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase 2 de *Leishmania infantum chagasi*

LV- Leishmaniose Visceral

NO- Óxido Nítrico

P1- Receptores Purinérgicos Tipo 1

P2- Receptores Purinérgicos Tipo 2

PCR- Reação de Cadeia Polimerase

Pi- Fosfato Inorgânico

qPCR- Reação de Cadeia Polimerase Quantitativa

T cruzi- *Trypanosoma cruzi*

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral

Treg- Célula T Regulatória

UDP- Uracila Difosfato

UTP- Uracila Trifosfato

VNL- Volume Não Ligado

RESUMO

SILVA, Victor Hugo Ferraz da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Avaliação da expressão de NTPDases 1 e 2 por diferentes formas evolutivas de *Leishmania Infantum Chagasi* e produção de anticorpos policlonais contra rLicNTPDase2.** Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto. Coorientadores: Yaro Lucio dos Santos, Raphael de Souza Vasconcellos, Gustavo Costa Bressan e Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

Leishmaniose é o nome dado as enfermidades causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que são capazes de gerar diversos quadros de doenças em seres humanos, dependendo da espécie envolvida na infecção podem ocorrer desde lesões cutâneas localizadas a lesões disseminadas e infecção visceral. No Brasil a leishmaniose visceral (LV) é causada principalmente por *Leishmania infantum chagasi* (syn *Leishmania infantum*). A LV tem os cães e o homem como principais espécies afetadas, é uma doença endêmica ocorrendo principalmente em regiões rurais, mas que vem apresentando tendência a urbanização. Segundo o ministério da saúde entre 1990 e 2016 foram relatados mais de 75000 casos desta doença no Brasil. As ecto-nucleotidases da família E-NTPDase são enzimas capazes de hidrolisar nucleotídeos di e/ou trifostato e atuam em diversos processos relacionados a infeciosidade deste parasito, além de terem potencial para uso em diagnóstico de LV em cães. Duas isoformas são conhecidas em *L. infantum chagasi*, uma maior denominada LicNTPDase1 (~70kDa) e uma menor denominada LicNTPDase2 (~40kDa). Até o momento somente as NTPDases recombinantes de *L. infantum chagasi* foram estudadas. Nosso objetivo foi estudar as enzimas nativas do parasito. Nesse trabalho foram realizadas diferentes abordagens: tentativas de purificar ambas enzimas nativas de promastigotas, avaliação da expressão do mRNA relativos às enzimas em diferentes fases evolutivas do parasito, clonagem e expressão solúvel da região que codifica para o ectodomínio da LicNTPDase2. Constatamos a secreção de uma NTPDase com aproximadamente 70 kDa por formas promastigotas. Análises por RT-qPCR mostraram que a LicNTPDase1 é mais expressa em promastigota de fase logarítmica de crescimento e em condições acidófilas, enquanto a LicNTPDase2 possui maior expressão em amastigota que é uma das formas infecciosas do parasito. Estes dados podem reforçar a participação destas enzimas no desenvolvimento e infeciosidade do parasito. Foi possível expressar a LicNTPDase2 em sua forma solúvel, o que nos ajudará em futuros estudos estruturais, enzimáticos e na produção de anticorpos estruturais contra esta proteína.

ABSTRACT

SILVA, Victor Hugo Ferraz da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Evaluation of the expression of NTPDases 1 and 2 by different evolutionary forms of *Leishmania Infantum Chagasi* and production of polyclonal antiserum against rLicNTPDase2.** Advisor: Juliana Lopes Rangel Fietto. Co-Advisers: Yaro Lucio dos Santos, Raphael de Souza Vasconcellos, Gustavo Costa Bressan and Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

Leishmaniasis is the name given to diseases caused by protozoans of the genus *Leishmania* that are capable of generating several disease states in humans, depending on the *Leishmania* species involved in the infection, can occur from localized skin lesions to disseminated lesions and visceral infection. In Brazil the visceral leishmaniasis (VL) is caused by the species *Leishmania infantum chagasi* and its transmission occurs by the bite of females of the insect *Lutzomyia longipalpis*. VL has dogs and man as main species affected, is an endemic disease occurring mainly in rural regions, but that has been showing a strong tendency to urbanization. According to the Health Ministry between 1990 and 2011, more than 75,000 cases of this disease have been reported in Brazil. The Ecto-nucleotidases from the E-NTPDase family are enzymes capable of hydrolyzing di- and / or triphosphate nucleotides and act in several processes related to the infectivity of this parasite, besides being potential for use in the diagnosis of VL in dogs. Two isoforms of these enzymes are known in *L. infantum chagasi*, LicNTPDase1 (~70kDa) and LicNTPDase2 (~ 40kDa). Until now only the recombinants NTPDases of *L. infantum chagasi* were studied. Thus, our aim was to work with the native enzymes of the parasite. In this work, different approaches were carried out: attempts to purify both native promastigote enzymes, evaluation of the mRNA expression related to the enzymes in different evolutionary stages of the parasite, cloning and soluble expression of the region encoding the ectodomain of LicNTPDase2. Furthermore, we observed the secretion of an NTPDase with approximately 70kDa by promastigote forms. Analyzes by RT-qPCR showed that the LicNTPDase1 is more expressed in log-phase growth promastigotes and in acidophilic conditions, while the LicNTPDase2 has greater expression in amastigote that is one of the infectious forms of the parasite. These data can reinforce the participation of these enzymes in parasite development and infectivity. Moreover, it was possible to express the LicNTPDase2 in its soluble form, which will help us in future structural, enzymatic studies and in the production of structural antibodies against this protein.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Leishmanioses.....	3
2.2. NTPDases e a sinalização purinéica do sistema imune.....	6
2.3. NTPDases de <i>Leishmania</i>	9
CAPÍTULO I: NTPDases de <i>Leishmania infantum chagasi</i>: Um estudo bioquímico e biológico	
3. OBJETIVOS.....	13
3.1. Objetivo Geral.....	13
3.2. Objetivos específicos.....	13
4. METODOLOGIA.....	14
Purificação das Enzimas Nativas do Parasito.....	14
4.1. Produção de resina de afinidade acoplada a LicNTPDase2.....	14
4.2. Purificação de anticorpos anti-NTPDase2 de <i>L. infantum chagasi</i>	14
4.3. Produção de resina de afinidade acoplada a anticorpo anti-LicNTPDase2.....	15
4.4. Cultura dos parasitos in vitro.....	15
4.5. Curva de crescimento de <i>L. infantum chagasi</i>	15
4.6. Obtenção de extrato de <i>L. infantum chagasi</i> para purificação de proteína nativa.....	16
4.7. SDS-PAGE e Western Blotting.....	16
4.8. Obtenção de parasitos de <i>L. infantum chagasi</i> em diferentes fases.....	17
4.9. Avaliação da expressão das NTPDases de <i>L. infantum chagasi</i> por qPCR.....	17
Troca de vetor de expressão heteróloga para retirada de His-Tag.....	19
4.10. Clonagem da LicNTPDase2 em vetor pET28a.....	19
4.11. Expressão da LicNTPDase2 recombinante em <i>E. coli</i>	23
4.12. Purificação dos pellets de indução.....	23
4.13. Teste de Expressão solúvel da LicNTPDase2 recombinante.....	23
4.14. Dosagem de proteínas.....	24
4.15. SDS-PAGE e Western Blotting.....	24

4.16	Produção de Anticorpo contra epítipo linear da LicNTPDase2 recombinante.....	24
4.17	Dot Blot	25
5.	RESULTADOS.....	26
	Purificação Enzimas Nativas do Parasito.....	35
5.1	Teste de Purificação das NTPDases nativas.....	26
5.2	Avaliação da expressão por qPCR das NTPDases nativas de <i>L. infantum chagasi</i>	31
	Clonagem e expressão heteróloga em vetor pet28a.....	33
5.3	Clonagem em vetor pet28a da LicNTPDase2.....	33
5.4	Teste de indução e expressão solúvel da LicNTPDase2 clonada em vetor pET28a.....	38
5.5	Produção de anticorpo contra epítipo linear de LicNTPDase2 recombinante...40	
6.	DISCUSSÃO.....	44
7.	CONCLUSÕES	49
8.	REFERÊNCIAS.....	50
	CAPÍTULO II: Short communication: Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) is secreted by <i>Leishmania infantum chagasi</i> Promastigotes	
1.	INTRODUÇÃO.....	60
2.	METODOLOGIA.....	62
3.	RESULTADOS.....	65
4.	DISCUSSÃO.....	67
5.	CONCLUSÃO.....	69
6.	REFERÊNCIAS.....	70
7.	TABELAS E FIGURAS.....	79

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são enfermidades causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que são capazes de gerar diversos quadros de doenças em seres humanos. Dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção podem ocorrer desde lesões cutâneas localizadas a lesões disseminadas e infecção visceral que pode ser letal (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

A forma visceral se trata de uma doença sistêmica, podendo ser assintomática, moderada ou até mesmo levar a óbito. Os principais sintomas são: febre, hepatoesplenomegalia, perda de peso, tosse, diarreia, dor e distensão abdominal, edemas e ascite. O principal agente etiológico da leishmaniose visceral no novo mundo é *L. infantum chagasi* enquanto no velho mundo este papel cabe a *Leishmania donovani* e *L. infantum* (DANTAS-TORRES et al., 2010; MARZOCHI et al., 2009)

O protozoário é transmitido pela picada de insetos do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo. Os cães são considerados os principais reservatórios de importância epidemiológica do parasito em grandes centros, contribuindo para disseminação da doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017). Existem poucas drogas atualmente disponíveis para tratamento de Leishmanioses, sendo assim, para evitar que cepas de parasitos resistentes a esses medicamentos surjam, estas poucas drogas atualmente disponíveis no Brasil têm seu uso vetado para tratamento animal, a única exceção é a droga Miltefosina que teve recentemente seu uso liberado para cães uma vez que não se trata de uma droga utilizada para o tratamento da doença em humanos no Brasil. Porém, de acordo com o ministério da saúde as evidências científicas coletadas até o momento indicam que o fármaco não apresenta eficácia para ser incorporada no protocolo terapêutico da leishmaniose visceral, sendo a escolha do tratamento cabendo ao proprietário do animal. Assim, mesmo com a possibilidade de tratamento com a droga é recomendável a opção pela eutanásia dos cães infectados (MINISTÉRIO DA SAÚDE; MINISTÉRIO DE AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2016).

O tratamento para a doença ainda é extremamente dependente do uso de quimioterápicos, as drogas mais utilizadas são os antimoniais pentavalentes, anfotericina B, anfotericina B lipossomal e paramomicina. Porém estas drogas

possuem problemas de sua utilização como a alta toxicidade para o organismo, alto custo, via de administração (infusão intravenosa) e longo tempo de tratamento que muitas vezes leva ao abandono do mesmo por parte do paciente e desenvolvimento de resistência do parasito ao fármaco (ANSARI et al., 2017; DAS et al., 2012; GERSHKOVICH et al., 2009).

O surgimento de novas alternativas de tratamento, diagnóstico e prevenção partem da compreensão dos mecanismos envolvidos na infecção assim como do estudo de moléculas alvo como proteínas e fatores de virulência importantes para o estabelecimento da infecção. Desse modo, estudos realizados por nosso grupo de pesquisa e colaboradores acerca das Ecto Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases (E-NTPDases) de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania*, mostraram que estas enzimas participam da adesão à célula hospedeira, da virulência e até da modulação do sistema imune do hospedeiro, sugerindo-as como bons alvos para aplicações biotecnológicas como desenvolvimento de novas drogas alvo específicas, diagnóstico e vacina (FIETTO et al., 2004; GOMES et al., 2015; MARIOTINI-MOURA et al., 2014; SANTOS et al., 2009; VASCONCELLOS et al., 2014).

L. infantum chagasi possui duas ENTPDases: uma isoforma maior de massa molecular próxima a 70kDa denominada por nós de LicNTPDase1 e a segunda isoforma com massa molecular próxima de 40kDa denominada LicNTPDase2. Estas duas enzimas tem se mostrado importantes para a infecção como por exemplo na adesão à célula hospedeira e alteração da concentração de nucleotídeos extracelulares, este trabalho visa dar continuidade aos estudos já realizados com essas enzimas voltando sua atenção agora para as enzimas nativas do parasito, visto que quase todas as informações específicas deste tema usam as enzimas recombinantes expressas em bactéria como modelo de estudo (BASTOS, 2014, 2011; GOMES et al., 2015; VASCONCELLOS, 2010, 2014; VASCONCELLOS et al., 2014).

Portanto, os objetivos do presente trabalho consistiram na purificação, determinação da localização celular e avaliação da secreção das proteínas nativas LicNTPDase1 e LicNTPDase2, além da troca do vetor de expressão heteróloga da NTPDase2 para um vetor com possibilidade de retirada da cauda de histidina (HIS-Tag), visando estudos estruturais e produção de anticorpos específicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leishmanioses

As Leishmanioses compõem o grupo das doenças mais negligenciadas em todo o mundo, com essa doença afetando principalmente a população pobre em países emergentes. Dados da Organização Mundial da Saúde (2017) indicam que cerca de 1,3 milhões de novos casos de Leishmaniose ocorrem a cada ano, com distribuição abrangendo principalmente países da África, Ásia e América Latina. Destes 300.000 casos são relativos à forma visceral.

A transmissão ocorre através da picada de fêmeas de espécies de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* e *Phlebotomus* infectadas. São conhecidas aproximadamente 600 espécies de flebotomíneos, porém, apenas 10% destas espécies agem como vetores para as diferentes espécies de *Leishmania* sendo que apenas 30 espécies possuem importância para a saúde pública (SHARMA; SINGH, 2008).

De maneira resumida o gênero *Leishmania* apresenta duas formas principais, uma promastigota flagelada encontrada nas porções anteriores do trato digestivo do hospedeiro invertebrado e outra amastigota intracelular encontrada em macrófagos após internalização do promastigota pela célula. O parasito apresenta ciclo de vida heteroxênico com um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado. Seus hospedeiros vertebrados são mamíferos e répteis, afetando principalmente, roedores, lagartos, canídeos e humanos (KAMHAWI, 2006).

Nos continentes Africano, Europeu e Americano a transmissão do parasito tem caráter zoonótico sendo passado do animal para o flebotomíneo e deste para o humano, com os cães agindo como principal reservatório (ORGANIZAÇÃO MUNDIA DE SAÚDE, 2017).

Um flebotomíneo não infectado se contamina ao fazer o repasto sanguíneo ingerindo macrófagos com amastigotas, o parasito então se aloja no intestino do flebotomíneo e a partir daí começa uma série de estágios de desenvolvimentos específicos. O homem pode se contaminar através da inoculação de formas promastigotas metacíclicas feita pelo flebotomíneo durante o repasto sanguíneo. Estes promastigotas então podem infectar neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e monócitos. É no interior de células fagocitárias que a diferenciação em amastigota ocorre, assim como a divisão celular do parasito que culmina com a lise do macrófago e liberação de novos amastigotas possibilitando a infecção de novas células ou do

inseto vetor, o que leva a manutenção do ciclo biológico do parasito conforme demonstrado na figura 1 (LAINSON; SHAW, 1988; LÓPEZ et al., 1996).

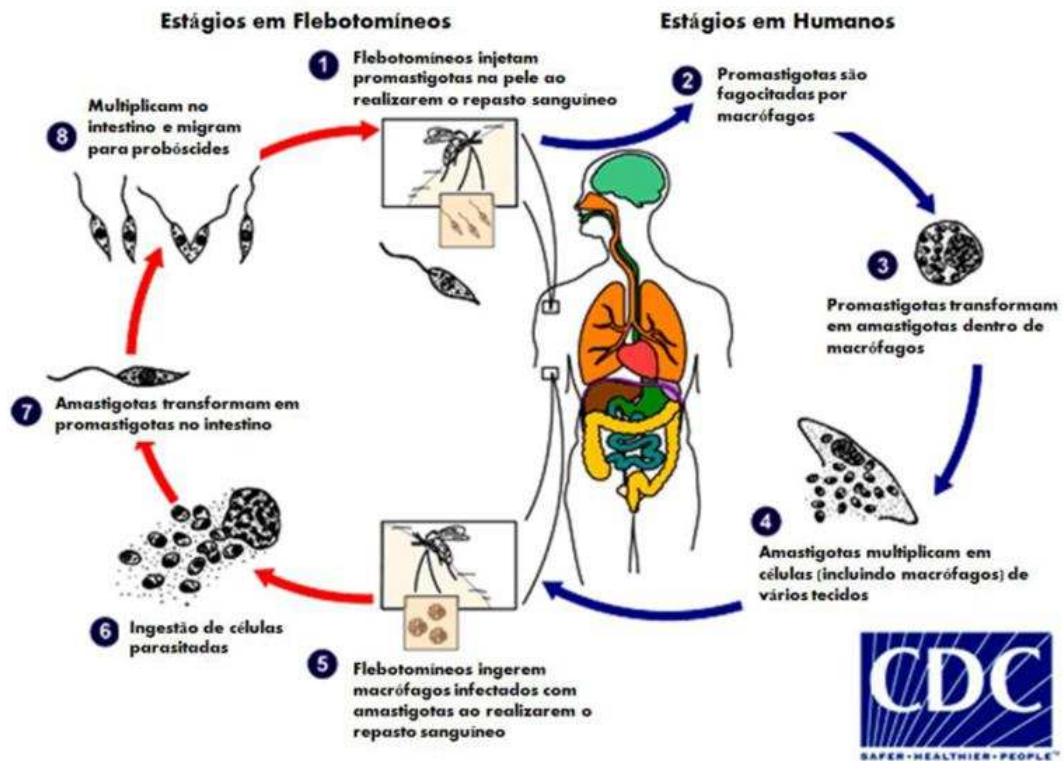


Figura 1: Ciclo de vida de *Leishmania sp.* (CDC, 2010)

L. infantum chagasi é a principal espécie responsável por casos de Leishmaniose Visceral (LV) no Novo Mundo sendo etiológicamente diferente de *L. donovani*, causadora da doença no Velho Mundo (ROMERO; BOELAERT, 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017). Estas espécies possuem características que levam ao desenvolvimento da forma visceral da doença como: resistência a maiores temperaturas, preferência por órgãos viscerais, fatores genéticos e outras diferenças na interação vetor-hospedeiro (GOTO; PRIANTI, 2009).

No Brasil a LV, também conhecida como kala-azar, é uma zoonose transmitida principalmente pelo inseto *Lutzomya longipalpis*, tendo cães e o homem como principais espécies afetadas. É uma doença endêmica ocorrendo principalmente em regiões rurais, mas que nos últimos anos alcançou os grandes centros se tornando uma doença urbana (QUEIROZ; ALVES; CORREIA, 2004; SANTANA et al., 2015). A LV é uma doença sistêmica, podendo variar desde infecções assintomáticas ao desenvolvimento de sintomas moderados ou transitórios como diarreia, tosse seca,

fraqueza muscular e discreta hepatoesplenomegalia. A manifestação clássica da doença que quando não tratada pode levar ao óbito envolve: febre, hepatoesplenomegalia com esplenomegalia acentuada, perda de peso, tosse, diarreia, dor e distensão abdominal. Durante a última fase da doença pacientes podem desenvolver edemas e ascite, icterícia e doença renal (QUEIROZ; ALVES; CORREIA, 2004).

De acordo com o ministério da saúde (2016), no Brasil, ocorrem mais de 3000 casos de LV em seres humanos ao ano em todo território brasileiro e esse número vem crescendo nas últimas décadas, sendo a região nordeste a mais afetada. Ainda segundo o ministério da saúde entre 1990 e 2016 foram relatados mais de 75000 casos de LV no Brasil e um total de 3955 óbitos em decorrência desta doença no mesmo período. Porém estes números são ainda subestimados visto que muitos casos não são reportados e não existem inquéritos epidemiológicos regulares e distribuídos por todo o país.

O tratamento para LV atualmente se baseia na quimioterapia por administração intravenosa de antimoniais pentavalentes, amidinas e algumas classes de antibióticos porém, estas drogas são conhecidas pela elevada toxicidade para o paciente infectado (ANSARI et al., 2017).

O diagnóstico precoce da LV tende a facilitar o tratamento da doença, todavia os métodos de diagnósticos disponíveis se baseiam principalmente na observação direta do parasito em amostras coletadas dos pacientes, sendo este método de baixa sensibilidade e altamente invasivo. Outro teste empregado se baseia na técnica de reação de cadeia polimerase (PCR) para detecção de DNA do parasito e possui alta especificidade, mas peca pelo alto custo. A detecção de anticorpos contra epítomos do parasito no soro de pacientes pode ser empregado como uma alternativa mais barata, porém os testes disponíveis enfretam problemas de baixa especificidade e/ou sensibilidade devido principalmente ao antígeno utilizado (Revisto por DUARTE et al., 2016). As ecto-nucleotidases da família E-NTPDase de *Leishmania* tem demonstrado potencial para serem utilizadas no diagnóstico desta doença e serão melhor discutidas nas seções abaixo (DE SOUZA et al., 2013; VASCONCELLOS, 2014).

2.2 NTPDases e sinalização purinérgica do sistema imune

As ecto-nucleotidases da família E-NTPDase, também chamadas de NTPDases ou apyrases da família do CD39, são enzimas dependentes de cátions divalentes, capazes de hidrolisar nucleotídeos di e tri-fosfatados em nucleosídeos monofosfatados. Em mamíferos estão presentes em todos os tecidos, além de serem encontradas em invertebrados, plantas, leveduras, protozoários e ao menos em uma bactéria (SANSOM et al., 2007; ZIMMERMANN, 2000).

As enzimas desta família podem ser distinguidas de outras ectoenzimas que hidrolisam ATP pelo produto da reação que elas liberam: E-NTPDases liberam ADP e/ou AMP e fosfato (Pi), ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase liberam AMP e pirofosfato (PPi), ecto-fosfatase alcalinas liberam Adenosina e Pi, Além disso as E-NTPDases podem ser distinguidas das ecto-5'-nucleotidases uma vez que estas liberam adenosina e Pi a partir do AMP mas não hidrolisam ATP e nem ADP e as E-NTPDases não hidrolisam AMP (figura 2) (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006).

E-NTPDase family

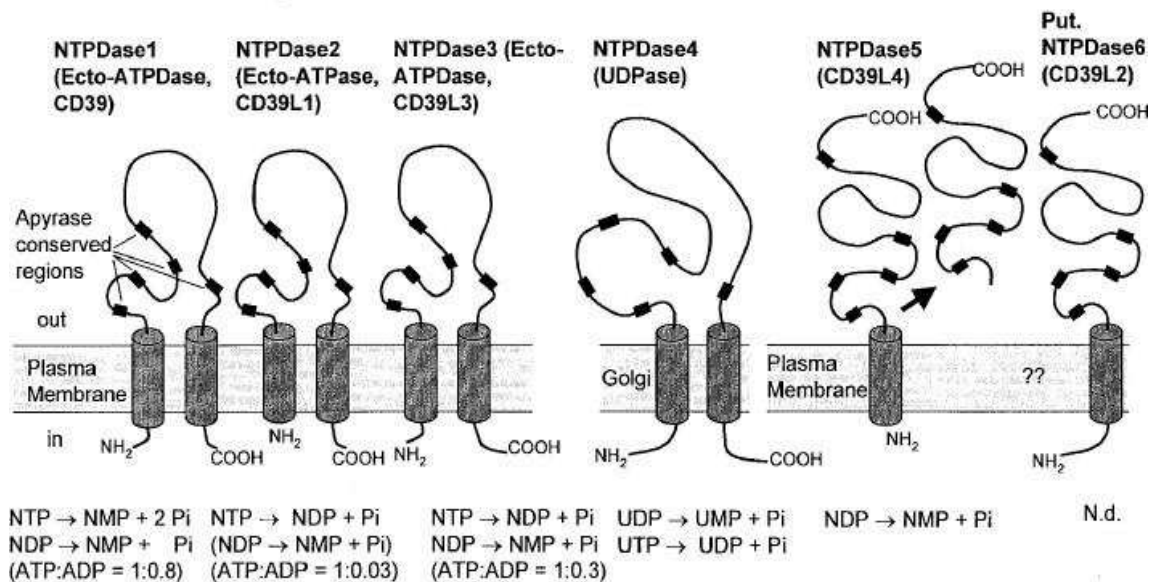


Figura 2: Membros da família E- NTPDase, a figura demonstra a localização na membrana predita e suas propriedades catalíticas das NTPDases. Estas enzimas podem ocorrer em única ou dupla passagem pela membrana ou na forma solúvel (seta). Nomes previamente usados estão em parênteses (modificados de Zimmermann, 1996). Fonte: Zimmermann, 2000, adaptado.

A E-NTPDase mais estudada atualmente é a CD39 de mamíferos (NTPDase-1), presente em várias células, incluindo células do sistema imune como: NK,

monócitos e células dendríticas, além de ser um importante fator de ativação de linfócitos. Atualmente já foram descritas 8 diferentes isoformas de NTPDases em mamíferos que são separadas de acordo com características próprias, como localização celular: secretadas na forma solúvel ou se possui uma ou duas regiões transmembranas (BIGONNESSE et al., 2004; IVANENKOV; MELLER; KIRLEY, 2005; KUKULSKI et al., 2005; MURPHY-PIEDMONTE; CRAWFORD; KIRLEY, 2005; MURPHY; IVANENKOV; KIRLEY, 2003; O'KEEFFE et al., 2010; SANSOM; ROBSON; HARTLAND, 2008; WANG; GUIDOTTI, 1996; ZEBISCH; STRÄTER, 2007; ZIMMERMANN, 2000).

Entre as funções das NTPDases está a regulação da concentração de nucleotídeos extracelulares (NTPe) participando na sinalização purinérgica, adesão celular, reciclagem de purinas, regulação da homeostase vascular além de atuar como receptor em diversas células (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012). Em relação à regulação da concentração de NTPe, sabe-se da participação das NTPDases em associação com a enzima 5' ectonucleotidase. As NTPDases atuam convertendo nucleotídeos ATP e ADP em AMP que irá servir como substrato para geração de adenosina pela 5' ectonucleotidase (DEAGLIO et al., 2007).

Diversos trabalhos vêm demonstrando o papel das ectonucleotidases e nucleotídeos extracelulares na promoção de respostas celulares, por exemplo: células linfocitárias expressam uma série de receptores de ATP e outros nucleotídeos, denominados purinoreceptores que são necessários por exemplo para a secreção de algumas citocinas inflamatórias como IL-2 e $INF\gamma$. Além disso, a migração de neutrófilos induzida por IL-8 é potencializada na presença de ATP (CEKIC; LINDEN, 2016). Por outro lado, a adenosina ao interagir com receptores purinérgicos do tipo 1, contribui para a anergia de células T reguladoras e na supressão da resposta imune em outros tipos de linfócitos T (DEAGLIO et al., 2007).

Dependendo de suas concentrações tanto ATP quanto outros nucleotídeos tri e difosfatados (como UTP, UDP e ADP), bem como adenosina podem se ligar a um ou mais tipos e subtipos de receptores purinérgicos, conduzindo, dessa maneira a diferentes respostas fisiológicas o que torna essas moléculas importantes mediadoras da resposta imune (CUNHA, 2010).

Os purinoreceptores são proteínas integrais de membrana que ao reconhecerem seu ligante desencadeiam uma série de sinais para o interior da célula culminando em diferentes respostas celulares. Destes receptores quatro são receptores acoplados a

proteína G ligantes de adenosina e denominados receptores P1 e são subdivididos em A1, A2A, A2B e A3, enquanto os receptores P2 são divididos em dois grupos: os tipo canal (P2X) e os acoplados a proteína G (P2Y) (figura 3) (LAZAROWSKI, 2003; ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006).

A sinalização purinérgica no sistema imune geralmente ocorre após algum dano tecidual e pode ser dividida em três distintas fases (Figura 3): a fase aguda pode durar de minutos a horas e ocorre quando células entram em processo de morte celular ou sofrem lise devido a danos ou mudanças na pressão osmótica e então liberam ATP no ambiente extracelular, células estressadas também contribuem liberando ATP no meio extracelular através de canais de conexina, panexina e receptor/poro P2X7R.

O acúmulo de ATP extracelular tem papel quimiostático e excitatório sobre células do sistema imune além de atuar ativando receptores P2X e P2Y em células T que promovem ativação de macrófagos e células dendríticas.

A segunda fase denominada subaguda se caracteriza por durar de horas a dias e é onde ocorre diminuição do processo inflamatório devido a queda nos níveis de ATP extracelular e aumento nos níveis de adenosina e consequente ativação de receptores A2A e A2B.

Isto ocorre principalmente pelo aumento na produção de ectonucleotidases que hidrolisam ATP, ADP e AMP em adenosina e pela chegada no local da inflamação de novas células contendo essas enzimas como as células T regulatórias (Treg). Por fim ocorre o estágio crônico que dura até semanas caracterizado por baixas quantidades extracelular tanto de ATP quanto adenosina e início do processo de reparo tecidual (CEKIC; LINDEN, 2016).

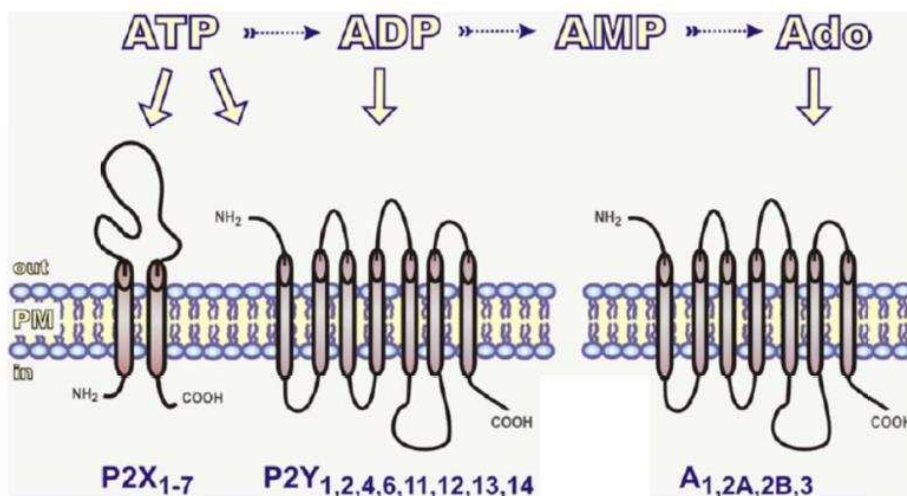


Figura 3: Receptores purinérgicos e seus ligantes (Yegutkin, 2008). A imagem mostra os tipos de receptores purinérgicos e suas moléculas ativadoras

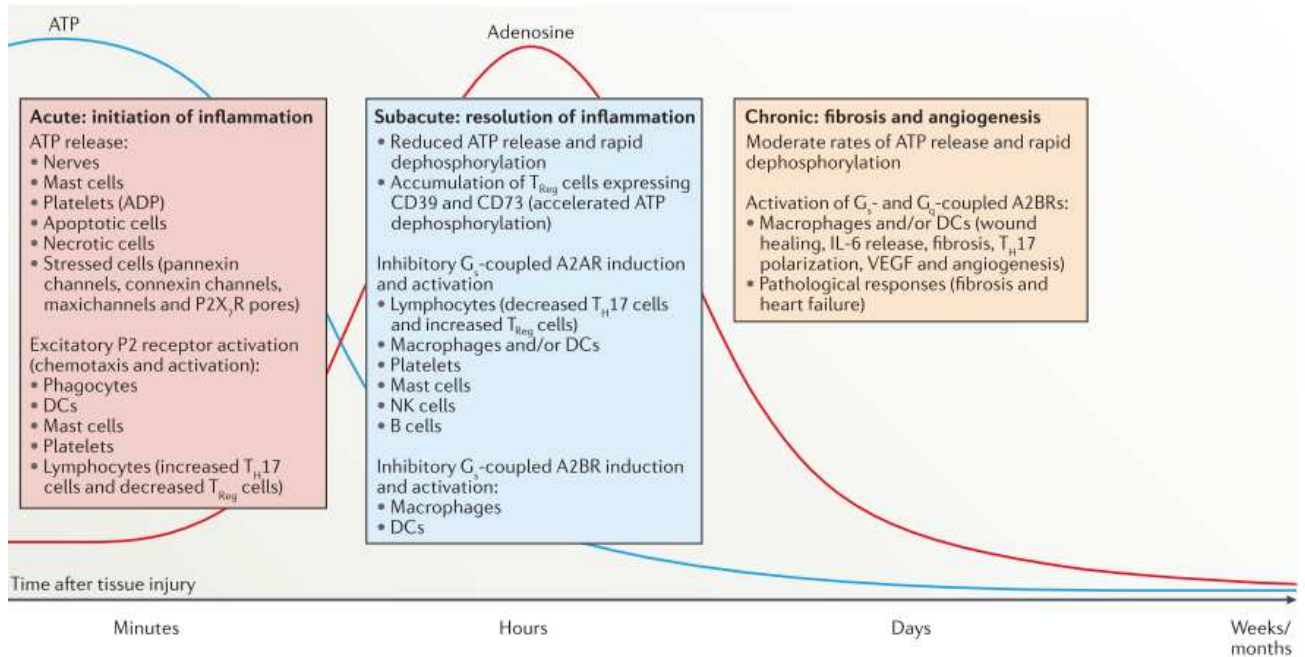


Figura 4: Fases da sinalização purinérgica ao longo do tempo após danos tecidual. (CEKIC; LINDEN, 2016)

2.3 NTPDases de Leishmania

Patógenos como *Toxoplasma gondii*, *Neosporium caninum*, *Schistosoma mansoni*, *Sarcocystis neurona*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi* e diferentes espécies de *Leishmania* apresentam atividade ecto-nucleotidásica característica das NTPDases em sua superfície. Em *Leishmania* já foram identificados duas isoformas: NTPDase1 (similar a NTPDase1 encontrada em *T. cruzi*, contendo cerca de 70 kDa) e NTPDase2 com aproximadamente 40kDa (BASTOS, 2014; GOMES et al., 2015; SANSOM et al., 2014; VASCONCELLOS et al., 2014). As NTPDases de tripanosomatídeos e mamíferos possuem baixa similaridade entre si, sendo menor que 20%. O mesmo ocorrendo entre as diferentes isoformas 1 e 2 dos próprios tripanosomatídeos. Já entre as NTPDases de mesma isoforma em diferentes espécies estas conservam até 80% de identidade de sequência. Estes dados demonstram que as isoformas podem possuir papéis biológicos diferentes (VASCONCELLOS et al., 2014).

As NTPDases possuem papel importante na modulação de respostas relacionadas à nucleotídeos em mamíferos. Em *Leishmania* nosso grupo de pesquisa e colaboradores demonstraram o papel das NTPDases em diversos processos relacionados a infeciosidade deste parasito como: participação na adesão à célula

hospedeira, modulação do sistema imune do hospedeiro ao controlar a concentração de nucleotídeos extracelulares e modulação da ativação de macrófagos (FIETTO et al., 2004; GOMES et al., 2015; VASCONCELLOS et al., 2014).

MARQUES-DA-SILVA et al., (2008) mostrou que a espécie *L. amazonensis* mais virulenta hidrolizava uma quantidade maior de nucleotídeos extracelulares quando comparada com outras duas espécies (*L. braziliensis* e *L. major*) com menor virulência e que este aumento na taxa de hidrólise estava relacionado a um aumento na expressão de uma NTPDase2 localizada na membrana plasmática de *L. amazonensis*. O autor ainda demonstrou que a inibição de receptores P1 para adenosina levou ao aumento de citocinas pró inflamatórias e diminuição na carga parasitaria tecidual em infecção por *L. braziliensis*.

Gomes e colaboradores (2015) demonstraram o papel da NTPDase de *Leishmania amazonensis* e de *L. infantum* inibindo a ativação de macrófagos, reduzindo produção de IL-12 e TNF- α por macrófagos e diminuindo a produção de NO, contribuindo para a sobrevivência do parasito dentro destas células.

Detoni (2013) determinou a localização em *L. amazonensis* da NTPDase-2 de cerca de 42kDa (denominada no trabalho por eles de NTPDase-1) em diferentes compartimentos celulares, como membrana plasmática, núcleo, cinetoplasto flagelo e bolso flagelar. Outro trabalho, agora com *L. braziliensis* apresentou resultado idêntico ao encontrado em *L. amazonenses* ao apontar a presença de uma E-NTPDase de cerca de 40kDa na superfície de promastigotas. Os autores conseguiram demonstrar a presença da NTPDase-2 na membrana plasmática, núcleo, cinetoplasto flagelo e bolso flagelar (PORCINO et al., 2012). Porém neste trabalho a NTPDase-2 foi chamada de NTPDase-1, sendo necessária avaliação do tamanho das proteínas para se saber se os estudos são de uma ou outra isoforma, visto que não existe ainda uma nomenclatura consenso para os pesquisadores nesta área.

Um trabalho com *L. major*, espécie responsável pela forma cutânea da doença no Velho Mundo mostrou que a isoforma menor (~40 kDa) está localizada no aparelho de Golgi enquanto a isoforma maior com cerca de 70kDa é secretada (SANSOM et al., 2014).

Nosso grupo expressou e caracterizou bioquimicamente ambas NTPDases recombinantes de *L. infantum chagasi* expressas em *Escherichia coli*. Vasconcellos, (2010) nas condições utilizadas por ele para expressão e renaturação da enzima concluiu que a LicNTPDase2 apresentava preferência por substratos ADP, GTP e

UDP e que sua atividade era inibida na presença de mobilidato de amônio. Já Bastos, (2011) trabalhando com a enzima recombinante LicNTPDase1 determinou que esta enzima nas condições de expressão e caracterização adotadas apresentava apenas atividade GTPásica.

Em ambos os casos as enzimas eram expressas em sistema bacteriano e purificadas a partir de corpos de inclusão, após purificadas estas enzimas precisavam ser renaturadas para mensurar sua atividade enzimática. Posteriormente mudando as condições de renaturação de ambas enzimas observou-se aumento na atividade enzimática e que se tratavam de autênticas nucleotidasas da família ENTPDase já que apresentavam capacidade de hidrolisar nucleotídeos di e tri-fosfatados quando renaturadas adequadamente e na presença de cátions divalentes (Mg^{+} e Ca^{++}) (BASTOS, 2014; VASCONCELLOS, 2014).

Quanto a localização subcelular dessas enzimas, Vasconcellos et al., (2014) demonstrou que a NTPDase2 encontra se ancorada à membrana plasmática participando da adesão à célula hospedeira, enquanto análises *in silico* indicam que a NTPDase1 poderia ser secretada (BASTOS, 2014). Os dados aqui apresentados comprovam a importância dessa família de enzimas para a infecção, ressaltando a importância de dar continuidade aos estudos em andamento e elaboração de novos estudos sobre NTPDases de Leishmania.

No momento, em relação às ENTPDases de *L. infantum chagasi*, somente as enzimas recombinantes foram estudadas sendo que pouco se sabe em relação a atividade destas enzimas em suas formas nativas, deste modo, até o presente momento não podemos afirmar que os resultados encontrados para estudos *in vitro* envolvendo as enzimas recombinantes se assemelham mesmo ao das mesmas enzimas nativas do parasito.

Capítulo I

NTPDases DE *Leishmania infantum chagasi*: UM ESTUDO BIOQUÍMICO
E BIOLÓGICO

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estudar as NTPDases nativas de *L. infantum chagasi*.

3.2. Objetivos específicos

- Montar de uma coluna de imunoafinidade para purificação das proteínas nativas do parasito
- Purificar e caracterizar enzimaticamente ambas as proteínas nativas
- Avaliar a expressão durante diferentes fases do ciclo de vida do parasito
- Produzir Soro policlonal anti-LicNTPDase2 voltado para reconhecimento de epítomos lineares e que possa ser usado para avaliação da expressão por western blot
- Clonar a região que codifica para o ectodomínio da LicNTPDase2 em vetor pET28a para retirada da His-Tag, possibilitando a produção de anti-soro policlonal anti-LicNTPDase2 dedicado
- Expressão da LcNTPDase2 recombinante de forma solúvel para produção de anti-soro policlonal para anticorpos estruturais

4. METODOLOGIA

4.1 Produção de resina de afinidade acoplada a LicNTPDase2 recombinante

A proteína LicNTPDase 2 de *L. infantum chagasi* foi acoplada a CNBr-activate Sepharose Fast Flow 4B ativada, de acordo com Kavran, (2009). De modo resumido 0,5g de resina em pó foi suspensa em 10 mL de HCl 1 mM “gelado” por 2 horas a 4°C sob leve agitação para retirada de açúcares que revestem a resina e ativação da mesma. Em seguida a resina foi centrifugada a 1.000 g por 5 minutos a 4°C para separação do sobrenadante (descartado) e a resina úmida (2mL). Em seguida 1,20 mg da proteína NTPDase2 desnaturada, purificada conforme De souza et al., (2013) e gentilmente cedida pela aluna de doutorado Anna Cláudia Alves de Souza foi suspensa em tampão de ligação (NaHCO₃ 0.1M; NaCl 0.5 M pH 8.3) e incubada overnight a 4°C sob leve agitação com a resina ativada. A quantidade de proteína ligada à resina foi medida pelo método de Bradford. No dia seguinte a resina foi centrifugada a 1.000 g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado e dosado por Bradford, a resina foi lavada com 10 mL de tampão de ligação (NaHCO₃ 0,1M; NaCl 0,5 M pH 8.3). Após lavagem foi realizada a etapa de bloqueio adicionando 25mL de tampão Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0, sob leve agitação por 3 horas. Em seguida, a resina foi lavada 6x de modo alternado em dois tampões (Tris-HCl 0.1M, pH 8.5) e (NaOAc 0.1M, NaCl 0.5M pH 4). Por fim a resina foi submetida a duas lavagens em tampão de Armazenamento (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, K₂HPO₄ 2 mM) e ressuspensa em 2mL desse mesmo tampão e armazenada para posterior utilização para purificação e obtenção de IgG específica anti-LicNTPDase2. A resina de afinidade foi armazenada em geladeira a 4° C segundo as normas do fabricante até o momento do uso.

4.2 Purificação de anticorpos anti-LicNTPDase2

Foi utilizado soro anti-LicNTPDase2 produzido por Vasconcellos, (2010). A obtenção de anticorpos específicos ocorreu de acordo com o descrito por Cunha, (2010) com algumas adaptações. Inicialmente, 3mL de soro total foram diluídos em 7mL de tampão de ligação contendo (Tris 10 mM pH 7,5), a coluna (Sefarose+LicNTPDae2) foi equilibrada com 20 vezes o seu volume com tampão de ligação, em seguida o soro previamente diluído foi adicionado a resina onde

incubando sob agitação durante 1h a 4°C.

Posteriormente a resina foi centrifugada 6 min a 4°C 1000g e o sobrenadante descartado.

A fim de eluir as moléculas ligadas inespecificamente lavou-se a coluna com 10 vezes seu volume adicionando Tampão de ligação e em seguida a mesma quantidade de Tampão de Lavagem (Tris 10mM + 500mM de NaCl pH 7,5).

Por fim os anticorpos ligados por interações ácido-sensíveis foram eluídos com 1mL de tampão glicina 100 mM pH 2,5, e depois os anticorpos ligados por interações básicas foram eluídos com 1mL de tampão Tris 10 mM pH 8,8. O pH das amostras de eluição foi acertado para 7.2. As amostras das duas eluições foram unidas e seu conteúdo concentrado utilizando Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units Milipore® e dosado por método de Bradford.

4.3 Produção de resina de afinidade acoplada a anticorpo anti-LicNTPDase2

Os anticorpos purificados anti-LicNTPDase2 foram acoplados a CNBr-activate Sepharose Fast Flow 4B ativada, de acordo com o método descrito no item 4.1.

4.4 Cultura dos parasitos *in vitro*

Formas promastigotas de *L. infantum chagasi* cepa (M2682) foram cultivadas partindo de cultura com densidade celular de 1×10^5 células/mL em meio Grace's Insect Medium suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (previamente inativado a 56°C/30 min), 10% urina humana, 2 mM L-glutamina, 100 unidades/mL de penicilina G potássica, pH 6,8, a 25°C. Foi confeccionada uma curva de crescimento de modo a determinar o melhor dia para repiques e obtenção do extrato de *L. infantum chagasi*

4.5 Curva de crescimento *in vitro* de *L. infantum chagasi*

Os parasitos foram cultivados conforme item 4.4, iniciando a cultura com 1×10^5 parasitos/mL em 10 mL de meio Grace's. As curvas de crescimento foram feitas em triplicata, sendo o crescimento avaliado por contagem diária do número de parasitos em câmara de Neubauer, durante 8 dias de cultivo. A quantidade de parasitos foi expressa em número de parasitos/mL. Foram determinadas a fase logarítmica e a estacionária do crescimento.

4.6 Obtenção do extrato de *L. infantum chagasi* para purificação de proteína nativa

Foram utilizados parasitos em fase logaritmica de crescimento (5dias). Aproximadamente 1×10^8 parasitos/mL em um volume liquido final de 500mL em fase logaritmica de crescimento (5 dias) foram centrifugados a 1500g/10min 4°C, o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado 2 vezes em tampão Tris 50mM pH 7.2. Em seguida o pellet foi ressuspensado em 0,5mL de tampão de lise gelado (Tris 20mM, NaCl 137mM, 1% Triton X-100, pH 8,0 mais inibidores de protease: aprotinina 1µg/mL, leupetina 1µg/mL e pepstatina 1µg/mL), onde ficou durante 30min sob agitação a 4°C. A suspensão foi então sonicada 6 vezes, com amplitude de 25 watts por 2 min, uma alíquota desta solução foi coletada e denominada “Extrato total”. Após sonicação a suspensão foi centrifugada a 7000g/20min a 4°C, o sobrenadante recolhido e incubado com a resina contendo os anticorpos anti-LicNTPDase2 acoplados por 2h sob agitação em gelo. Passado esse tempo o material foi centrifugado 1000g/10min 4°C, o sobrenadante foi recolhido e nomeado de Volume não ligado (VNL). A resina foi submetida a duas lavagens com 10mL cada de tampão Tris-Salina (Tris 10mM, NaCl 500mM, pH 7,5) de modo a desligar as moléculas ligadas inespecificamente. Por fim a eluição foi realizada com 1mL de tampão glicina 0,1M, pH 2,5. O conteúdo das amostras, Extrato total *L. infantum chagasi*, VNL, Lavagem e Eluição foram por fim analisados por *Western blot*. A análise por Eletroforese capilar (Bioanalyzer 2100 Agilent ©), ocorreu de acordo com especificações do fabricante.

4.7 SDS-PAGE e Western Blotting.

Foi utilizado gel de poliacrilamida a 10 % e a corrida ocorreu a 120 V. A transferência para membrana de nitrocelulose (Westernblot) foi realizada a 250 mA por 2 h e após esse tempo as membranas foram coradas com Ponceau para confirmação da transferência, em seguida foram lavadas com água destilada e incubadas com solução de bloqueio (PBS-Tween 1%, leite em pó 0,5%) *overnight*, sob agitação.

No dia seguinte, as membranas foram lavadas 3 vezes com PBS-T 1% por 5 min sob agitação. A membrana foi incubada com soro policlonal anti-LicNTPDase 2 de *L. infantum chagasi* (VASCONCELLOS et al., 2014), diluído 1:100 em tampão PBS-T 1% e incubadas por 2 h, sob agitação. Passado esse tempo a membrana foi lavada

novamente com tampão PBS-T, como descrito anteriormente, e incubadas por 2 h, com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a FITC (Sigma®), produzido em cabra, diluído 1:6.000 em tampão PBS-T. Por fim a membrana foi novamente lavada com PBS-T 1% e revelada por fluorescência em aparelho FLA-5100 (Fujifilm®) utilizando laser de excitação “SHG blue laser” (473nm).

4.8 Obtenção de parasitos de *L. infantum chagasi* em diferentes fases do ciclo celular

Os parasitos foram cultivados em meio de Grace conforme explicado no item 4.4. Utilizando a curva de crescimento elaborada os parasitos foram obtidos em 4 distintas condições: promastigotas em fase logaritmica de crescimento cultivados durante 5 dias a 25°C, promastigotas em fase estacionaria de crescimento cultivados durante 7 dias/25°C. Já as formas amastigotas axênicas foram obtidas de dois modos distintos com base em Gupta, (2002): o primeiro através de aumento da temperatura no qual os parasitos partindo de 1×10^5 células/mL foram crescidas a 37°C em atmosfera contendo 5% CO₂ e utilizados no quinto dia. O segundo método se deu através da transferência de promastigotas em fase logaritmica para tampão ácido HEPES-TRIS 50mM, pH 5,5 (NaCl 116.0 mM, KCl 5.4, D-glicose 5.5 mM, MgCl₂ 5.0 mM 50.0) onde ficaram durante 4 horas para que ocorresse a transformação.

4.9 Avaliação da expressão das NTPDases de *L. infantum chagasi* por RT-qPCR

A extração de RNA total dos parasitos coletados nas condições citadas no item 4.8 ocorreu pelo método de Trizol (Invitrogen) partindo de aproximadamente 1×10^8 parasitos/mL. Posteriormente foi sintetizado o cDNA utilizando kit Platus Transcriber RNase H- cDNA First Strand (Sinapse), seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. Ao fim da síntese a concentração do cDNA foi determinada usando nanoDrop (Thermo). Foram utilizadas alíquota de 75 ng de cDNA em triplicata para o qPCR com kit SYBR Green. Os primers foram desenhados utilizando a ferramenta PrimerQuest® e suas sequências estão disponíveis na tabela 1. Os genes endógenos GAPDH e G6PD foram escolhidos tendo como base a literatura (ALCOLEA et al., 2016; BARRETT, 1997). A RT-qPCR foi realizada em aparelho “Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System” e os dados analisados utilizando método de curva padrão externa para quantificação relativa da expressão do gene (LARIONOV; KRAUSE; MILLER, 2005).

Tabela 1: Lista de primers utilizados no qPCR de ambas NTPDases de *L. infantum chagasi*.

Primer usados no qPCR			
Gene	Sentido	Sequência de Nucleotídeos	Referência
GAPDH	FW	GGAGATAGACAAGGCCATCAAG	Alcolea et al., (2016)
GAPDH	RV	TGTCGTTGATGAAGTCAGAGC	Alcolea et al., (2016)
G6PD	FW	GTCCGAGGCTATGTATGTCAAG	Barret, (1997)
G6PD	RV	CATCGTACCGAGTGTGGTATG	Barret, (1997)
LicNTPDase1	FW	CGGAGTACGAGTGCATGTATTA	Este trabalho
LicNTPDase1	RV	AGGTAAGAGAGAGGAGTGAGG	Este trabalho
LicNTPDase2	FW	CTGCAAGTTTGATGCCTGTG	Este trabalho
LicNTPDase2	RV	AGTGGTAGAGTCGGTCGTAAA	Este trabalho

Troca de vetor de expressão heteróloga para retirada de His-Tag

4.10 Clonagem da LicNTPDase2 em vetor pET28a

O ectodomínio da NTPDase2 de *L. infantum chagasi* cepa M2682 foi amplificado por PCR utilizando os primers (tabela 2). As reações de amplificação do gene ocorreram conforme tabela 3. **Tabela 2:** Lista de primers utilizados no na clonagem do ectodomínio da LcNTPDase2

Primer usados no qPCR		
Gene	Sentido	Sequência de Nucleotídeos
LicNTPDase2	FW	AGTAGGTAGCATGCTGCTCTCCCCA
LicNTPDase2	RV	AGGATCCTCATTCCATCTTGAGCAG

Foram utilizados 15µL de uma concentração de aproximadamente 32ng/µL de DNA genômico, obtida através de dosagem em nanoDrop (Thermo). Os primers foram adicionados em uma concentração de 10µM cada e os dNTP's foram adicionados em total 10mM.

Tabela 3. Reação de amplificação do ectodomínio da *LicNTPDase2*

Componentes	Volume
DNA genômico <i>L. infantum chagasi</i>	15µl
H ₂ O Milli-Q®	4,9µl
Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity	0,1µl
Fw Primer	0,5µl
Rv Primers	0,5µl
Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (dNTP's)	0,5µl
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	1µl
Tampão de Alta Fidelidade 10x	2,5µl

As condições de amplificação consistiram de um estágio inicial de desnaturação (94°C/1,30min), 35 ciclos (94°C/0,20min, 62,0°C/30seg e 68°C/1,30min) mais um passo final de 68°C/7min.

O produto da reação de PCR foi purificado utilizando Kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) de acordo com o manual do fabricante, eluídos em

20µl de água Milli-Q® e inseridos em vetor de clonagem pGEM®-T Easy segundo recomendações do manual do fabricante. Em seguida o produto de ligação foi transformado em cepa de *E. coli* Dh5α. As colônias bacterianas utilizadas neste experimento foram crescidas a 37°C por 16hrs sob agitação (180rpm) em meio Luria-Bertani (LB). Todas colônias transformadas foram mantidas a -80°C com 10% de glicerol até o momento de sua utilização. A partir do clone obtido foi realizada confirmação por PCR e digestão do plasmídeo utilizando as enzimas *Bam*HI e *Nhe*I cujas sequências foram incorporadas na sequência dos primers indicados na tabela 2. As reações de digestão citadas neste trabalho ocorreram conforme demonstrado na tabela 4. As extrações de DNA plasmidial do clone obtido e do vetor de expressão pET28a foram feitas utilizando o Kit ilustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare) segundo o manual do fabricante.

O vetor de expressão pET28a e o vetor de clonagem pGEM®-T Easy já contendo o inserto (sequência do ectodominio da *LicNTPDase2*) foram submetidos a digestão para liberação do inserto e linearização do vetor de expressão. O inserto e o vetor de expressão foram purificados utilizando o já citado Kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) de acordo com metodologia do fabricante e utilizados na reação de ligação, como mostra a tabela 5. O produto da ligação inserto-pET28a foi transformado em cepa *E.coli* DH5α. A confirmação da clonagem ocorreu por digestão com as mesmas enzimas já citadas, PCR de colônia e sequenciamento realizado no Centro de Pesquisa René Rachou em Belo Horizonte, MG. O resultado do sequenciamento foi analisado quanto à similaridade com sequências disponibilizadas no NCBI, utilizando a ferramenta Basic Local Alignment (BLAST) e o Programa Geneious 6.0.6 para verificação da integridade das sequências, frame e tradução.

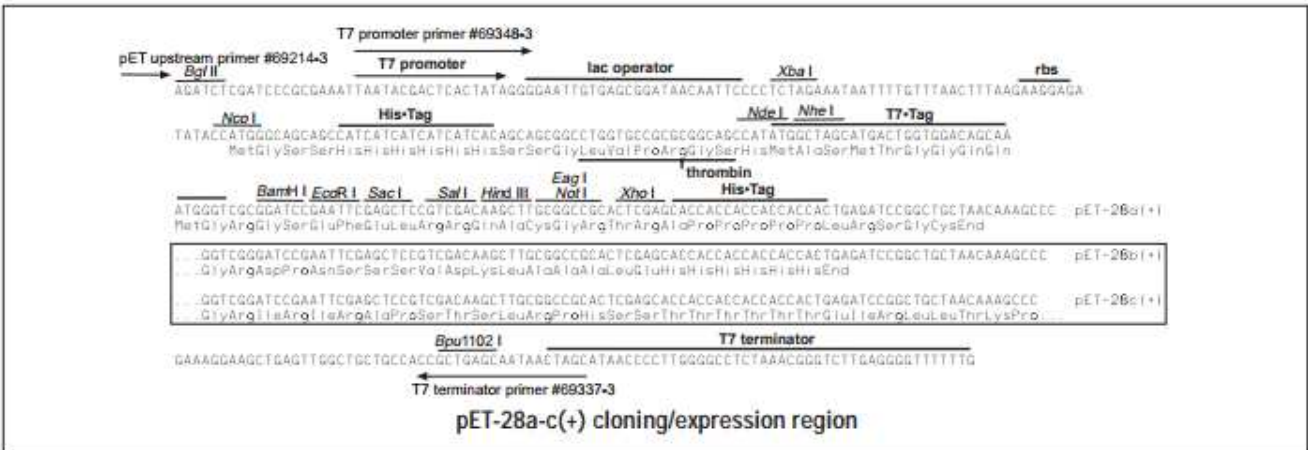
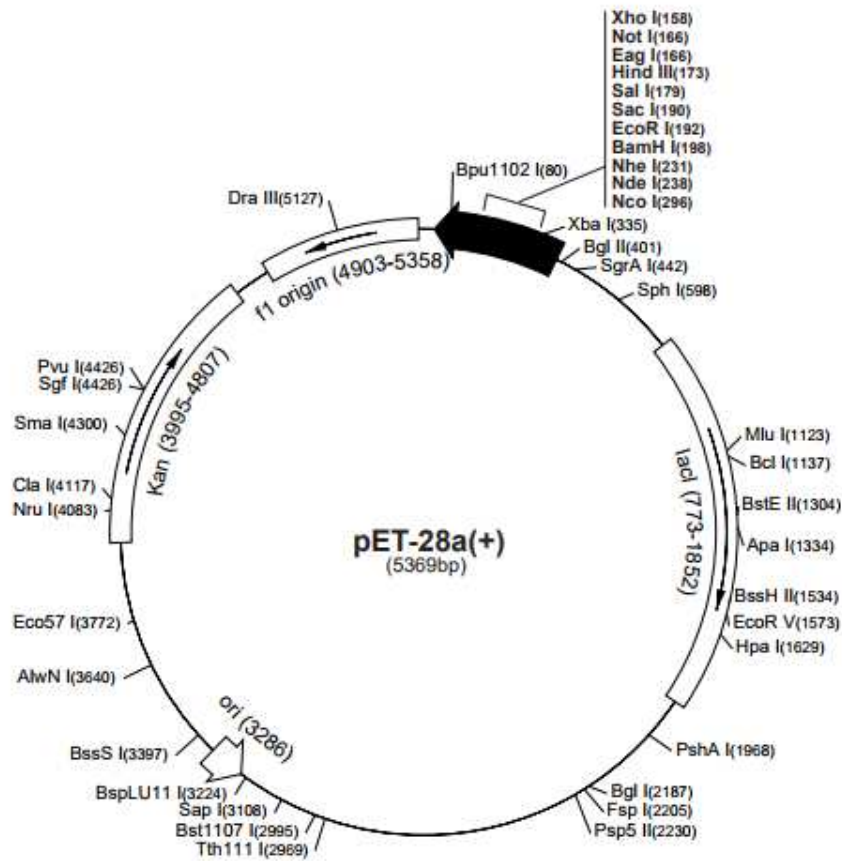


Figura 5: Mapa do vetor pET28a. O mapa indica os sítios de restrição das enzimas *BamHI* e *NheI* utilizadas na clonagem do ectodomínio da NTPDase2 de *L infantum chagasi*, a região corresponde ao sítio de proteólise por trombina e a sequência adicional de hexahistidina.

Tabela 4. Reação de digestão dos vetores utilizados

Componentes	Volume
10X FastDigest Green Buffer (Thermo Scientific)	2µl
H₂O Milli-Q®	14µl
<i>NheI</i> Fast Digest (Thermo Scientific)	1µl
<i>BamHI</i> Fast Digest (Thermo Scientific)	1µl
LicNTPDase2 pGEM®-T Easy, pET28a*	2µl
Fosfatase Alcalina (Thermo Scientific)**	1µl

*Cada vetor foi digerido em uma reação separada

** A fosfatase alcalina foi inserida apenas na digestão do vetor pET28a para evitar circularização

***As reações de digestão ocorreram em termociclador (Veriti Thermo Cyclor- Applied Biosystems) e seguiram duas etapas, uma de 1h/37°C seguida por 5min/80°C para inativação. A adição de Fosfatase Alcalina ocorreu no final das etapas acima e se deu por 30min/37° seguido por 5min a 80°C.

Tabela 5. Reação de ligação Inseto digerido em Vetor pet28a

Componentes	Volume
ATP (25mM)	2µL
H₂O Milli-Q®	9µL
Inseto	10µL
Rapid Ligation Buffer 5x (Thermo Scientific)	4µL
PET28a*	3µL
T4 DNA Ligase (Thermo Scientific)	1µL

*Vetor já linearizado por digestão com as enzimas *BamHI* e *NheI*

** A reação ocorreu a 4°C por 48horas

4.11 Expressão da LicNTPDase2 recombinante em *E. coli*

O vetor pET28a contendo a sequência da LicNTPDase2 foi purificado conforme já descrito e transformado em células de *E. coli* BL21 (DE3) para expressão heteróloga. Foi feito 5mL de pré-inoculo em meio LB (0,5% extrato de levedura, 1% bacto-triptona, 1% de NaCl pH 7,0) contendo 50µg/mL de kanamicina e crescidos por 16hrs a 37°C 180rpm. No dia seguinte o pré-inóculo foi transferido para 400 mL de meio LB líquido, sem kanamicina e a cultura foi crescida 37 °C, 180 rpm até atingir DO₆₀₀ entre 0,6 e 0,8. Para indução da expressão foi adicionado 0,2mM de IPTG e a indução realizada por até 3hrs a 37°C sob agitação (180rpm), sendo retiradas alíquotas (100mL) de uma em uma hora, incluído o tempo 0. As alíquotas da indução foram centrifugadas à 3000g/5min e o pellet armazenado à -80°C.

4.12 Purificação dos pellets de indução

Os pellets obtidos nas induções foram ressuspensos em tampão de lise (Tris 50mM, 300mM NaCl, aprotinina 1µg/mL, leupeptina 1µg/mL, pepstatina 1µg/mL e lisozima 1mg/mL, pH 8,0), e foram mantidos no gelo por 30min antes de serem sonicados 6 vezes, com amplitude de 20 Watts por 1 min para rompimento da membrana celular, em seguida centrifugado por 30min a 14000g/4°C e o sobrenadante armazenado à -20°C. O pellet restante após centrifugação foi ressuspensado em 1mL de tampão de solubilização (Tris 50mM, NaCl 500mM, β-mercaptoetanol 10mM e 8M uréia) aquecido à 55 °C por 20 min, centrifugado à 14.000 g por 20 min e o sobrenadante foi nomeado como “Solubilização” e armazenado à -20°C.

O sobrenadante e as “solubilizações” foram dosados pelo método de Bradford e analisados por SDS-PAGE e/ou Western Blotting (item 4.7) para avaliação da presença da proteína nas frações solúvel ou nos corpos de inclusão.

4.13 Teste de Expressão solúvel da LicNTPDase2 recombinante

De modo a garantir a expressão da proteína em sua forma nativa diferentes testes de indução foram feitos. O pré inoculo ocorreu conforme item 4.11 e a expressão da proteína foi feita inicialmente à 20°C em duas concentrações diferentes de IPTG (0,25mM e 0,50mM) utilizando meio LB sob agitação (180rpm) durante 24h.

Foram utilizados 200mL de meio LB para cada concentração de IPTG, sendo recolhidas alíquotas de 100mL em dois momentos (tempo 0 e após 24hrs).

Um segundo teste foi realizado expressando a proteína a 30°C por até 5hrs sob agitação (180rpm) em concentração de 0,25mM de IPTG, utilizou-se 200mL de meio LB e foram retiradas alíquotas de 50mL nos tempos: 0, 1h,3h e 5h. As alíquotas foram processadas conforme item 4.12, dosados pelo método de Bradford e analisadas conforme itens 4.15.

4.14 Dosagem de proteínas

As concentrações das amostras utilizadas neste trabalho foram avaliadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando microplaca de 96 poços. Utilizou-se albumina bovina (BSA) para montagem de curva padrão.

4.15 SDS-PAGE e Western Blotting.

As amostras de indução foram dosadas para aplicação de 12 µg ou 15 µg de proteína total em cada canaleta A eletroforese foi feita em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10 % à 120 V e o gel foi corado em Comassie blue. Cada gel possuiu uma réplica, que foram transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando sistema semi-seco. A transferência ocorreu à 400mA por 1 hr. A partir deste ponto o procedimento seguiu conforme item 4.7. As membranas foram incubadas com anticorpo anti-hexahistidina (GE Healthcare ®) produzido em camundongo diluído 1:6000 em tampão PBS-T e incubadas por 1 hr, sob agitação. Em seguida, as membranas foram lavadas com tampão PBS-T, como descrito anteriormente, e incubadas por 1h, com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo acoplado à peroxidase (Sigma ®), diluído 1:5.000 em tampão PBS-T. A revelação foi realizada utilizando 10mg de DAB (Sigma®), 10µL de água oxigenada diluídos 10mL de tampão Tris 50 mM pH 7,6.

4.16 Produção de anticorpos contra epítomos lineares de *LicNTPDase2* recombinante

Para produção de anticorpos contra epítomos lineares de *LicNTPDase2*, foi utilizado um coelho fêmea, adulta jovem, proveniente do biotério da Universidade Federal de Viçosa.

Foi utilizada a *LicNTPDase2* recombinante expressa em sistema pET21b inserido em *E. coli* e purificada conforme descrito por De souza et al., (2013). A

enzima foi gentilmente cedida pela aluna de doutorado de nosso grupo de pesquisa Ana Claudia Alves de Souza.

Os anticorpos policlonais foram produzidos por meio de três imunizações com a proteína recombinante purificada, para produção de anticorpos contra epitopos lineares da proteína a mesma foi fervida e desnaturada na presença de uréia (0,8M). A primeira imunização ocorreu inoculando 100µg da proteína desnaturada e homogeneizada com adjuvante completo de Freund. A segunda imunização será feita após 15 dias com 50µg de proteína recombinantes desnaturada. Passados 15 dias foi feita a terceira imunização utilizando 50µg. Após 7 dias o animal foi eutanasiado, o sangue obtido e centrifugado a 1.000g/10min a 4°C para obtenção do soro que foi aliquotado e armazenado a -20°C.

Devido a capacidade de reatividade cruzada de reconhecimento de anticorpos policlonais anti-LicNTPDase2 contra a NTPDase1 e devido a esta ultima ser mais difícil de expressar em quantidades razoáveis em sistema bacteriano (BASTOS, 2014), decidimos trabalhar por hora apenas com a NTPDase2 recombinante para produção dos anticorpos policlonais que usamos para ensaios de westernblotting.

Todo este procedimento já foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFV: protocolo 52/2016.

4.17 Dot Blotting

Os anticorpos tiveram seu título determinado através de “Dot Blotting” segundo o que foi realizado por Vasconcellos (2010), com algumas modificações. Nesse experimento 1µg de proteína purificada por cromatografia de afinidade (item 4.16) foi adicionada em membrana de nitrocelulose. O soro do coelho imunizado foi utilizado como anticorpo primário em várias diluições (1:100 até 1:102400), foi utilizado anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:6000) (Sigma ®). Como controle positivo foi utilizado anticorpo primário anti-LicNTPDase2 produzido por Vasconcellos, (2010). O controle negativo consistiu da adição de todos os componentes com exceção de anticorpo primário, que foi substituído por PBS-T. A revelação ocorreu com 10mL de solução de Diaminobenzidina (DAB) (50mM Tris pH 7,6, 10mg DAB) sendo adicionados no final 10µL de H₂O₂.

5. RESULTADOS

5.1. Teste de Purificação das NTPDases nativas

Inicialmente, optamos por produzir uma resina de afinidade específica para purificar as LicNTPDases nativas. Para isto produzimos uma resina de afinidade ligada a própria LicNTPDase recombinante e posteriormente purificamos anticorpos anti-LicNTPDase recombinante. O soro policlonal de partida fonte dos anticorpos foi previamente produzido durante o mestrado de Raphael Vasconcellos.

Assim 0,728 mg da LicNTPDase2 foi imobilizada em resina de sefarose, conforme mostrado na tabela 6. Em seguida 3 mL de soro policlonal anti LicNTPDase2 foi utilizado na resina de afinidade LicNTPDase2 para purificar os anticorpos específicos anti-LicNTPDase2. Os anticorpos purificados foram dosados por Bradford, o resultado da quantificação indicou um total de 200µg de proteínas na eluição concentrada (Tabela 6). Esses anticorpos foram ligados a coluna de sefarose e utilizados no teste de purificação das enzimas nativas.

Tabela 6. Quantidade de proteínas totais durante as etapas de construção das resinas

Conteúdo	Quantidade de Proteína Inicial	Volume não ligado	Ligado em sefarose	Efiência da ligação
LicNTPDase2	1,19mg	0,462mg	0,728mg	61,17%
Anticorpos Anti-LicNTPDase	0,209mg	ND	~0,209mg	~100%

O conteúdo proteico foi quantificado pelo método de Bradford pré e pós incubação com a resina de sefarose ativada de modo a mensurar a eficiência de ligação da enzima ou do anticorpo purificado, a quantidade de proteína ligada a coluna foi calculada subtraindo os valores obtidos nos volumes não ligado pela quantidade de proteína inicial que foi adicionada para incubar com a resina de sefarose ativada. O volume não ligado coletado após incubação da solução de anticorpos purificados contra LicNTPDase não apresentou quantidades detectáveis de proteína indicando uma eficiência próxima de 100%.

Em seguida foram feitos alguns testes de purificação das LicNTPDases 1 e 2 nativas, usando extrato total de promastigota total em fase logarítmica de 5 dias de *L. infantum chagasi*. A purificação foi avaliada através de western blot usando soro anti-LicNTPDase2. As frações colhidas durante as etapas da purificação foram aplicadas em gel SDS-PAGE 10% e transferidas para membrana de nitrocelulose para realização da técnica de westerblotting conforme indicado na metodologia (item 4.7). O resultado do western mostra marcações nas canaletas correspondente ao extrato de *L. infantum chagasi*, Sobrenadante e Volume não ligado (VNL). Todas as marcações ocorreram em altura inferior ao controle de aproximadamente 45kDa (proteína recombinante LicNTPDase2 purificada) conforme mostrado na figura 6. Não foram observadas marcações nas frações de lavagem e na eluição. Assim, aparentemente, usando esta estratégia parece que não foi possível purificar as LicNTPDases nativas em quantidades mensuráveis pelas metodologias usadas, ou então a LicNTPDase2 nativa teria uma massa molecular real menor do que a da proteína recombinante devido a alguma modificação natural da mesma.

A partir deste resultado resolvemos avaliar o conteúdo das frações VNL, Lavagem e Eluição por meio de eletroforese capilar devido a sua maior sensibilidade a baixas concentrações de proteínas. O resultado da eletroforese capilar mostra uma proteína com massa molecular próxima a 45kDa a uma concentração de 41ng/ μ L, presente no VNL (figura 7). A Lavagem a qual não apresentou marcação no westernblot (figura 6), apresentou uma concentração muito baixa de proteínas através da eletroforese capilar, apesar de conter proteínas com massa molecular na faixa dos 40-60kDa todas elas estavam em concentrações abaixo de 5ng/ μ L (figura 8). A eluição não apresentou quantidades consideráveis de proteína e nenhuma das proteínas detectadas apresentavam massa molecular próxima do esperado para as duas isoformas de NTPDases (figura 9). É possível que a dificuldade em purificar as proteínas se deva a baixos níveis de expressão na célula. Desse modo investigamos por qPCR as condições na quais as enzimas eram mais expressas pelo parasito.

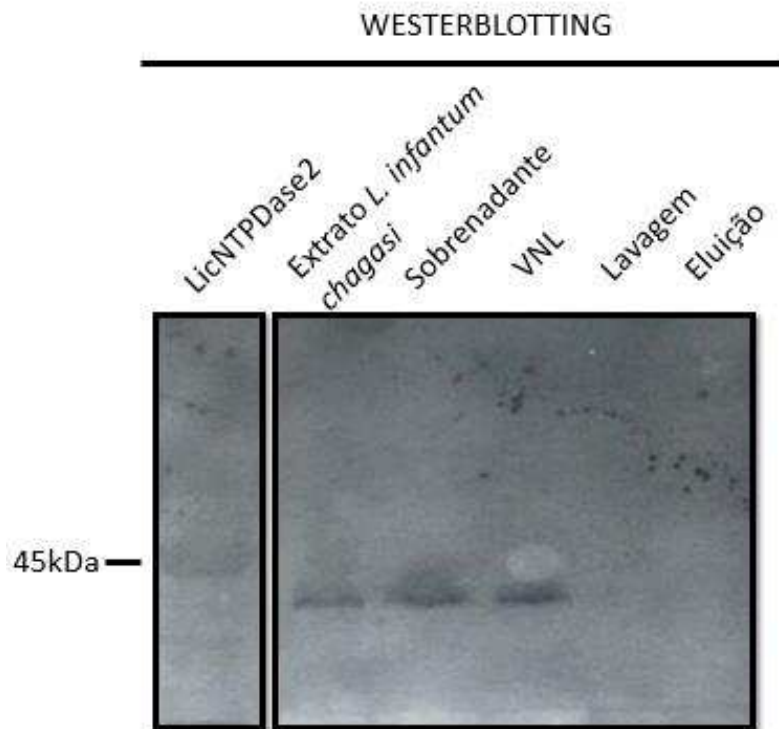
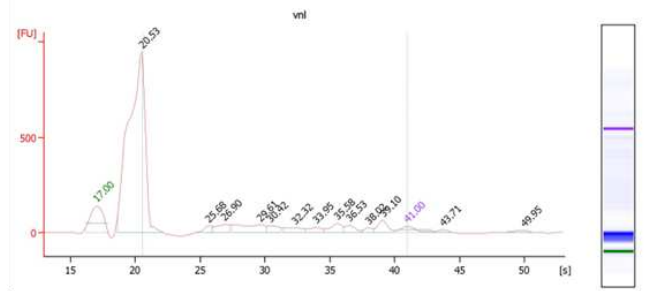


Figura 6: Teste de Purificação das NTPDases nativas de *L. infantum chagasi*. A figura mostra Western Blotting das frações coletadas durante a purificação. Foram aplicados 15 μ L de cada amostra por canaleta. É possível observar marcações únicas nas amostras extrato *L. infantum chagasi*, Sobrenadante e VNL (Volume não ligado à coluna) em altura inferior a LcNTPDase2 purificada. O Western foi realizado com soro anti-LicNTPDase2 diluído 1:100 em PBS-T e anticorpo secundário anti-IgG de Coelho conjugado com FITC (Sigma) 1:6000.



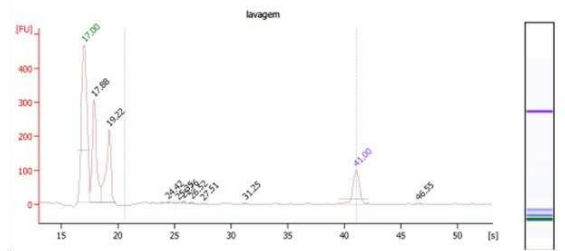
Overall Results for sample 10 : vnl

Number of peaks found: 10 Noise: 1.4959
 Total Rel Conc: 687.9 ng/μl

Peak table for sample 10 : vnl

Peak	Size [kDa]	Rel. Conc. [ng/μl]	Calib. Conc. [ng/μl]	% Total	Observations	Aligned Migration Time [s]
1	0.0	0.0	0.0	0.0		2.08
2	0.0	0.0	0.0	0.0		5.34
3	0.0	0.0	0.0	0.0		10.63
4	4.5	0.0	0.0	0.0	Lower Marker	17.00
5	13.3	0.0	0.0	0.0	System Peak	20.53
6	44.1	41.0	0.0	6.0		25.68
7	53.6	84.4	0.0	12.3		26.90
8	81.6	158.6	0.0	23.1		29.61
9	91.3	55.7	0.0	8.1		30.42
10	113.6	65.9	0.0	9.6		32.32
11	132.6	46.3	0.0	6.7		33.95
12	152.2	72.6	0.0	10.6		35.58
13	167.6	50.2	0.0	7.3		36.53
14	191.7	29.2	0.0	4.3		38.02
15	209.3	83.9	0.0	12.0		39.10
16	240.0	60.0	0.0	0.0	Upper Marker	41.00

Figura 7: Análise por eletroforese capilar do conteúdo proteico da amostra VNL. A imagem mostra a massa molecular e concentração das proteínas presentes no Volume Não Ligado. A linha preta indica uma proteína de aproximadamente 44kDa, tamanho próximo do observado na marcação do western blotting. Foi quantificado pelo equipamento aproximadamente 0,69μg/μL de proteínas totais.



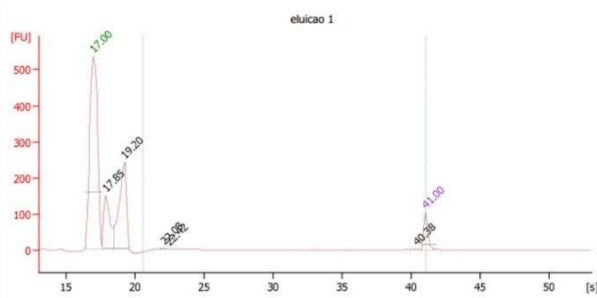
Overall Results for sample 8 : lavagem

Number of peaks found: 6 Noise: 1.3111
 Total Rel Conc: 13.7 ng/μl

Peak table for sample 8 : lavagem

Peak	Size [kDa]	Rel. Conc. [ng/μl]	Calib. Conc. [ng/μl]	% Total	Observations	Aligned Migration Time [s]
1	4.5	0.0	0.0	0.0	Lower Marker	17.00
2	5.4	0.0	0.0	0.0	System Peak	17.88
3	6.9	0.0	0.0	0.0	System Peak	19.22
4	35.5	4.3	0.0	31.3		24.42
5	41.9	1.3	0.0	9.3		25.35
6	44.6	3.0	0.0	21.7		25.76
7	50.5	3.5	0.0	25.3		26.52
8	58.5	1.0	0.0	7.6		27.51
9	101.0	0.7	0.0	4.8		31.25
10	240.0	60.0	0.0	0.0	Upper Marker	41.00

Figura 8: Análise por eletroforese capilar do conteúdo proteico da amostra Lavagem. A imagem demonstra o peso molecular e concentração das proteínas presentes na Lavagem. Foi quantificado pelo equipamento aproximadamente 0,014μg/μl de proteínas totais.



Overall Results for sample 1 : eluição 1

Number of peaks found: 3 Noise: 1.5345
 Total Rel Conc: 7.3 ng/μl

Peak table for sample 1 : eluição 1

Peak	Size [kDa]	Rel. Conc. [ng/μl]	Calib. Conc. [ng/μl]	% Total	Observations	Aligned Migration Time [s]
1	4.5	0.0	0.0	0.0	Lower Marker	17.00
2	5.4	0.0	0.0	0.0	System Peak	17.85
3	6.9	0.0	0.0	0.0	System Peak	19.20
4	21.5	4.4	0.0	60.7		22.08
5	23.3	1.5	0.0	20.5		22.42
6	229.9	1.4	0.0	18.8		40.38
7	240.0	60.0	0.0	0.0	Upper Marker	41.00

Figura 9: Análise por eletroforese capilar do conteúdo proteico da amostra Eluição. A imagem demonstra a massa molecular e concentração das proteínas presentes na Eluição. Foi quantificado pelo equipamento aproximadamente 0,007μg/μl de proteínas totais.

5.2. Avaliação da expressão por qPCR das NTPDases nativas de *L. infantum chagasi*

Inicialmente foi elaborada uma curva de crescimento dos parasitos sob as condições citadas no item 4.4, a curva (figura 10), nos permitiu diferenciar as fases logaritmica e estacionária do parasito, além disso testamos outras duas condições: amastigotas induzido por temperatura (37°) e amastigotas induzidos por pH (pH 5,5). Os parasitos nas 4 condições citadas tiveram seu RNA extraídos para análise por qPCR.

As amostras de mRNAs extraídas das diferentes amostras foram usadas para obter cDNA e o cDNA utilizado para fazer PCR em tempo real e identificar em quais condições as enzimas poderiam ser mais expressas pelo parasito e assim dedicar a purificação das proteínas nativas usando as amostras mais enriquecidas nas mesmas.

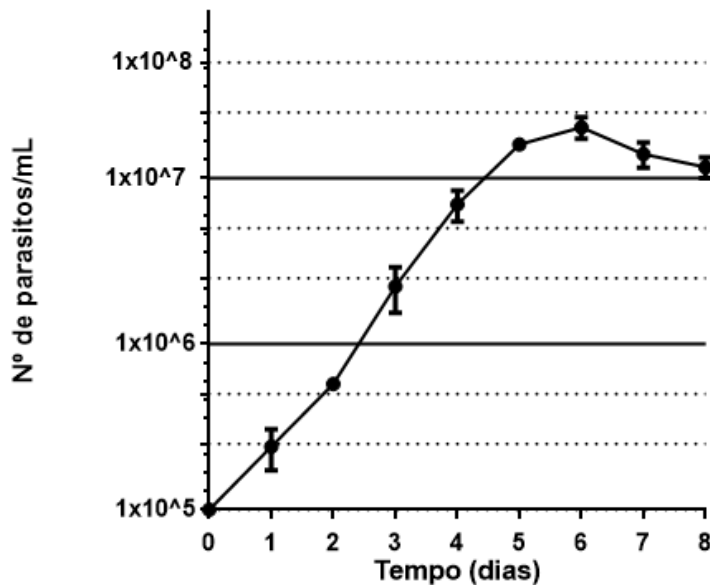


Figura 10: Curva de Crescimento de promastigotas de *L. infantum chagasi*. Os parasitos foram cultivados em 10mL meio Grace's a 25°C durante 8 dias. Os dados são correspondentes à contagem de garrafas em triplicata para cada dia.

Os resultados da quantificação de mRNA de LicNTPDase1 mostram comparativamente maior expressão em promastigota em fase multiplicativa (logarítmica) e em amastigota induzido por acidificação do meio (Amastigota pH 5,5) do que em fase não multiplicativa (estacionária) ou em amastigota induzido por temperatura (Amastigota 37°C). Houve aumento significativo da expressão do mRNA quando em fase logaritmica comparado com a fase estacionária ($p < 0,0001$) e fase Amastigota 37°C ($p < 0,001$). Houve ainda aumento quando comparada a expressão em

forma Amastigota pH 5,5 com as fases amastigota 37°C ($p < 0,0001$) e estacionária ($p < 0,0001$). Por outro lado, não houve diferença significativa entre Estacionária e Amastigota pH 5,5 (figura 11).

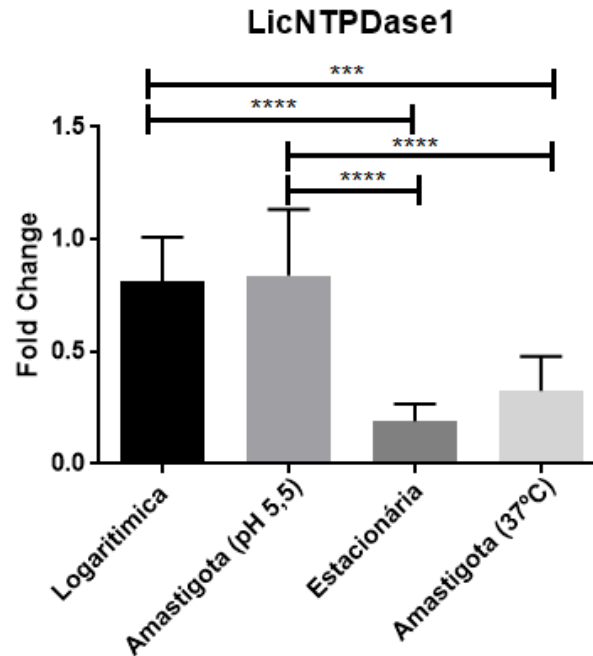


Figura 11: Expressão de mRNA da LicNTPDase1 sobre 4 diferentes condições. Foi utilizado método de curva padrão externa para quantificação relativa da expressão do gene (LARIONOV; KRAUSE; MILLER, 2005). O resultado indica o número de vezes que o gene (LcNTPDase1) é expresso em relação a média dos endógenos utilizados.

A segunda isoforma (LicNTPDase2) é mais expressa nas fases estacionária e amastigota 37°C. A fase onde houve maior expressão gênica da LicNTPDase2 foi amastigota 37°C, sendo seu aumento significativo quando comparado com todas as demais condições (figura 12). Com estes dados poderá ser possível futuramente tentar purificar as proteínas nativas nas amostras onde seus respectivos RNAm foram mais abundantes.

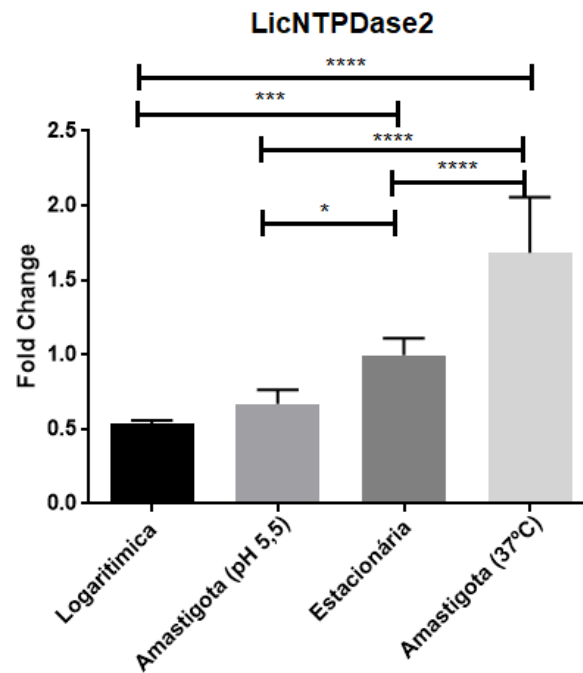


Figura 12: Expressão de mRNA da LicNTPDase2 sobre 4 diferentes condições. Foi utilizado método de curva padrão externa para quantificação relativa da expressão do gene (LARIONOV; KRAUSE; MILLER, 2005). O resultado indica o número de vezes que o gene (LcNTPDase2) é expresso em relação a média dos endógenos utilizados.

Troca de vetor de expressão heteróloga para retirada de His-Tag

5.3. Clonagem em vetor pet28a da LcNTPDase2

Uma vez que os teste iniciais de purificação das enzimas nativas do parasito usando o soro policlonal feito anteriormente por Raphael Vasconcellos não ocorreram conforme esperado, e devido há várias dificuldades de reconhecimento em western blot das enzimas nativas por este mesmo soro, decidimos produzir a proteína de forma recombinante, porém com a retirada da cauda de histidina usada para a purificação, assim teremos anticorpos dedicados somente á proteína de interesse. A retirada da cauda His-Tag também permitirá se obter uma proteína heteróloga mais próxima da sua condição in vivo (sem cauda hexahistidina e em sua conformação nativa). Assim, inserimos a sequência codificante do ecto-domínio da LicNTPDase2 (previamente clonado em pET21b, DeSouza 2013) agora em vetor de expressão pET28a que tem sítio para protease para retirada da cauda de histidina após a purificação da proteína de interesse.

Inicialmente a região correspondente ao ectodomínio da LicNTPDase2 foi replicado por PCR, purificado e ligado ao vetor de amplificação pGEM. Em seguida foi feita transformação do produto dessa ligação em células de *E.coli* Dh5a. Após

transformação observou-se o crescimento de uma única colônia que foi isolada e teve seu plasmídeo purificado (Figura 12A). Foi realizado PCR desta colônia com os primers da LicNTPDase2 que mostrou um único produto de amplificação (Figura 12B). Em seguida fizemos digestão do plasmídeo com as enzimas *Bam*HI e *Nhe*I e observamos em gel de agarose a liberação do inserto.

Este inserto foi purificado e inserido em vetor de expressão pET28a já digerido com as mesmas enzimas citadas acima (Figura 13A).

O produto pET28a+Inserto foi então transformado em células DH5 α , uma colônia foi isolada, o plasmídeo extraído (Figura 13B), purificado e digerido novamente com as enzimas já citadas (Figura 13C). Por fim, o plasmídeo purificado foi enviado para sequenciamento de modo a confirmar a clonagem de nosso gene de interesse. O resultado do sequenciamento foi analisado no programa Geneious 11.0.4 para confirmação da clonagem. Os resultados foram alinhados com a sequência da LicNTPDase2 (XM_001464304) como referência e confirmaram a clonagem no vetor entre os sítios de restrição escolhidos (Figuras 14 e 15)

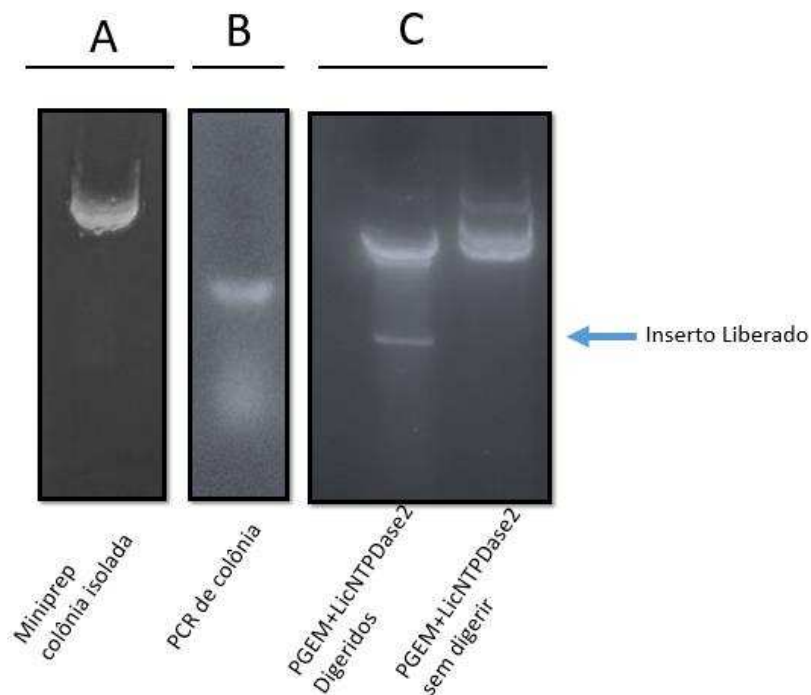


Figura 13: Passos da clonagem do gene da LicNTPDase2 em vetor PGEM-T easy. Todas as amostras foram analisadas em gel de agarose 1%. O gene da LicNTPDase2 foi amplificado, inserido em vetor de clonagem PGEM-T easy, e transformado em cepa DH5 α . Após a transformação um clone foi isolado e purificado por miniprep (A). Este mesmo clone foi submetido a PCR com os primers específicos para o gene alvo para confirmação da clonagem (B). Foi realizada também reação de digestão para confirmação da clonagem (C). Todas as amostras foram analisadas em gel de agarose 1%.

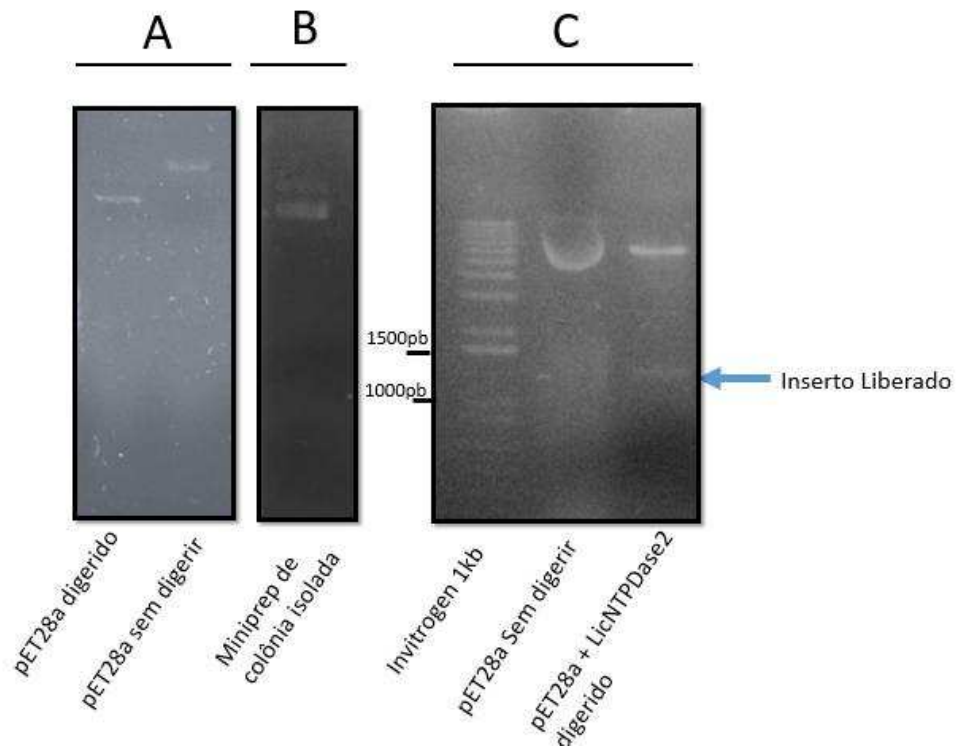


Figura 14: Passos da clonagem do gene da LicNTPDase2 em vetor pET28a. Todas as amostras foram analisadas em gel de agarose 1%. O vetor pET28a foi digerido com as enzimas de restrição e linearizado (A). O gene da LicNTPDase2 retirado por digestão do vetor pGEM purificado, inserido no vetor digerido pET28a, e transformado em cepa DH5 α . Após a transformação um clone foi isolado e purificado por miniprep (B). Este mesmo clone foi submetido à digestão para confirmação da clonagem (C). Todas as amostras foram analisadas em gel de agarose 1%.



Figura 15. Confirmação da clonagem da LicNTPDase2 em vetor pET28a por sequenciamento. Em cinza está a sequência correspondente à região transmembrana da LicNTPDase2 nativa que não foi clonada. Em verde a sequência codificante para o ectodomínio da enzima. A seta preta mostra o códon de início (ATG), a sequência correspondente a cauda de hexahistidina (N-terminal) está destacada em amarelo claro. O sítio de restrição da enzima NheI é demonstrado pela seta vermelha, enquanto o Primer FW está em azul. A Região roxa indica a sequência codificante para o sítio de proteólise da trombina que servirá para retirar a cauda de histidina. O sequenciamento se deu pelo método de Sanger.



Figura 16. Confirmação da clonagem da LicNTPDase2 em vetor pET28a por sequenciamento. Em preto está a sequência correspondente ao códon de parada (TGA) da LicNTPDase2. A região em vermelho corresponde a sequência do vetor (pET28a) que foi sequência (primers T7 foram utilizados no sequenciamento). Em verde está o sítio de restrição da enzima BamHI. A sequência do primer RV está destacado em azul. O sequenciamento se deu pelo método de Sanger.

5.4. Teste de indução e expressão solúvel da LicNTPDase2 clonada em vetor pET28a.

Após a confirmação da clonagem foi realizado teste de expressão da proteína em células de *E. coli* B121 (DE3). O primeiro teste foi realizado em 400mL de meio LB em tempos crescentes de indução, foram adicionados 0,25mM do indutor (IPTG) e a indução ocorreu a 37°C. Foram retiradas alíquotas de 100mL em cada tempo e processadas conforme item 4.12. Em uma primeira análise feita em SDS-PAGE 10% com 12 µg do extrato total da *E. coli* lisada (figura 17) foi possível verificar uma banda forte na altura da proteína purificada utilizada como controle LicNTPDase2 expressa em sistema pET21b, visualmente não houve diferença na taxa de expressão da proteína entre os tempos 1,2 e 3h (Solubilização) e praticamente toda proteína foi para corpos de inclusão.

Foi realizado ainda westerblotting (WB) como método confirmativo de que estava ocorrendo expressão. O WB feito utilizando anticorpo primário anti-hexahistidina (figura 16) teve forte marcação nas frações de solubilização (Solubilização), nas frações solúveis (Sobrenadante) quase não houve marcação visível, confirmando a expressão da proteína em corpos de inclusão.

Como nosso interesse consistia na expressão solúvel da proteína de modo a consegui-la o mais próximo de sua conformação nativa prosseguimos com os testes, foi realizado indução da proteína diminuindo a temperatura. Primeiramente induzimos a 20°C em duas concentrações diferentes de IPTG (0,25Mm e 0,5Mm). A indução ocorreu em 200mL de meio LB por 24h, e foram retiradas duas alíquotas de 100mL cada, correspondente a 0h e no final do tempo de 24h. Conforme pode ser visto na Figura 18, a indução dessa proteína permaneceu em corpos de inclusão (solubilização), sendo que nenhuma marcação ou banda apareceu em WB e gel SDS-PAGE nas frações correspondente a fração solúvel (sobrenadante). O último teste consistiu na expressão da proteína em uma temperatura intermediária (30°C), a indução ocorreu por até 5h em meio LB com 0,25Mm de IPTG, conforme pode ser observado na figura 18, nestas condições houve indução da proteína em fração solúvel, sendo a proteína encontrada em maiores concentrações após 5h de indução. É possível observar que boa parte da proteína ainda está sendo expressa em corpos de inclusão (figura 19), a expressão em corpos de inclusão é maior em 3hrs de indução havendo uma queda na intensidade da marcação em WB em 5h, sendo esta diminuição proporcional ao aumento da intensidade em 5h na fração solúvel.

Assim, há 30°C nas concentrações de IPTG e meio utilizados, após 5h a proteína tem sua maior taxa de expressão solúvel, esta condição poderá ser usada futuramente para

purificar a proteína em forma nativa e sem a cauda de histidina e assim proceder novamente à purificação de anticorpos anti-LicNTPDase2 que possam ter mais sucesso para purificar as proteínas nativas em relação àqueles utilizados no início deste trabalho.

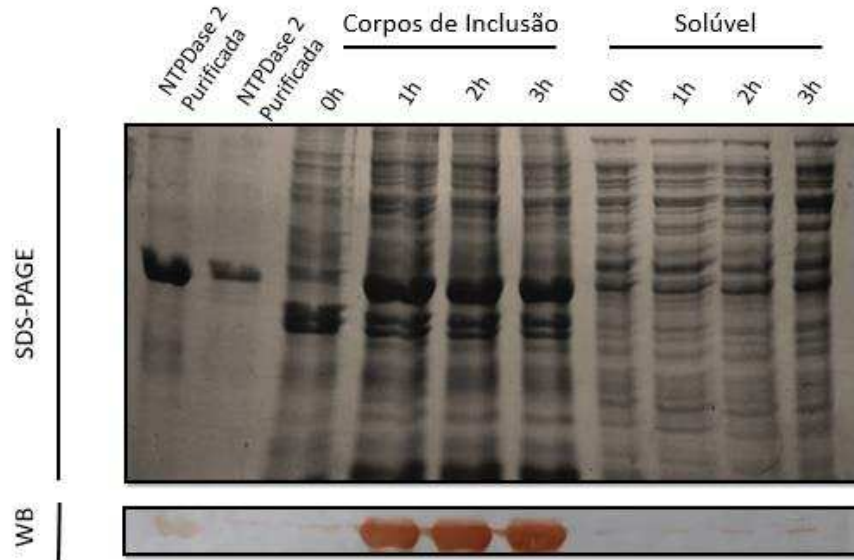


Figura 17. Indução da LicNTPDase2 recombinante em vetor pET28a. As mostras foram submetidas a SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10%, foram aplicados 12 μ g de proteínas totais em cada canaleta. Como padrão foi utilizada LicNTPDase2 expressa em vetor pET21b e purificada em coluna de níquel. A indução ocorreu em cepa B121 (DE) por até 3hrs a 37°C com 0,25mM de IPTG. Western blotting (WB), feito a partir de gel espelho ao mostrado acima. Foi usado anticorpo primário anti-His monoclonal (Sigma) na diluição 1:6000 e como anticorpo secundário foi usado o anti-IgG de camundongo conjugado com Peroxidase (1:5000).

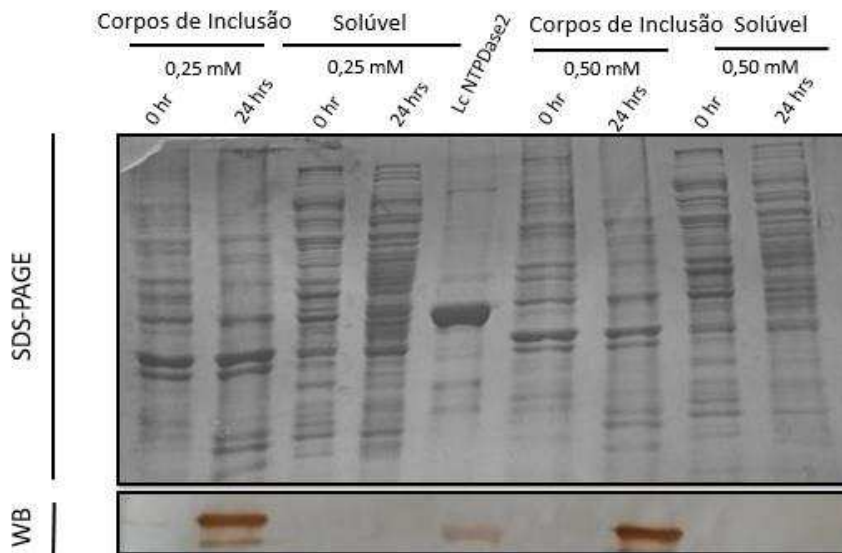


Figura 18. Indução da LicNTPDase2 recombinante em vetor pET28a. As mostras foram submetidas a SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10%, foram aplicados 15 μ g de proteínas totais em cada canaleta. Como padrão foi utilizada LicNTPDase2 expressa em vetor pet21b e purificada em coluna de níquel. A indução ocorreu em cepa B121 (DE) por 24hrs com 0,25mM ou 0,50mM de IPTG a 20°C. Western blotting (WB), feito a partir de gel espelho ao mostrado acima. Foi usado anticorpo primário anti-His monoclonal (Sigma) na diluição 1:6000 e como anticorpo secundário foi usado o anti-IgG de camundongo conjugado com Peroxidase (1:5000).

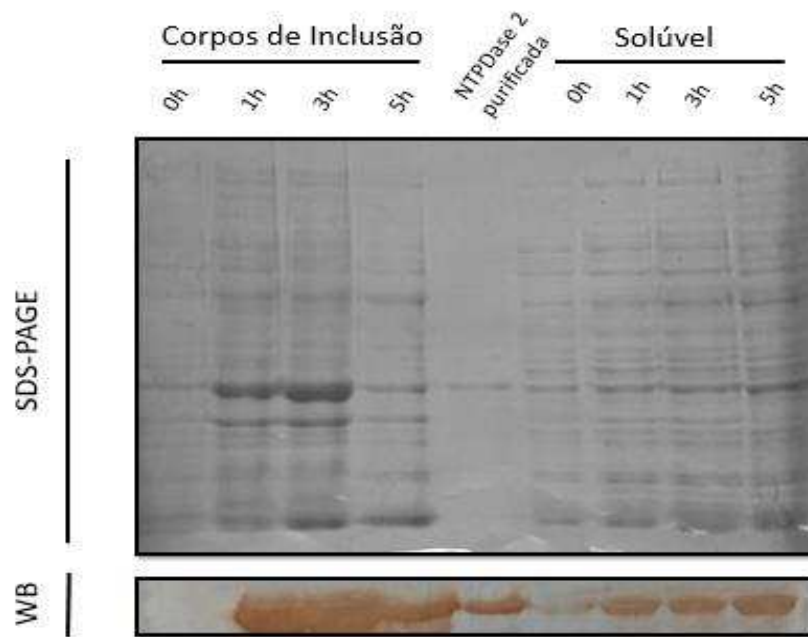


Figura 19. Indução da LicNTPDase2 recombinante em vetor pET28a. As mostras foram submetidas a SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10%, foram aplicados 12 μ g de proteínas totais em cada canaleta. Como padrão foi utilizada LicNTPDase2 expressa em vetor pet21b e purificada em coluna de níquel. A indução ocorreu em cepa B121 (DE) por até 5hrs com 0,25mM ou 0,50mM de IPTG a 30°C. Western blotting (WB), feito a partir de gel espelho ao mostrado acima. Foi usado anticorpo primário anti-His monoclonal (Sigma) na diluição 1:6000 e como anticorpo secundário foi usado o anti-IgG de camundongo conjugado com Peroxidase (1:5000).

5.5 Produção de anticorpo contra epítipo linear de LicNTPDase2 recombinante

Um outro problema que temos enfrentados cotidianamente é a dificuldade de reconhecimento das LicNTPDases nativas por western blot pelo anti-soro policlonal anti LicNTPDase2 produzida no sistema pET21 anteriormente (Vasconcellos 2010). Atribuímos esta dificuldade à presença de anticorpos contra a cauda de histidina, bem como à pouca presença de anticorpos lineares para a porção da proteína LicNTPDase2. Assim além de produzir a proteína em sistema capaz de retirar a cauda de histidina, resolvemos nos adiantar e utilizar a proteína que já temos purificada produzida em pET21b agora controladamente desnaturada, para então imunizar coelho e produzir anti-soro mais dedicado à epítipos lineares que são essenciais no reconhecimento por WB. Assim, a proteína LicNTPDase2 expressa em pET21b e purificada foi desnaturada por calor (item 4.16) e utilizada para produção de soro policlonal contra epítipos lineares. Para análise da produção de anticorpos presentes no soro foi realizado Dot Blot. O resultado indicou a produção de anticorpos anti LicNTPDase2, sendo estes anticorpos capazes de reconhecer a proteína purificada em títulos de até 1:102.400 (Figura 19). Não houve

marcação no controle negativo nas diluições utilizadas e o controle positivo foi realizado utilizando soro produzido por Vasconcellos, (2010).

Para confirmar que o soro produzido seria capaz de reconhecer a proteína recombinante e as enzimas nativas do parasito foi feito um “western blotting” com extrato de *L. infantum chagasi* em duas condições: Promastigotas em fase logarítmica de crescimento e Amastigota Axênico induzido por temperatura (37°C). A Figura 20 nos mostra que houveram marcações em ambos extratos. A proteína LicNTPDase2 recombinante de aproximadamente 45kDa foi utilizada como controle positivo do experimento. Usando como base a altura na qual a proteína recombinante aparece é possível observar uma marcação muito acima no extrato em fase logarítmica, indicando que possa se tratar da isoforma maior nativa (LicNTPDase1). Já o extrato com amastigotas axênicos (37°C), temos uma marcação próxima a altura da LicNTPDase2 recombinante, indicando ser sua isoforma correspondente nativa do parasito. Além disso, no mesmo extrato é possível observar uma segunda marcação abaixo de 45kDa, talvez devido à parcial degradação ou alguma modificação pós traducional natural como proteólise dirigida que desconhecemos.

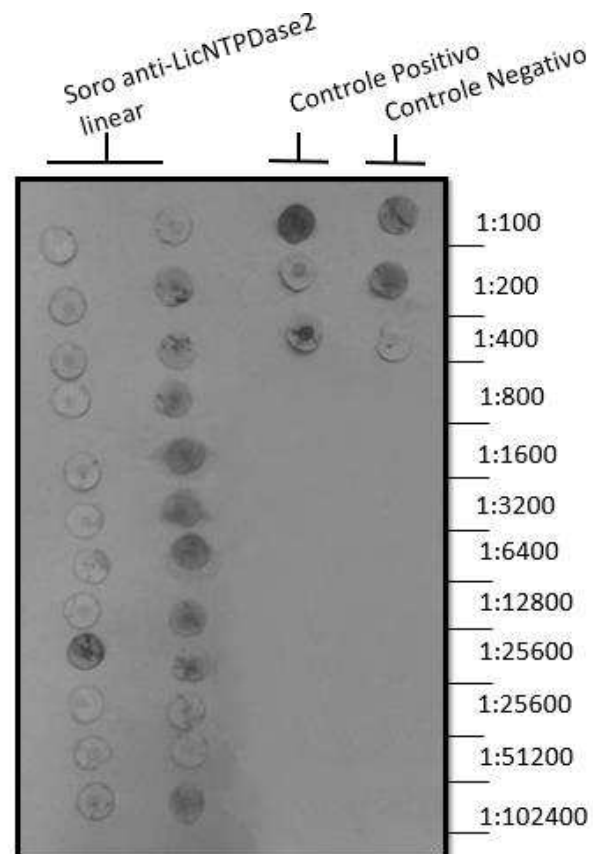


Figura 20. Avaliação da produção de anticorpos anti-LicNTPDase2 linear. “Dot Blotting” do soro imune feito em duplicata (primeira e segunda coluna). Como controle positivo foi utilizado soro produzido por Vasconcellos, (2010). Foram utilizados 1µg de proteína purificada em conformação linear (8M uréia) em cada membrana. Como anticorpo secundário foi utilizado IgG anti-Fc de coelho (Sigma) 1:6000.

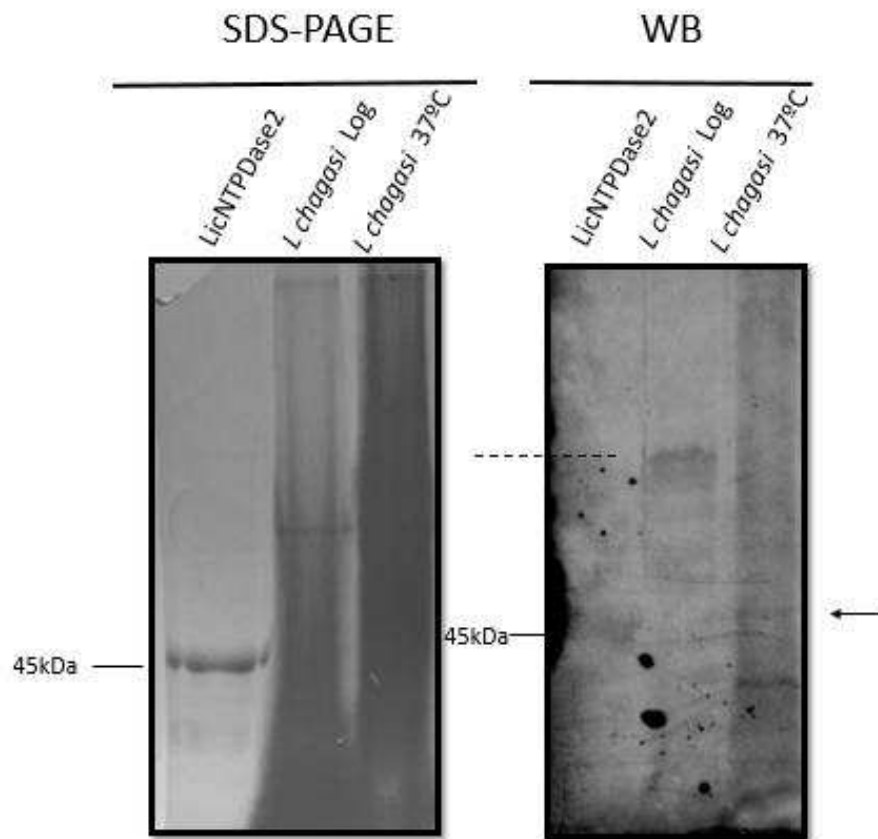


Figura 21. Gel SDS-PAGE e western blotting com extrato total de *L. infantum chagasi* em duas fases distintas. Foi utilizado soro anti-LicNTPDase2 linear 1:100, como secundário foi utilizado IgG anti-Fc de coelho conjugado com FITC (Sigma). Foi utilizado proteína LicNTPDase2 purificada como controle do western blotting. Seta preta e a linha pontilhada indicam marcações em alturas acima da proteína recombinante utilizada como controle. Foram aplicados 30 μ L de extrato de Promastigota em fase logaritmica e 30 μ L de extrato Amastigota (37°C).

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, inicialmente abordamos a técnica de imunoprecipitação como forma de tentar purificar as LicNTPDases nativas, uma vez que nenhum trabalho ainda foi feito com estas enzimas purificadas na forma nativa direto do parasito. A técnica de imunoprecipitação para purificação de proteínas nativas se trata de uma técnica em pequena escala para obtenção de proteína a partir de extratos celulares utilizando a reação de especificidade antígeno-anticorpo como base. Nesta técnica anticorpos são imobilizados em um suporte sólido (resina de agarose, sefarose, “beads” magnéticas, etc...) e incubados com uma solução contendo a proteína de interesse, diversas etapas de lavagem, centrifugação e por fim eluição ocorrem de modo que no final a proteína purificada seja obtida (CORTHELL, 2014).

Assim construímos uma resina de afinidade ligada a anticorpos policlonais anti-LicNTPDase2 recombinante e usamos esta resina para purificar as LicNTPDases nativas a partir de extratos proteicos de promastigotas de *L. infantum chagasi*. Observamos a presença de marcação no extrato total, sobrenadante e VNL (figura 6) em altura inferior à da LicNTPDase2 recombinante e não observamos qualquer proteína na fração da Eluição. Estes resultados podem ser fruto de uma solubilização incompleta ou parcial da LicNTPDase2 nativa uma vez que esta se trata de uma proteína possivelmente ancorada à membrana (VASCONCELLOS et al., 2014), ou até mesmo ocasionada por degradação proteica e ineficiência da resina de afinidade em ligar as enzimas nativas.

Para purificação de proteínas de membrana se faz necessário a utilização de detergentes, sendo preferido a utilização de detergentes não iônicos de modo a solubilizar estas proteínas sem desnaturá-las, deve se ainda utilizar estes detergentes em concentrações que não afetem a interação antígeno-anticorpo, o que acaba limitando a utilização de detergentes mais agressivos como os detergentes iônicos em concentrações superiores a 0,05% (HARLOW; LANE, 1988).

Além do mais, o método de imunoprecipitação possui diversas barreiras que precisam ser superadas para que possamos obter o resultado esperado. O primeiro é a montagem da coluna uma vez que são necessários anticorpos específicos contra a proteína de interesse a produção desses anticorpos pode afetar o objetivo final.

Neste trabalho foi utilizado anticorpo contra LicNTPDase2 produzido por Vasconcellos, (2010). Na ocasião para produção de anticorpo foi utilizada proteína

recombinante contendo uma região adicional com seis resíduos de histidina (cauda de histidina ou His-Tag). Estes seis resíduos possuem potencial imunogênico, fazendo com que anticorpos contra esta região sejam produzidos durante inoculação, afetando o título final de anticorpos contra a proteína alvo (DODSON et al., 2007). Isto pode ser observado nos ensaios de imunomarcção realizados por Bastos, (2014) no qual o título de anticorpos anti-LicNTPDase2 necessário para detecção da proteína nativa em extratos de *Leishmania* foi 1600 vezes mais concentrado que o necessário para a proteína recombinante purificada conforme foi observado por Vasconcellos, (2010). A purificação dos anticorpos utilizando proteína recombinante contendo cauda de hexahistidina pode ter sido um agravante, de modo que os anticorpos obtidos fossem em grande parte contra a sequência de hexahistidina (RANCOUR; BACKUES; BEDNAREK, 2010). Assim, optamos por inserir a sequência da LicNTPDase2 em um vetor de expressão (pET28a) que nos permita a retirada dessa sequência e posterior produção de anticorpos (Figuras 14,15,16).

A quantidade de proteína nativa expressa pelo parasito também limita sua obtenção após purificação uma vez que grandes volumes de células são necessários para que se possa obter pequenas quantidades finais de proteína purificada o que limitaria a viabilidade do teste. Desse modo optamos por avaliar por qPCR sobre quais condições os mRNA para ambas isoformas seriam mais expressos pelo parasito de modo a maximizar sua obtenção na purificação.

Além disso, devido a seu potencial no processo de infecção e modulação da resposta imune do hospedeiro (DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA et al., 2008; GOMES et al., 2015; PIMENTEL et al., 2016; SANTOS et al., 2009; VASCONCELLOS et al., 2014) o estudo da expressão dessas proteínas durante as fases evolutivas do parasito se torna importante para compreender melhor o papel de cada isoforma.

Conforme pode ser observado na figura 10 a isoforma maior (LicNTPDase1 ~70kDa), apresenta sua expressão aumentada na forma promastigota em estágio logaritmico de crescimento, este resultado condiz com o avaliado em experimento de secreção no qual foi possível observar a secreção da LicNTPDase1 por promastigotas de *L. infantum chagasi* (artigo em desenvolvimento, capítulo 2), estes resultados sugerem a possível ação desta enzima no metabolismo, nutrição e/ou proliferação celular, bem como pode indicar sua presença nos momentos iniciais da infecção. Bastos, (2010) observou que a LicNTPDase1 recombinante apresentava atividade enzimática aumentada quando submetida a pH ácido (5,5-6,0), neste trabalho demonstramos que em pH ácido (5,5) há o

aumento da expressão desta isoforma pelos parasitos (figura 10). Estes resultados juntos demonstram que esta enzima possui preferência por condições acidófilas, é possível que a LicNTPDase1 seja secretada no interior do vacúolo parasitóforo e atuando nos momentos iniciais da infecção. Bastos, (2010) discutiu sobre o possível papel da LicNTPDase1 no processo de metaciclogênese do parasito. A parte abdominal do trato digestivo de flebotomínios durante o repasto sanguíneo possui pH alcalino e um grande aporte de nutrientes. Estas condições são favoráveis para proliferação do parasito que se encontra em fase logaritmica de desenvolvimento. Porém, com o passar do tempo esta região abdominal vai se acidificando e este processo induz a diferenciação dos parasitos para forma metacíclica (GONTIJO et al., 1998). Assim, devido a atividade maior em pH ácido e sua expressão aumentada nessas condições, parece possível que esta enzima atue de algum modo no processo de metaciclogênese do parasito.

A isoforma menor LicNTPDase2 apresentou maior expressão gênica na fase amastigota (axênica) induzida por temperatura (37°C), sendo sua expressão aumentada aproximadamente 4 vezes quando comparada com sua forma promastigota em fase logaritmica (figura 11). Também foi possível observar seu aumento em promastigotas em fase estacionária. Esta fase é conhecida por ser possível encontrar maior quantidade *in vitro* de formas metacíclicas do parasito (DA SILVA; SACKS, 1987). Uma vez que esta se trata de uma enzima possivelmente ancorada à membrana e envolvida na adesão do parasito à célula hospedeira é realmente possível que sua expressão esteja aumentada na fase infecciosa do parasito (metacíclica) e na forma amastigota induzida por calor, uma vez que após a internalização do promastigota na célula hospedeira a infecção é mantida por formas amastigotas que se rompem e se aderem em novas células para serem novamente internalizadas. Além disso Vasconcellos et al., 2014 mostrou a abundante expressão de LicNTPDases por amastigotas em lesão de cão. Nossos dados demonstram o aumento da expressão do mRNA em amastigota induzido a 37°C sendo então compatível com os dados de Vasconcellos também em amastigotas que vivem a 37°C nas vísceras do cão.

Diversos autores já demonstraram o papel dessa família de enzimas em conjunto com a 5' nucleotidase na hidrólise de ATP até adenosina e o consequente efeito disso na sinalização purinérgica e modulação da resposta imune do hospedeiro (DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA et al., 2008; GOMES et al., 2015; VASCONCELLOS et al., 2014). Desse modo, o aumento da expressão da LicNTPDase2 por formas amastigotas axênicas induzidas por calor reforça o papel dessa na infecciosidade do parasito.

Outro fato importante se dá pela capacidade da espécie (*L. infantum chagasi* e *L. donovani*) em causar uma forma de doença diferente das demais espécies (Leishmaniose Visceral), sendo a resistência dessa espécie a temperaturas de 37°C ou próximas, uma das características que as permitem sobreviverem e se multiplicarem em órgãos como baço e fígado uma vez que estes órgãos apresentam temperaturas superiores a da pele (CALLAHAN et al., 1996). Somando a isso, trabalho realizado por Alcolea et al., (2010) mostrou que a diferenciação de formas promastigotas para amastigotas em *L. infantum chagasi* ocorre principalmente em função da mudança de temperatura ao qual o parasito é exposto no interior de flebotomínios (~ 25°C) para 32-37°C no hospedeiro mamífero, sendo que a diminuição do pH contribui pouco para diferenciação na forma amastigota. Os dados de expressão destas enzimas e localização celular obtidos até o momento indicam que elas possam atuar de forma separada em diferentes momentos e compartimentos celulares do parasito e que ambas são importantes para o ciclo de vida do parasito, estabelecimento e manutenção da infecção.

A clonagem vetor pET28a nos permite novas opções de estudo desta enzima. A maior vantagem da expressão nesse vetor consiste na possibilidade de retirada da cauda de hexahistidina de modo que anticorpos específicos contra epitopos desta proteína possam ser obtidos e utilizados em ensaios como o de imunoprecipitação. Outro fator importante a se considerar é a possibilidade desta sequência adicional de aminoácidos interferir na estrutura da proteína, afetando em alguns casos seu sítio ativo (MAJOREK et al., 2014), assim a remoção desta sequência hexahistidina se faz ainda muito útil para ensaios de cristalografia (DEREWENDA, 2004).

No sistema pET28 a expressão inicial da proteína resultou na formação de grandes agregados insolúveis de proteína (corpos de inclusão) (figura 17), esta estrutura é formada devido a alta taxa de síntese proteica que acaba por superar a capacidade do organismo de enovelar corretamente a proteína, ocorre especialmente em organismo como bactérias que possuem capacidade limitada de realizar modificações pós traducionais. Em alguns casos a formação de corpos de inclusão pode ser evitada diminuindo a temperatura de expressão de modo a retardar a maquinaria de síntese proteica do microorganismo, dando tempo para as proteínas se enovelarem corretamente (DEREWENDA, 2004). A expressão da LicNTPDase2 a 20°C fez com que a mesma permanecesse quase que totalmente insolúvel, além do mais a diminuição da temperatura fez com a taxa de expressão diminuísse quando comparada com indução realizada a 37°C (figura 17 e 18). Já na indução realizada a 30°C

conseguimos observar que boa parte da proteína passava a ser expressa na sua forma nativa em 5h de indução (figura 19). Embora ainda houvesse expressão da mesma em corpos de inclusão visualmente, a proporção solúvel/insolúvel parece ser próxima de 50%-50% em 5h. Talvez a expressão nessa temperatura (30°C) por um período de tempo maior leve a totalização da expressão solúvel da mesma, essa hipótese deverá ser testada para se confirmar. A expressão solúvel desta proteína alinhada com a retirada da sequência de hexahistidina graças a clonagem em vetor pET28a poderá nos fornecer informações sobre estrutura e atividade próximas da condição selvagem.

Por fim, objetivando conseguir uma melhor ferramenta para ensaios de westernblotting foram produzidos anticorpos contra epítomos lineares de LicNTPDase2 ainda contendo a cauda His pois na ocasião não tínhamos ainda a proteína purificada expressa no sistema pET28a para retirar a cauda de histidina. Então optamos por inocular a proteína expressa em pET21b e purificada, porém desnaturada por calor. O soro apresentou alto título de anticorpos contra a proteína (figura 20). Além disso verificamos a presença das duas isoformas nativas de NTPDase de *L. infantum chagasi* em extrato total. Em extratos de promastigotas em fase log de crescimento obtivemos apenas uma marcação em altura muito superior a 45kDa (LicNTPDase2 recombinante), enquanto em amastigotas axênicos induzidos por temperatura (37°C) observamos duas marcações: Uma próxima de 45kDa, sendo um pouco acima desta altura e outra abaixo (figura 21). Bastos, (2014) provou por western blotting a expressão de ambas isoformas em promastigotas de *L. infantum chagasi* utilizando soro produzido por (VASCONCELLOS, 2010). Neste trabalho apenas a isoforma maior da enzima foi detectada em promastigotas, apesar das proteínas presentes nos extratos não terem sido quantificadas, é possível que menos proteínas totais foram aplicadas neste experimento e apenas a isoforma maior detectada por ser mais expressa nessas condições (figura 10). O mesmo ocorreu com a isoforma menor da enzima, sendo detectada apenas em amastigotas axênicos induzidos por temperatura (37°C), fase na qual mostramos ser mais expresso o RNAm (figura 11). O objetivo principal era provar a capacidade dos anticorpos produzidos em reconhecer as proteínas nativas e LicNTPDase2 recombinante, sendo assim optou-se por não quantificar as proteínas totais nos extratos, sendo aplicado apenas volumes iguais de amostras de extrato (30 µl).

7. CONCLUSÕES

Apesar das tentativas de purificar as LicNTPDases nativas, ainda não foi possível atingir este objetivo.

Em relação ao nível de RNAm, a LicNTPDase1 é mais expressa em fase logaritmica de crescimento e tem sua expressão aumentada em amastigota induzido por acidificação o que indica seu papel no desenvolvimento do parasito e em condições acidófilas. Já a LicNTPDase2 possuiu maior expressão de RNAm em amastigota e tem sua expressão aumentada em função da temperatura o que reforça a atuação dessa enzima no estabelecimento da infecção.

Foi possível clonar e expressar a LicNTPDase2 em sua forma solúvel em vetor de expressão pET28a.

Foi possível produzir antisoro contendo anticorpos lineares contra a LicNTPDase com cauda de histidina que foram capazes de reconhecer as LicNTPDases nativas.

8. REFERÊNCIAS

- ALCOLEA, P. J. et al. Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, 2010.
- ALCOLEA, P. J. et al. In vitro infectivity and differential gene expression of *Leishmania infantum* metacyclic promastigotes: Negative selection with peanut agglutinin in culture versus isolation from the stomodeal valve of *Phlebotomus perniciosus*. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, 2016.
- ANSARI, M. Y. et al. Recent advancement and treatment of leishmaniasis based on pharmacoinformatics approach: Current and future outlook. **Gene Reports**, v. 9, n. August, p. 86–97, 2017.
- BARRETT, M. P. The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 13, n. 1, p. 11–6, 1997.
- BASTOS, M. S. et al. The expression of NTPDase1 and -2 of *Leishmania infantum* chagasi in bacterial and mammalian cells: Comparative expression, refolding and nucleotidase characterization. **Protein Expression and Purification**, v. 131, p. 60–69, 2017.
- BASTOS, M. S. E. Expressão das NTPDases 1 E 2 DE *Leishmania infantum* chagasi EM SISTEMA BACTERIANO E CÉLULAS DE MAMÍFERO E ESTUDO DE SUAS INFLUÊNCIAS NA INFECÇÃO DE CÉLULAS RAW 264.7 NA EXPRESSÃO DE PURINORECEPTORES P2. **Tese de doutorado**, 2014a.
- BASTOS, M. S. E. **Expressão das NTPDases 1 E 2 DE *Leishmania infantum* chagasi em sistema bacteriano e células de mamífero e estudos de suas influências na infecção de células RAW 264.7 na expressão de purinosreceptores P2.** [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2014b.
- BASTOS, M. S. E. **Expressão heteróloga e caracterização bioquímica e biológica da NTPDase1 de *Leishmania infantum* chagasi.** [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.
- BIGONNESSE, F. et al. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. **Biochemistry**, v. 43, n. 18, p. 5511–5519, 2004.
- BRITTINGHAM, A. et al. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 155, n. 6, p. 3102–3111, 1995.

- CALLAHAN, H. L. et al. Leishmania spp: Temperature sensitivity of promastigotes in vitro as a model for tropism in vivo. **Experimental Parasitology**, v. 84, n. 3, p. 400–409, 1996.
- CEKIC, C.; LINDEN, J. Purinergic regulation of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 3, p. 177–192, 2016.
- CORTHELL, J. T. Immunoprecipitation. **Basic Molecular Protocols in Neuroscience: Tips, Tricks, and Pitfalls**, p. 77–81, 2014.
- CUERVO, P. et al. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of Leishmania (Viannia) braziliensis promastigotes. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 1, p. 79–92, 2009.
- CUNHA, L. C. S. **Imunolocalização da Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase 1 (NTPDase-1) de Ttypanossoma Cruzi**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.
- DA SILVA, R.; SACKS, D. L. Metacyclogenesis is a major determinant of Leishmania promastigote virulence and attenuation. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 11, p. 2802–2806, 1987.
- DANTAS-TORRES, F. et al. Cutaneous and visceral leishmaniosis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3–4, p. 313–317, 2010.
- DAS, S. et al. Combination of paromomycin and miltefosine promotes TLR4-dependent induction of antileishmanial immune response in vitro. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 10, p. 2373–2378, 2012.
- DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA, E. et al. Extracellular nucleotide metabolism in Leishmania: influence of adenosine in the establishment of infection. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 8, p. 850–857, 2008.
- DEAGLIO, S. et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 6, p. 1257–65, 2007.
- DE SOUZA, M. C. et al. The influence of ecto-nucleotidases on Leishmania amazonensis infection and immune response in C57B/6 mice. **Acta Tropica**, v. 115, n. 3, p. 262–269, 2010.
- 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 Tropica**, v. 125, n. 1, p. 60–66, 2013.
- DEREWENDA, Z. S. The use of recombinant methods and molecular engineering in protein crystallization. **Methods**, v. 34, n. 3, p. 354–363, 2004.
- DODSON, S. E. et al. Production of Antisera Using Fusion Proteins. **Current Protocols in Neuroscience**, n. July, p. 1–26, 2007.

- DOS PASSOS LEMOS, A. et al. Ectonucleotide diphosphohydrolase activity in *Crithidia deanei*. **Parasitology Research**, v. 88, n. 10, p. 905–911, 2002.
- DUARTE, M. C. et al. Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 4, p. 398–407, 2016.
- EMANUELSSON, O. et al. Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence. **Journal of Molecular Biology**, v. 300, n. 4, p. 1005–1016, 2000.
- FIETTO, J. L. R. et al. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, n. 2, p. 454–460, 2004.
- GERSHKOVICH, P. et al. Pharmacokinetics and biodistribution of amphotericin B in rats following oral administration in a novel lipid-based formulation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 1, p. 101–108, 2009.
- GOMES, R. S. et al. E-NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) of *Leishmania amazonensis* inhibits macrophage activation. **Microbes and Infection**, v. 17, n. 4, p. 295–303, 2015.
- GONTIJO, N. F. et al. *Lutzomyia longipalpis*: pH in the gut, digestive glycosidases, and some speculations upon *Leishmania* development. **Experimental Parasitology**, v. 90, n. 3, p. 212–219, 1998.
- GOTO, H.; PRIANTI, M. D. G. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 51, n. 5, p. 241–246, 2009.
- GREGORY, D. J.; OLIVIER, M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. **Parasitology**, v. 130, n. S1, p. S27, 2005.
- GUPTA, N.; GOYAL, N.; RASTOGI, A. K. In vitro cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. **Acta Tropica**, v. 83, n. 3, p. 37–42, 2002.
- HARLOW, E.; LANE, D. Antibodies, a Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, n. 28, p. 649–654, 1988.
- IVANENKOV, V. V.; MELLER, J.; KIRLEY, T. L. Characterization of disulfide bonds in human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 (NTPDase3): Implications for NTPDase structural modeling. **Biochemistry**, v. 44, n. 25, p. 8998–9012, 2005.
- KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439–445, 2006.

- KAVRAN, J. M. D. J. L. Coupling Antibody to Cyanogen Bromide-Activated Sepharose. **Methods Enzymol**, v. 27, n. 4, p. 339–351, 2009.
- KUKULSKI, F. et al. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. **Purinergic Signalling**, v. 1, n. 2, p. 193–204, 2005.
- KUMAR, R.; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clinical & Translational Immunology**, v. 3, n. 3, p. e13, 2014.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). **Ann Parasitol Hum Comp**, v. 63, n. 2, p. 134–145, 1988.
- LANGSTON, H. P. et al. Secretion of IL-2 and IFN- γ , but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 170, n. 6, p. 2962–70, 2003.
- LARIONOV, A.; KRAUSE, A.; MILLER, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. **BMC bioinformatics**, v. 6, p. 62, 2005.
- LAZAROWSKI, E. R. Mechanisms of Release of Nucleotides and Integration of Their Action as P2X- and P2Y-Receptor Activating Molecules. **Molecular Pharmacology**, v. 64, n. 4, p. 785–795, 2003.
- LIMA, M. H. F. et al. *Leishmania infantum* parasites subvert the host inflammatory response through the adenosine A2A receptor to promote the establishment of infection. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JUL, p. 1–12, 2017.
- LONGHI, M. S. et al. Biological functions of ecto-enzymes in regulating extracellular adenosine levels in neoplastic and inflammatory disease states. **Journal of Molecular Medicine**, v. 91, n. 2, p. 165–172, 2013.
- LÓPEZ, Y. et al. Sandfly *Lutzomyia longipalpis* in a cutaneous leishmaniasis focus in Central Colombia. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 4, p. 415–419, 1996.
- MAIA, A. C. R. G. et al. Occurrence of a conserved domain in ATP diphosphohydrolases from pathogenic organisms associated to antigenicity in human parasitic diseases. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 10, p. 1059–1067, 2011.
- MAIOLI, T. U. et al. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. **Parasitology Research**, v. 94, n. 3, p. 207–212, 2004.
- MARIOTINI-MOURA, C. et al. *Trypanosoma cruzi* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion. **Acta Tropica**, v. 130, n. 1, p. 140–147, 2014.
- MARZOCHI, M. C. D. A. et al. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: Eco-

epidemiological aspects and control. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 570–580, 2009.

MINISTÉRIO DE AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Nota Técnica Nº 11/2016/Cpv/Dfip/Sda/Gm/Mapa**. Nota Técnica. **Anais...2016** Disponível em: <<http://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>>

MÖLLER, S.; CRONING, M. D.; APWEILER, R. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 17, n. 7, p. 646–653, 2001.

MURPHY-PIEDMONTE, D. M.; CRAWFORD, P. A.; KIRLEY, T. L. Bacterial expression, folding, purification and characterization of soluble NTPDase5 (CD39L4) ecto-nucleotidase. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1747, n. 2, p. 251–259, 2005.

MURPHY, D. M.; IVANENKOV, V. V.; KIRLEY, T. L. Bacterial Expression and Characterization of a Novel , Soluble , Calcium-Binding ,. **Biochemistry**, p. 2412–2421, 2003.

O'KEEFFE, M. G. et al. Developmentally regulated expression of ectonucleotidases NTPDase5 and NTPDase6 and UDP-responsive P2Y receptors in the rat cochlea. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 133, n. 4, p. 425–436, 2010.

PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785–786, 2011.

PIMENTEL, F. G. et al. The Leishmania-Macrophage Interactions: Role of E-NTPDases and Purinergic Signaling. **Macrophage**, n. CL, p. 1–13, 2016.

QUEIROZ, M. J.; ALVES, J. G.; CORREIA, J. B. [Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area]. **Jornal de Pediatria**, v. 80, p. 141–146, 2004.

RANCOUR, D. M.; BACKUES, S. K.; BEDNAREK, S. Y. **Immunoelectron Microscopy**. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. v. 657

RIBEIRO, H. A. L. et al. Modeling Immune Response to Leishmania Species Indicates Adenosine As an Important Inhibitor of Th-Cell Activation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. July, p. 1–13, 2017.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458–1461, 2006.

ROBERTSON, W. H.; JOHNSON, M. A. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 173–213, 2003.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance.

Purinergic Signalling, v. 2, n. 2, p. 409–430, 2006.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in latin America - A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 1, 2010.

SANSOM, F. M. et al. A bacterial ecto-triphosphate diphosphohydrolase similar to human CD39 is essential for intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 1922–1935, 2007.

SANSOM, F. M.; ROBSON, S. C.; HARTLAND, E. L. Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 72, n. 4, p. 765–781, Table of Contents, 2008.

SANTANA, I. U. et al. Visceral leishmaniasis mimicking systemic lupus erythematosus: Case series and a systematic literature review. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 44, n. 6, p. 658–665, 2015.

SANTOS, R. F. et al. Influence of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 3, 2009.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: Distribution, physiology and their control. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 45, n. 4, p. 255–272, 2008.

VASCONCELLOS, R. D. S. **Expressão heteróloga e caracterização bioquímica da nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase-2 (NTPDase-2) de *Leishmania infantum chagasi***. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

VASCONCELLOS, R. D. S. et al. *Leishmania infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 is an Apyrase Involved in Macrophage Infection and Expressed in Infected Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, 2014.

VASCONCELLOS, R. D. S. **Estudo bioquímico, biológico e busca por inibidores da nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase-2 (LicNTPDase-2) de *Leishmania infantum chagasi* como estratégia para o desenho racional de drogas**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2014.

VIJAYAMAHANTESH et al. Adenosine generated by ectonucleotidases modulates the host immune system during visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 91, p. 170–179, 2017.

WANG, T.; GUIDOTTI, G. CD39 Is an Ecto-(Ca,Mg)-apyrase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 17, p. 9898–9901, 26 abr. 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. **Weekly epidemiological record**, v. 38, p. 557–572, 2017.

ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Characterization of rat NTPDase1, -2, and -3 ectodomains

refolded from bacterial inclusion bodies. **Biochemistry**, v. 46, n. 42, p. 11945–11956, 2007.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 362, n. 4–5, p. 299–309, 2000.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 3, p. 437–502, 2012.

Capítulo II

ECTO-NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE DIPHOSPHOHYDROLASE (E-
NTPDASE) IS SECRETED BY *Leishmania infantum chagasi*
PROMASTIGOTES

**Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) is secreted by
Leishmania infantum chagasi promastigotes**

Running title: Secreted *L. infantum chagasi* E-NTPDase

Authors: Victor Hugo Ferraz da Silva^{1,3}, Claudia Miranda de Oliveira², Nancy da Rocha Torres^{1,3}, Eduarda Melo de Abreu Vieira¹, Géssica Cabral Barros¹, Joice de Melo Agripino¹, Anna Cláudia Alves de Souza¹, Luciana Ângelo de Souza¹, Matheus Silva e Bastos^{1,4}, Patrick Fernandes da Silva³, Márcia Rogéria de Almeida¹, Gustavo Costa Bressan¹, Abelardo Silva-Júnior, Raphael de Souza Vasconcellos¹, Juliana Lopes Rangel Fietto¹

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa, MG, Brazil.

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Alagoas

³ Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa, MG, Brazil.

⁴ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Corresponding author: Juliana Lopes Rangel Fietto- Phone (+55) 31 3899 2374; Fax: (+55) 31 3899 2373. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs s/n, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. E-mail: jufietto@ufv.br; jufietto@gmail.com.

Abstract: *Leishmania infantum chagasi* has two known isoforms of ectonucleotidases from E-NTPDase family: NTPDase-1 (~70 kDa) and NTPDase-2 (~40kDa). These enzymes are known as possible virulence factors and there are evidences of their participation in important processes for the establishment of infection like adhesion and infection of host cells and the influence on host purinergic signaling. Those actions are dependent of ecto-localization of those enzymes as ecto-membrane or secreted proteins. Until now only evidences of ecto-membrane localization are shown and the secretion was not evaluated. In this context, the aim of this work was to evaluate the possible secretion of those enzymes which is important to direct the research in the field. In this work we used *in silico* analyses to predict the localization of E-NTPDases and done the confirmation of secretion using immunolocalization by electron microscopy and western blot. We observed the presence of a putative secretion signal peptide only in E-NTPDase-1. The analyses by electron microscopy showed staining in the membrane and evidences of secretion to the extracellular medium. The Western blot confirmed the secretion of a protein of ~70kDa compatible with the isoform E-NTPDase-1.

Keywords: E-NTPDase, *Leishmania infantum chagasi*, protein secretion

Sponsorships: The authors gratefully acknowledge the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

1. INTRODUCTION

Leishmaniasis is a zoonotic disease caused by protozoans of the genus *Leishmania*, this parasite is capable of generate a spectrum of diseases in humans ranging from localized cutaneous lesions to disseminated lesions and visceral infection. The visceral form of the disease can be lethal if left untreated. *Leishmania Infantum chagasi* is the main specie responsible for the visceral form of disease in New World (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). The parasite has a heteroxenic life cycle with an invertebrate host and another vertebrate host and is transmitted to the mammalian host by the bite of sandfly vector of the genus *Lutzomyia* or the genus *Phlebotomus* (ROBERTSON; JOHNSON, 2003).

Leishmania has two main morphological forms: the flagellate promastigotes wich are found in the anterior portions of the digestive tract of the invertebrate host and the intracellular amastigote form found in macrophages 12-24 hours after internalization of the metacyclic promastigotes by the host cell (KUMAR; ENGWERDA, 2014). This parasite has several known ways of modulating and evading the immune system (BRITTINGHAM et al., 1995; GREGORY; OLIVIER, 2005), one of this are throughout the action of ectonucleotidases, like E-NTPDase/CD39 family and ecto 5'-Nucleotidase (5'-NT) family, that are together capable to control the concentration of extracellular nucleotides like ATP, ADP, AMP and the nucleobase Adenosine (ADO)(LONGHI et al., 2013). The extracellular nucleotides are known as purinergic signals acting at purinergic receptors to exert their biological effects. Special attention had been done to ATP as a pro-inflammatory molecule and to Adenosine (ADO) as an immunomodulatory molecule (RIBEIRO et al., 2017). In this context, at least *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani* and *L. infantum* modulate the host immune system using the enzymatic system of ectonucleotidases. (DE SOUZA et al., 2010; GOMES et al., 2015; LIMA et al., 2017; MAIOLI et al., 2004; RIBEIRO et al., 2017)

There are two known isoforms in E-NTPDase described to *L. infantum chagasi*: the

LicNTPDase1 (~70 kDa) and the LicNTPDase2 (~40kDa) (BASTOS et al., 2017; VASCONCELLOS et al., 2014). These enzymes participates at adhesion and infection to the host cell and modulation of the host immune system (DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA et al., 2008; GOMES et al., 2015; VASCONCELLOS et al., 2014). The evidenced of the main roles of E-NTPDases to Leishmania infection had been used to open new frontiers of biotechnological applications like the use of those enzymes in the immunodiagnostic approaches to canine and human Leishmaniases (DE SOUZA et al., 2013; MAIA et al., 2011). Concerning *L. infantum chagasi* there is a gap in the literature in relation to the possible secretion of E-NTPDases. This work shows evidences that at least LicNTPDase-1 seems to be secreted.

2. MATERIALS AND METHODS:

***IN SILICO* BIOINFORMATICS ANALYSIS**

LicNTPDase1 sequence (XM_001463628.1) and LicNTPDase2 (XM_001464304) were *in silico* analyzed as described below: for the prediction of signal peptide presence and subcellular location we used SignalP 4.1 Server (PETERSEN et al., 2011) and TargetP 1.1 Server (EMANUELSSON et al., 2000) and for prediction of transmembrane we used TMHMM Server v. 2.0 (MÖLLER; CRONING; APWEILER, 2001).

IMMUNOLocalIZATION

L. infantum chagasi promastigotes (M2682) were fixed in 4% paraformaldehyde, 1% glutaraldehyde, 5mM calcium chloride, and 3.7% sucrose in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 2 h at 4°C. Samples were dehydrated in ethanol and embedded in LR White resin. Ultrathin sections were cut and incubated with an anti-rLicNTPDase2 purified antibody (1:400) except for control sections. The binding of the primary antibody was visualized by incubation with a gold (diameter, 10 nm)- conjugated secondary antibody (1:30). Samples were stained with uranyl acetate and with lead citrate and were finally investigated and photographed in transmission electron microscope (Zeiss EM 109).

SECRETION ASSAY

The secretion assay was adapted from Cuervo *et al.*(2009). Briefly, promastigotes were grown in Grace`s medium supplemented with 20% of Bovine Fetal Serum (BFS), L-glutamine (30 mg/mL) and penicillin G (6,3 mg/mL) and used in the log growth phase. The amount of 1×10^8 total promastigotes were washed twice with the buffer normally used in *in vivo* ENTPDase activity assays (116.0 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 5.5 mM D-glucose, 5.0 mM MgCl₂ and 50.0 mM HEPES-TRIS buffer pH 7.2) (DOS PASSOS LEMOS et al., 2002; FIETTO et al., 2004; VASCONCELLOS et al., 2014). The washes

were done by suspension of cells followed by spin at 600 g for 10 min at 4°C. Then the cells were suspended in 1 mL of the same buffer supplemented with protease inhibitors (Leupeptin 1µg/mL, Pepstatin 1µg/mL, Aprotinin 1µg/mL). The secreted samples (supernatant) were collected by centrifugation (600g for 10min at 4°C next 10000g/10min 4°C) after 0, 15 min, 30 min, 1h and 2h 26° at. Supernatants containing the secreted proteins were precipitated using trichloroacetic acid 10% v/v for 30 min at RT, the pellets were recovered by centrifugation at 14,000 g for 15 min, washed with 100% acetone and solubilized in SDS-PAGE sample buffer, separated in 10% polyacrylamide gel and evaluated by western blot assay using anti-LicNTPDase2 which is able to recognize both ENTPDase isoforms of *L. infantum chagasi* (VASCONCELLOS et al., 2014). Parasites viability were evaluated by flow cytometry after 2 hours of assay using propidium iodide method (RICCARDI; NICOLETTI, 2006).

WESTERNBLOT

Polyacrylamide gel containing the separated proteins was electroblotted to a microcelulose membrane. The membrane was blocked overnight in 5% low-fat dried milk in PBS containing 1% Tween 20. Then the membrane was washed three times of 5 min with PBS-Tween 20 1% (PBS-T) and incubated with anti-LicNTPDase2 serum produced in rabbit at a dilution of 1:100 for 2h at room temperature. Then the membrane was washed in PBS-T three times and incubated with the secondary antibody anti-rabbit IgG-FITC produced in goat (Sigma-Aldrich©) at 1:6000 for 2h. As control it was used purified recombinant LicNTPDase2 produced in *E.coli* (VASCONCELLOS et al., 2014). The result was observed by fluorescence of FITC detected using the FLA 5100 (473nm) (Fujifilm®).

LicNTPDase1 BINDING ASSAY TO THE HOST CELL MACROPHAGE

The amount of 1×10^5 macrophages, obtained after growing in RPMI medium were added per well in 96-well plate in a total volume of 0.2 mL of supplemented RPMI and incubated for 24 h at 37°C and 5% CO₂. Then the cells were fixed with 0.1 mL of 4% paraformaldehyde for 1 h at room temperature. The cells were washed 3 times with 0.1 mL of PBS, blocked with 0.1 mL of blocking solution (PBS plus 0.5% BSA) and incubated for 1 h at room temperature. Then the cells were washed 3 times and incubated with increasing concentrations of the recombinant rLicNTPDase1 produced as previously described (Bastos et al., 2015) and diluted in PBS containing 0.5% BSA. The plates were

then placed at 37 °C for 1 h, was washed 4 times with PBS plus 0.05% Tween 20 and incubated for 1h at 37°C with anti-His monoclonal antibody 1:500 (GenScript) diluted in PBS containing 0.05% Tween 20. The previous wash step was repeated and the secondary antibody anti-mouse IgG conjugated to peroxidase (GenScript) was used at 1:5000 in PBS containing 0.05% Tween 20. The plates were incubated again for 1 h at 37 °C and washed 4 times. The revelation were done by TMB assay absorbance measured at 450 nm.

3. RESULTS

First, we analyzed the potential cellular localization of both E-NTPDases from *L. infantum chagasi* (Lic-NTPDase1 and LicNTPDase2). The full amino acid sequence of both enzymes were submitted to the eukaryotic protein TargetP1.1 tool resulting in specific reports with score ranging from 0 to 1 for each of the three possible targets mitochondria, secretory pathway or “other”. TargetP can also provides a “reliability coefficient” (RC) which is a measure of the reliability of the prediction given by the server, this value can range from 1 (very reliable) to 5 (unreliable). The results demonstrate high probability of secretion of LicNTPDase1 wich has an amino terminal signal peptide with high confidence. Similar result can be observed for LicNTPDase2 but with a low probability and low RC value (Table 1). To reinforce the predictions from TargeP1.1 we submitted both proteins to transmembrane evaluation by TMHMM and to prediction of amino terminal Signal Peptide by SignaP4.1. Figure 1 shows that both enzymes possess an putative N-terminal transmembrane region: LicNTPDase1 transmembrane helix are from 5-27 amino acid residue an LicNTPDase2 transmembrane helix are from 7-39 amino acid residue (Figure 1B). As shown in Figure 1C LicNTPDase possesses a possible site of cleavage by protease between the 28 and 29 amino acid residue, this proteolysis site shortly after a possible transmembrane region match with the existence of an amino-terminal signal peptide. No cleavage site was observed for LicNTPDase2 (Figure 1D) indicating that is an enzyme maybe is fully anchored to the plasma membrane.

To confirm the cellular localization of these enzymes *L. infantum chagasi* promastigotes were evaluated by Gold Electron Microscopy Immuno Staining using antibodies against the recombinant LicNTPDas2 (anti-rLicNTPDase2). In spite that the staining inside the cells and at the surface was already described (Vasconcellos et al., 2015) and at this work (Figure 2A-C), we observed significant staining at the surface that are

suggestive of secretion because they are inside the cells but near to the cell surface, at the cell surface and outside the cell near to cell surface too (Figure. 2D-E). As we can see, the Figure 2E shows various spots on the extracellular medium near the surface of the cell, whereas Fig. 1A it is possible to see deformations in the cell membrane similar to those observed in the vesicle fusion mechanism indicating that a possible route of secretion is occurring.

To corroborate data from electron microscopy and bioinformatics analyzes we elaborated a secretion assay using promastigotes from log phase of growth and we observed the secretion of this protein in the supernatants throughout western blotting using the same anti-rLicNTPDase serum. The antibody strongly recognized a single polypeptide band about 70 kDa in samples of supernatant of cell after 60min and 120min, but not at 0, 15 or 30 min. The same pattern was also visualized in the total extract of *L. infantum chagasi* (Figure 3).

The possibility of LicNTPDase1 from *L. infantum* to be secreted open the possibility of direct interaction with the surface environment of host cell during infection. In order to investigate this possibility we evaluated the capability of recombinant LicNTPDase1 (rLicNTPDase1) to direct binding to surface of live macrophages adhered to ELISA plate wells. As we can see at Figure 4, the nucleotidase active rLicNTPDase1 bind to surface of macrophage in an concentration dependent way that was abolished when the recombinant protein was unfolded by temperature. These results could mean that secreted LicNTPDase could participate in the parasite-host cell interaction during *L. infantum* infection.

4. DISCUSSION:

In silico analysis evidenced higher probability of LicNTPDase-1 to be secreted and Lic-NTPDase2 to be a transmembrane protein. Additionally, the EM analysis revealed the presence of the ENTPDase reactive gold immune staining on the out and inner cell surface and at the extracellular medium (Fig2 A-E). These results provide evidences that support the existence of mechanisms of secretion of ENTPDases in promastigotes of *L. infantum chagasi*, but as the anti-rLicNTDase-2 antibodies are able to recognize both isoforms of ENTPDase from Leishmania it was not possible to speculate which of the proteins could being secreted in these assays.

On the other hand, the Western Blotting analysis revealed a single band of approximately 70 kDa to be secreted at the secretion assay (Figure 3), and it was also possible to observe a band of similar weight in the total protein parasite extract. The 70 kDa is close to the predicted molecular weight from LicNTPDase-1 (BASTOS et al., 2017), and this result suggest that this protein could be the secreted ENTPDase observed at the EM assay. Taken together, our results indicate that at least in the conditions of secretion assay LicNTPDase-1 could be secreted by promastigotes. Similar results was shown to *Leishmania major* (Sansom et al., 2014).

Secreted proteins could have distinct functions during Leishmania infection, they could be involved in the establishment of infection and after internalization in macrophages these proteins could participate in intra cellular host-pathogen interactions. That could influence the macrophage microbicidal functions, antigen presentation and cytokine production (SANTARÉM et al., 2007). The secretion of LicNTPDase1 on the extracellular medium may contribute to hydrolysis of host extracellular nucleotides contributing to the modulation of pro-inflammatory and immunomodulatory molecules like ATP and ADO acting to favor the survival of the parasite inside the macrophage (DE ALMEIDA

MARQUES-DA-SILVA et al., 2008; LANGSTON et al., 2003). In fact ENTPDases from *Leishmania amazonensis* and *Leishmania donovani* are known to be capable to influence the immune system, and *L. infantum* is able to subvert host immune system through Adenosine receptor A_{2A} (GOMES et al., 2015; LIMA et al., 2017; VIJAYAMAHANTESH et al., 2017). Until now the majority of work searched for the role of Leishmania NTPDase2 roles in the infection and immune system control. But considering that LicNTPDase1 could be secreted and that it is capable to hydrolyse different nucleotides including ATP and ADP (BASTOS et al., 2017), it is possible to suppose that LicNTPDase1 could contribute with such biological roles and this hypothesis deserves deeply investigation.

5. CONCLUSION:

We show in this work the secretion of a NTPDase by *L. infantum chagasi* promastigotes. Taken together, the presence of a signal peptide and a cleavage site in LicNTPDase1, the visualization of EM images suggestive of secretion and the positive secretion of a ~70kDa protein lead us to believe that LicNTPDase-1 is secreted. These conclusion together with the capability of this enzyme to hydrolase extracellular nucleotides highlight the possibility of this action on the purinergic signalization and this point need to be deeply investigated.

6. REFERENCES

- ALCOLEA, P. J. et al. Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, 2010.
- ALCOLEA, P. J. et al. In vitro infectivity and differential gene expression of *Leishmania infantum* metacyclic promastigotes: Negative selection with peanut agglutinin in culture versus isolation from the stomodeal valve of *Phlebotomus perniciosus*. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, 2016.
- ANSARI, M. Y. et al. Recent advancement and treatment of leishmaniasis based on pharmacoinformatics approach: Current and future outlook. **Gene Reports**, v. 9, n. August, p. 86–97, 2017.
- BARRETT, M. P. The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 13, n. 1, p. 11–6, 1997.
- BASTOS, M. S. et al. The expression of NTPDase1 and -2 of *Leishmania infantum chagasi* in bacterial and mammalian cells: Comparative expression, refolding and nucleotidase characterization. **Protein Expression and Purification**, v. 131, p. 60–69, 2017.
- BASTOS, M. S. E. Expressão das NTPDases 1 E 2 DE *Leishmania infantum chagasi* EM SISTEMA BACTERIANO E CÉLULAS DE MAMÍFERO E ESTUDO DE SUAS INFLUÊNCIAS NA INFECÇÃO DE CÉLULAS RAW 264.7 NA EXPRESSÃO DE PURINORECEPTORES P2. **Tese de doutorado**, 2014a.
- BASTOS, M. S. E. **Expressão das NTPDases 1 E 2 DE *Leishmania infantum chagasi* em sistema bacteriano e células de mamífero e estudos de suas influências na infecção de células RAW 264.7 na expressão de purinosreceptores P2.** [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2014b.
- BASTOS, M. S. E. **Expressão heteróloga e caracterização bioquímica e biológica da**

NTPDase1 de Leishmania infantum chagasi. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

BIGONNESSE, F. et al. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. **Biochemistry**, v. 43, n. 18, p. 5511–5519, 2004.

BRITTINGHAM, A. et al. Role of the Leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 155, n. 6, p. 3102–3111, 1995.

CALLAHAN, H. L. et al. Leishmania spp: Temperature sensitivity of promastigotes in vitro as a model for tropism in vivo. **Experimental Parasitology**, v. 84, n. 3, p. 400–409, 1996.

CEKIC, C.; LINDEN, J. Purinergic regulation of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 3, p. 177–192, 2016.

CORTHELL, J. T. Immunoprecipitation. **Basic Molecular Protocols in Neuroscience: Tips, Tricks, and Pitfalls**, p. 77–81, 2014.

CUERVO, P. et al. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of Leishmania (Viannia) braziliensis promastigotes. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 1, p. 79–92, 2009.

CUNHA, L. C. S. **Imunolocalização da Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase 1 (NTPDase-1) de Ttypanossoma Cruzi.** [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

DA SILVA, R.; SACKS, D. L. Metacyclogenesis is a major determinant of Leishmania promastigote virulence and attenuation. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 11, p. 2802–2806, 1987.

DANTAS-TORRES, F. et al. Cutaneous and visceral leishmaniosis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3–4, p. 313–317, 2010.

DAS, S. et al. Combination of paromomycin and miltefosine promotes TLR4-dependent induction of antileishmanial immune response in vitro. **Journal of Antimicrobial**

Chemotherapy, v. 67, n. 10, p. 2373–2378, 2012.

DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA, E. et al. Extracellular nucleotide metabolism in Leishmania: influence of adenosine in the establishment of infection. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 8, p. 850–857, 2008.

DEAGLIO, S. et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 6, p. 1257–65, 2007.

DE SOUZA, M. C. et al. The influence of ecto-nucleotidases on Leishmania amazonensis infection and immune response in C57B/6 mice. **Acta Tropica**, v. 115, n. 3, p. 262–269, 2010.

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 Tropica**, v. 125, n. 1, p. 60–66, 2013.

DEREWENDA, Z. S. The use of recombinant methods and molecular engineering in protein crystallization. **Methods**, v. 34, n. 3, p. 354–363, 2004.

DODSON, S. E. et al. Production of Antisera Using Fusion Proteins. **Current Protocols in Neuroscience**, n. July, p. 1–26, 2007.

DOS PASSOS LEMOS, A. et al. Ectonucleotide diphosphohydrolase activity in Crithidia deanei. **Parasitology Research**, v. 88, n. 10, p. 905–911, 2002.

DUARTE, M. C. et al. Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 4, p. 398–407, 2016.

EMANUELSSON, O. et al. Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence. **Journal of Molecular Biology**, v. 300, n. 4, p. 1005–1016, 2000.

FIETTO, J. L. R. et al. Characterization and immunolocalization of an NTP

diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, n. 2, p. 454–460, 2004.

GERSHKOVICH, P. et al. Pharmacokinetics and biodistribution of amphotericin B in rats following oral administration in a novel lipid-based formulation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 1, p. 101–108, 2009.

GOMES, R. S. et al. E-NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) of *Leishmania amazonensis* inhibits macrophage activation. **Microbes and Infection**, v. 17, n. 4, p. 295–303, 2015.

GONTIJO, N. F. et al. *Lutzomyia longipalpis*: pH in the gut, digestive glycosidases, and some speculations upon *Leishmania* development. **Experimental Parasitology**, v. 90, n. 3, p. 212–219, 1998.

GOTO, H.; PRIANTI, M. D. G. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 51, n. 5, p. 241–246, 2009.

GREGORY, D. J.; OLIVIER, M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. **Parasitology**, v. 130, n. S1, p. S27, 2005.

GUPTA, N.; GOYAL, N.; RASTOGI, A. K. In vitro cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. **Acta Tropica**, v. 83, n. 3, p. 37–42, 2002.

HARLOW, E.; LANE, D. Antibodies, a Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, n. 28, p. 649–654, 1988.

IVANENKOV, V. V.; MELLER, J.; KIRLEY, T. L. Characterization of disulfide bonds in human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 (NTPDase3): Implications for NTPDase structural modeling. **Biochemistry**, v. 44, n. 25, p. 8998–9012, 2005.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439–445, 2006.

- KAVRAN, J. M. D. J. L. Coupling Antibody to Cyanogen Bromide-Activated Sepharose. **Methods Enzymol**, v. 27, n. 4, p. 339–351, 2009.
- KUKULSKI, F. et al. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. **Purinergic Signalling**, v. 1, n. 2, p. 193–204, 2005.
- KUMAR, R.; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clinical & Translational Immunology**, v. 3, n. 3, p. e13, 2014.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). **Ann Parasitol Hum Comp**, v. 63, n. 2, p. 134–145, 1988.
- LANGSTON, H. P. et al. Secretion of IL-2 and IFN- γ , but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 170, n. 6, p. 2962–70, 2003.
- LARIONOV, A.; KRAUSE, A.; MILLER, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. **BMC bioinformatics**, v. 6, p. 62, 2005.
- LAZAROWSKI, E. R. Mechanisms of Release of Nucleotides and Integration of Their Action as P2X- and P2Y-Receptor Activating Molecules. **Molecular Pharmacology**, v. 64, n. 4, p. 785–795, 2003.
- LIMA, M. H. F. et al. *Leishmania infantum* parasites subvert the host inflammatory response through the adenosine A2A receptor to promote the establishment of infection. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JUL, p. 1–12, 2017.
- LONGHI, M. S. et al. Biological functions of ecto-enzymes in regulating extracellular adenosine levels in neoplastic and inflammatory disease states. **Journal of Molecular Medicine**, v. 91, n. 2, p. 165–172, 2013.
- LÓPEZ, Y. et al. Sandfly *Lutzomyia longipalpis* in a cutaneous leishmaniasis focus in Central Colombia. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 4, p. 415–419, 1996.

- MAIA, A. C. R. G. et al. Occurrence of a conserved domain in ATP diphosphohydrolases from pathogenic organisms associated to antigenicity in human parasitic diseases. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 10, p. 1059–1067, 2011.
- MAIOLI, T. U. et al. Immune response induced by New World Leishmania species in C57BL/6 mice. **Parasitology Research**, v. 94, n. 3, p. 207–212, 2004.
- MARIOTINI-MOURA, C. et al. Trypanosoma cruzi nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion. **Acta Tropica**, v. 130, n. 1, p. 140–147, 2014.
- MARZOCHI, M. C. D. A. et al. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: Eco-epidemiological aspects and control. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 570–580, 2009.
- MINISTÉRIO DE AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Nota Técnica Nº 11/2016/Cpv/Dfip/Sda/Gm/Mapa**. Nota Técnica. **Anais...2016** Disponível em: <<http://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>>
- MÖLLER, S.; CRONING, M. D.; APWEILER, R. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 17, n. 7, p. 646–653, 2001.
- MURPHY-PIEDMONTE, D. M.; CRAWFORD, P. A.; KIRLEY, T. L. Bacterial expression, folding, purification and characterization of soluble NTPDase5 (CD39L4) ecto-nucleotidase. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1747, n. 2, p. 251–259, 2005.
- MURPHY, D. M.; IVANENKOV, V. V; KIRLEY, T. L. Bacterial Expression and Characterization of a Novel , Soluble , Calcium-Binding ,. **Biochemistry**, p. 2412–2421, 2003.
- O'KEEFFE, M. G. et al. Developmentally regulated expression of ectonucleotidases NTPDase5 and NTPDase6 and UDP-responsive P2Y receptors in the rat cochlea. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 133, n. 4, p. 425–436, 2010.
- PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane

- regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785–786, 2011.
- PIMENTEL, F. G. et al. The Leishmania-Macrophage Interactions: Role of E-NTPDases and Purinergic Signaling. **Macrophage**, n. CL, p. 1–13, 2016.
- QUEIROZ, M. J.; ALVES, J. G.; CORREIA, J. B. [Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area]. **Jornal de Pediatria**, v. 80, p. 141–146, 2004.
- RANCOUR, D. M.; BACKUES, S. K.; BEDNAREK, S. Y. **Immunoelectron Microscopy**. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. v. 657
- RIBEIRO, H. A. L. et al. Modeling Immune Response to Leishmania Species Indicates Adenosine As an Important Inhibitor of Th-Cell Activation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. July, p. 1–13, 2017.
- RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458–1461, 2006.
- ROBERTSON, W. H.; JOHNSON, M. A. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 173–213, 2003.
- ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 409–430, 2006.
- ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in latin America - A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 1, 2010.
- SANSOM, F. M. et al. A bacterial ecto-triphosphate diphosphohydrolase similar to human CD39 is essential for intracellular multiplication of Legionella pneumophila. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 1922–1935, 2007.
- SANSOM, F. M.; ROBSON, S. C.; HARTLAND, E. L. Possible effects of microbial ecto-

nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 72, n. 4, p. 765–781, Table of Contents, 2008.

SANTANA, I. U. et al. Visceral leishmaniasis mimicking systemic lupus erythematosus: Case series and a systematic literature review. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 44, n. 6, p. 658–665, 2015.

SANTOS, R. F. et al. Influence of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 3, 2009.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: Distribution, physiology and their control. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 45, n. 4, p. 255–272, 2008.

VASCONCELLOS, R. D. S. **Expressão heteróloga e caracterização bioquímica da nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase-2 (NTPDase-2) de *Leishmania infantum chagasi***. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

VASCONCELLOS, R. D. S. et al. *Leishmania infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 is an Apyrase Involved in Macrophage Infection and Expressed in Infected Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, 2014.

VASCONCELLOS, R. D. S. **Estudo bioquímico, biológico e busca por inibidores da nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase-2 (LicNTPDase-2) de *Leishmania infantum chagasi* como estratégia para o desenho racional de drogas**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2014.

VIJAYAMAHANTESH et al. Adenosine generated by ectonucleotidases modulates the host immune system during visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 91, p. 170–179, 2017.

WANG, T.; GUIDOTTI, G. CD39 Is an Ecto-(Ca,Mg)-apyrase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 17, p. 9898–9901, 26 abr. 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning

point in leishmaniasis surveillance. **Weekly epidemiological record**, v. 38, p. 557–572, 2017.

ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Characterization of rat NTPDase1, -2, and -3 ectodomains refolded from bacterial inclusion bodies. **Biochemistry**, v. 46, n. 42, p. 11945–11956, 2007.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 362, n. 4–5, p. 299–309, 2000.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 3, p. 437–502, 2012.

7. TABLES, FIGURES AND LEGENDS

Table 1. Cellular localization predictions for ENTPDases from *L. infantum chagasi*

Predictor	Protein	Length	Predict Location	SP Probability*	Reliability Coefficient**
TargetP	LicNTPDase1	677	Secreted	0.931	1
	LicNTPDase2	425	Secreted	0.619	4
SignalP	LicNTPDase1	677	Signal peptide	0.994	-
	LicNTPDase2	425	Signal anchored	0.998	-

*Score of SP probability 0-1 (low to high)

**Reliability Coefficient score 1-5 (high to low)

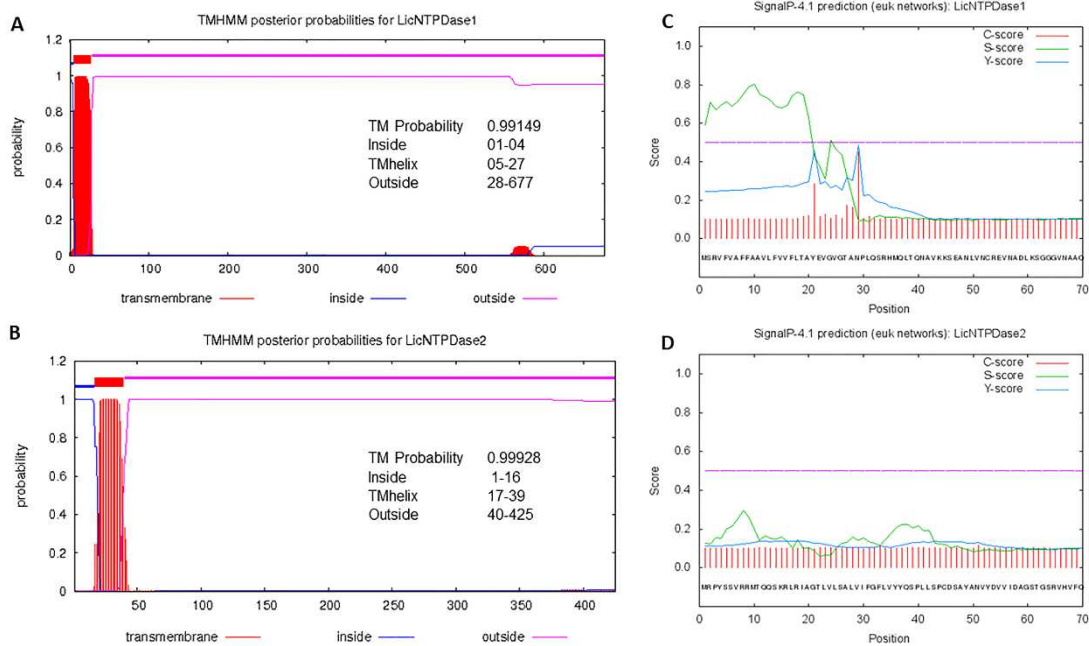


Figure 1. *In silico* prediction of transmembrane and signal peptide of LicNTPDases. (A-B) Transmembrane prediction by TMHMM show an aminoterminal transmembrane helix for both ENTPDases (red). (C and D) Signal peptide prediction by SignalP 4.1 to LicNTPDase1 (C) show the presence of a signal peptide followed by protease cleavage site between residues 28 and 29 and for LicNTPDase2 (D) show signal anchor prediction without protease cleavage site. Pink line represent the cut-off of probabilities, C-score (red) represent the probability of protease site cleavage, S-score represent (green) represents the signal peptide portion from positions in the mature part of the protein and Y- score (blue) represents a reason between S and C-score.

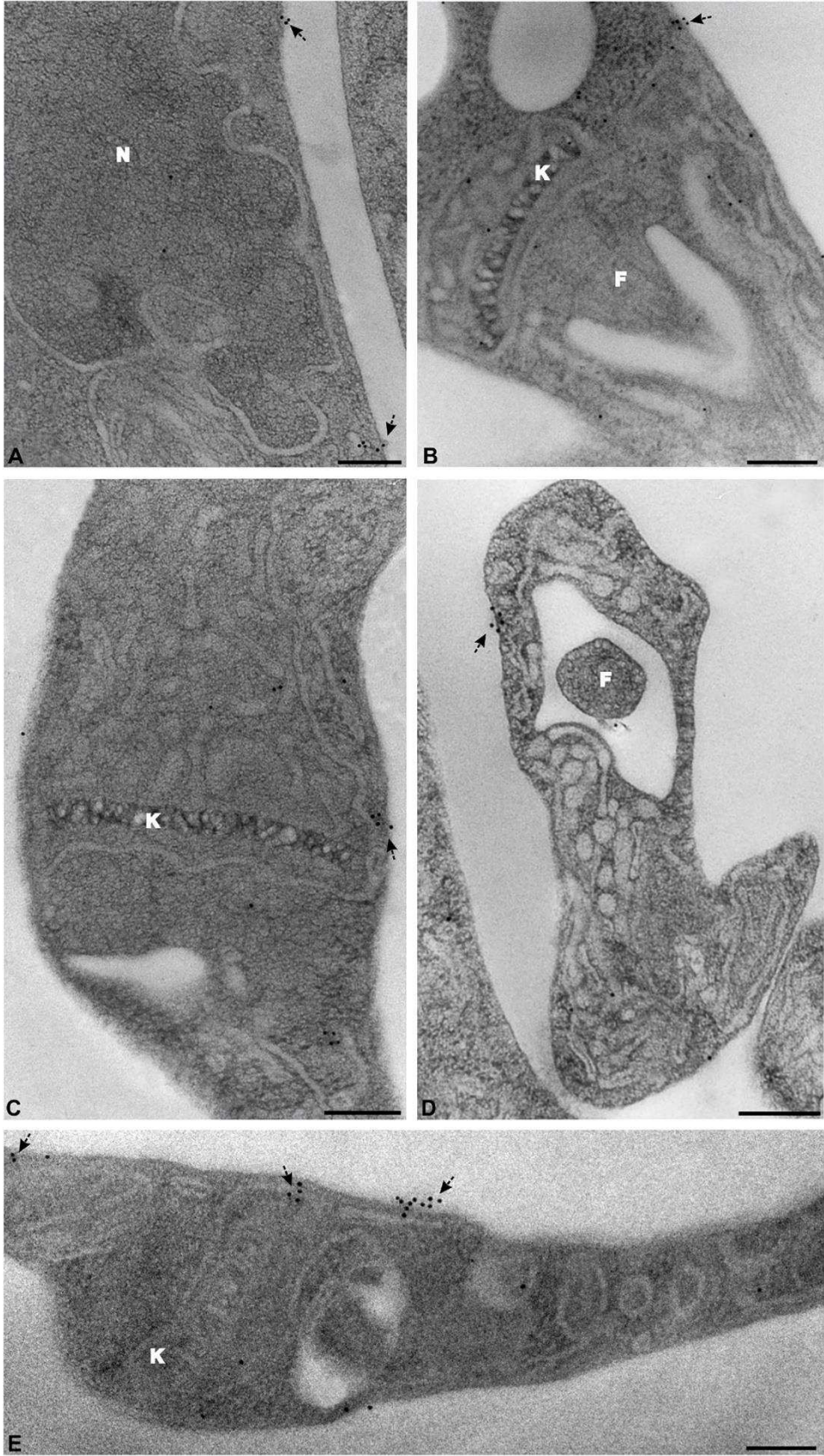


Figure 2. Electron Microscopy Sub-cellular localization of LicNTPDases in *L. infantum chagasi* promastigotes. (A-E) Cells were fixed, embedded in LR White resin and the ultrathin sections were incubated with anti-rLicNTPDase2 purified antibody except for control sections. The binding of the primary antibody was visualized by incubation with a gold (diameter, 10 nM)- conjugated secondary antibody. Samples were stained with uranyl acetate and with lead citrate and photographed in transmission electron microscope (Zeiss EM 109). Labeling on the out and inner cell surface and near the extracellular medium suggestive of secretion (dashed black arrow). (Nucleus (N), Kinetoplast (K), Flagellum (F). No staining was observed in the control (data not shown). Bars: A-E = 0.2 μ m.

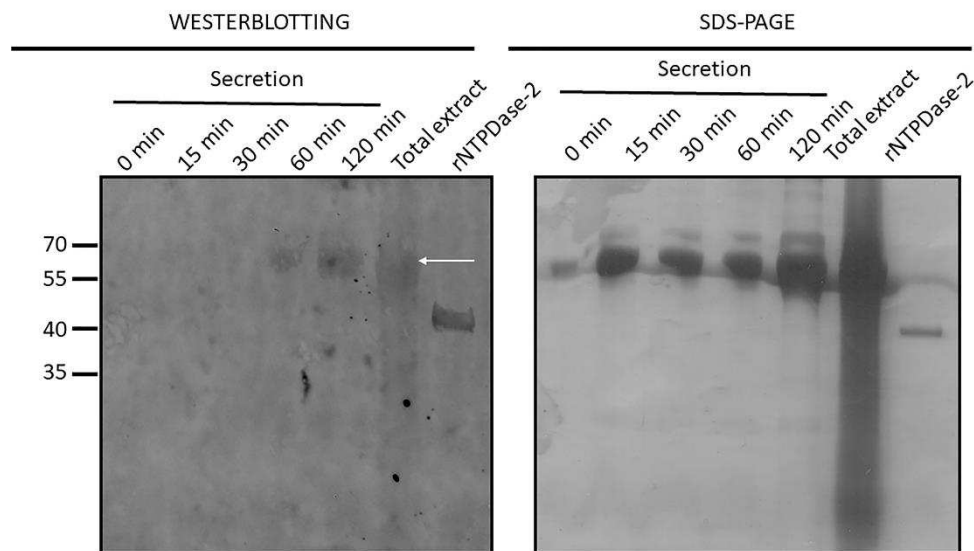


Figure 3. Evaluation of Secretion of LicNTPDases by western blot. *L. infantum chagasi* promastigotes cells from log phase were recovered by centrifugation and incubated at room temperature until 2h. The secreted proteins were recovered after 15, 30, 60 and 120 min. Secreted proteins were loaded in sample buffer and analyzed by SDS-PAGE and Western blot using anti-rLic NTPDase2 as primary antibodies and FITC conjugated secondary antibody. The result was observed by fluorescence of FITC detected using the FLA 5100 (473nm) (Fujifilm®). The unique protein band with apparent MW of ~70kDa secreted in the times 60 min and 120 min, and in total extract is highlighted by the black arrow. Purified recombinant rLicNTPDase2 was used as positive control.

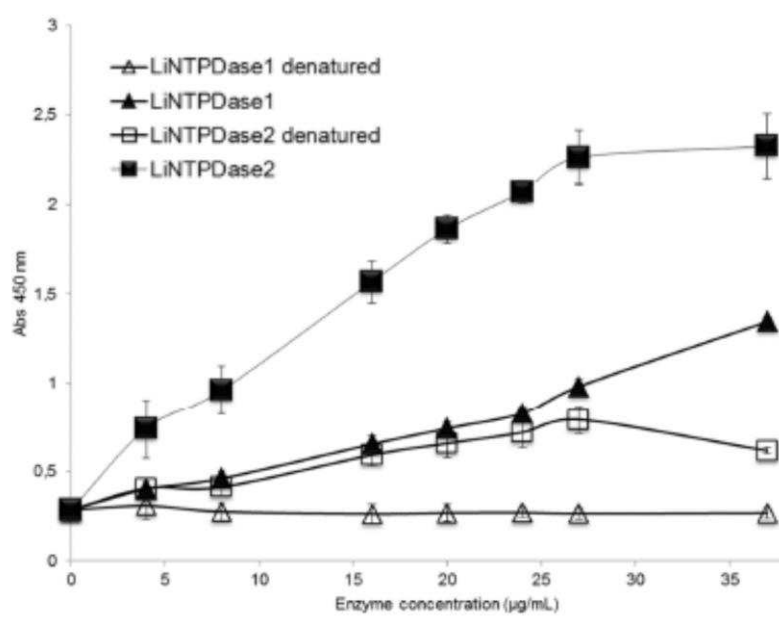


Figure 4. Evaluation of binding of rLicNTPDase1 to macrophages. 96 wells plates were recovered with 1×10^5 RAW 264.7 macrophages and incubated with increasing concentrations of purified refolded or denatured rLicNTPDase1. Non bound enzymes were washed removed and the bound enzymes were recognized by primary anti-His-Tag antibodies. The results were revealed by TMB assay Absorbance at 450 nm resulted from the presence of peroxidase activity from the secondary antibody anti-IgG conjugated with peroxidase.