

FILIPPE GADIOLLI PIMENTEL

**E-NTPDases DE *Leishmania infantum chagasi*: UMA  
REVISÃO DE SEUS PAPÉIS BIOLÓGICOS NA  
INFECÇÃO E PADRONIZAÇÃO METODOLÓGICA PARA  
SUA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM SISTEMA LESXY  
(LEISHMANIA EXPRESSION SYSTEM)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL

2016

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

T

P644e  
2016 Pimentel, Filipe Gadiolli, 1984-  
E-NTPDases de *Leishmania infantum chagasi* : uma  
revisão de seus papéis biológicos na infecção e  
padronização metodológica para sua expressão heteróloga  
em sistema LESXY (Leishmania Expression System) /  
Filipe Gadiolli Pimentel. - Viçosa, MG, 2016.  
viii,132f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador : Juliana Lopes Rangel Fietto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Leishmania infantum chagasi*. 2. Leishmaniose.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de  
Pós-graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 572.7

FILIPPE GADIOLLI PIMENTEL

**E-NTPDases DE *Leishmania infantum chagasi*: UMA  
REVISÃO DE SEUS PAPÉIS BIOLÓGICOS NA  
INFECCÃO E PADRONIZAÇÃO METODOLÓGICA PARA  
SUA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM SISTEMA LESXY  
(LEISHMANIA EXPRESSION SYSTEM)**

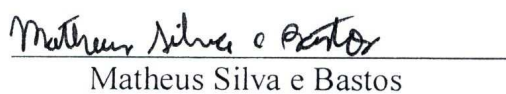
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de fevereiro de 2016.

  
Antônio Helvécio Tótola

  
Leandro Licursi de Oliveira

  
Silvia Almeida Cardoso

  
Matheus Silva e Bastos

  
Juliana Lopes Rangel Fietto  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de estar neste mundo que proporciona as mais diversas experiências e aprendizados.

Aos meus amados pais, Gilson e Janete, pelo apoio incondicional por todos esses anos. Não existe algo que possa ser escrito capaz de expressar toda a minha gratidão.

Aos meus amados irmãos, Vinícius e Lícia, meus eternos amigos e que me acompanham nesta jornada da vida desde pequeninos.

À minha amada companheira, Natasha Lagos Maia, por compartilhar comigo seu sorriso, tornando meus dias mais felizes. Também por toda a dedicação e compreensão diárias.

A todos bons amigos que conquistei ao longo dos anos, passando pelo Espírito Santo, Ouro Preto, até chegar em Viçosa. Felizmente são muitos e não caberiam todos nesta seção.

Aos professores, amigos, colegas e técnicos do Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA), Proteômica e Bioquímica Celular. Obrigado a todos pelos bons momentos de descontração, por partilhar sugestões e dúvidas e pela boa vontade em ajudar sempre que preciso. Sucesso a todos.

Também aos professores, amigos, colegas e técnicos dos outros laboratórios os quais utilizei equipamentos ou pedi socorro na necessidade de reagentes: Laboratório de Biologia Molecular e Filogeografia, LBM, LIG, LBCH, LAPEM.

À minha orientadora, professora Dra. Juliana Lopes Rangel Fietto, pela oportunidade de orientação e por confiar em meu trabalho, me dando total apoio para iniciar este projeto.

Aos amigos, Dr. Matheus Silva e Bastos, Dr. Yaro Luciolo dos Santos e Dr. Ramon de Freitas Santos, pelo auxílio em experimentos, estratégias e sugestões para este trabalho.

À aluna de iniciação científica, Lethícia Kelly Ramos Andrade (Lefícia), por toda ajuda neste projeto, por compartilhar comigo as diversas dúvidas que surgiram e pelo bom humor diário (mesmo quando o meu não estava tão bom assim).

Ao Dr. Rohit Sharma, que mesmo com as dificuldades de comunicação ouviu minhas dúvidas sempre com boa vontade e me deu várias sugestões.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao programa de Bioquímica Aplicada, que me forneceram praticamente toda a estrutura necessária para o desenvolvimento deste projeto.

Ao secretário do programa de Bioquímica Aplicada, Eduardo Monteiro, que nunca deixa os alunos da pós-graduação sem solução para os problemas burocráticos.

A todos os mais diversos funcionários da UFV, em especial ao Sr. Paulo, que diretamente ou indiretamente também contribuem para propagar a educação neste país.

À CAPES pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

Aos membros da banca que irão avaliar este trabalho pela disponibilidade e pelas contribuições que com certeza o enriquecerão.

## ÍNDICE

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
1 – INTRODUÇÃO .....	1
CAPÍTULO 1.....	3
Padronização da expressão heteróloga das E-NTPDases 1 e 2 de <i>Leishmania infantum</i> em <i>Leishmania Expression System</i> (LEXSY) .....	3
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 – <i>Leishmania</i> e Leishmanioses .....	4
2.2 –Leishmaniose Visceral (LV) .....	6
2.3 – Estratégias de controle.....	7
2.4 – Nucleotídeos extracelulares e Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases .....	9
2.5 - Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases de <i>Leishmania</i> .....	10
2.6 – Sistemas de expressão heteróloga.....	12
2.7 – <i>Leishmania tarentolae</i> como sistema de expressão .....	15
2.8 – <i>Leishmania tarentolae</i> e seu uso como modelo experimental para triagem de potenciais drogas leishmanicidas.....	20
2.9 – <i>Leishmania tarentolae</i> e seu uso na produção de vacinas vivas.....	21
3 - JUSTIFICATIVA DA PROPOSTA .....	23
4 – OBJETIVOS .....	24
4.1 - Objetivos gerais.....	24
4.2 - Objetivos específicos.....	24
5 – MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
5.1 – Técnicas Básicas de Biologia Molecular e Bioquímica.....	25
5.2 – Organismos.....	25
5.3 - Estratégias de clonagem .....	25
5.4 – Cultivo de <i>E. coli</i> .....	27
5.5 – Preparo de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ competente e transformação de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ e Stellar.....	27
5.6 – Extração dos DNAs plasmidiais pLEXSY-neo2 e pLEXSY_IE-blecherry4.....	28
5.7 – Amplificação dos genes das Lic-E-NTPDases 1 e 2 por PCR .....	29
5.8 – Características e digestão dos plasmídeos pLEXSY .....	31
5.9 – Clonagem das Lic-E-NTPDases em sistema LEXSY .....	33
5.10 – Cultivo de <i>L. tarentolae</i> .....	34
5.11 – Transfecção e seleção clonal de <i>L. tarentolae</i> .....	36
5.12 – Análise da expressão dos clones selecionados por SDS-PAGE 10/ .....	37
5.13 – Análise da expressão por Western Blotting dos clones selecionados .....	38

5.14 – Análise da expressão dos clones selecionados por Dot Blotting .....	39
5.15 – Ensaio de purificação das frações induzidas .....	39
6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
6.1 – Amplificação por PCR dos genes das Lic-E-NTPDases 1 e 2 .....	40
6.2 – Digestão dos plasmídeos pLEXY-neo2 e pLEXY_IE-blecherry4 com enzimas de restrição .....	41
6.3 – Clonagem das Lic-E-NTPDases 1e 2 nos plasmídeos pLEXY .....	42
6.4 – Transfecção de <i>L. tarentolae</i> T7-TR e seleção clonal .....	43
6.5 – Primeiros ensaios de indução da expressão das Lic-E-NTPDases em LEXSY .....	45
6.6 – Seleção de novos clones LEXSY e detecção da expressão da proteína mCherry .....	47
6.7 – Análise da densidade celular e intensidade de fluorescência em diferentes concentrações de inóculo inicial no clone 5.4 .....	49
6.8 – Triagem dos novos clones por Dot Blotting .....	51
6.8 – Western Blotting .....	53
6.8 – Tentativa de purificação das proteínas recombinantes .....	57
6.9 – Western Blotting da indução do clone 11 e dos clones 5 e 6 .....	60
6.9 – PCR de colônias dos clones LEXSY .....	62
6.10 – Discussões finais e hipóteses .....	63
7 – CONCLUSÕES .....	66
8 – PERSPECTIVAS .....	66
9 – REFERÊNCIAS .....	67
10 – ANEXOS.....	80
10.1 – Anexo 1.....	80
10.2 – Anexo 2.....	81
10.3 – Anexo 3.....	83
10.4 – Anexo 4.....	88
CAPÍTULO 2.....	93
As interações entre Leishmania e macrófagos: o papel das E-NTPDases e da sinalização purinérgica .....	93
The <i>Leishmania</i> -Macrophage Interactions: Role of E-NTPDases and Purinergic Signaling .....	94
11 - Abstract.....	95
12 - Introduction .....	96
12.1 - Leishmaniasis, Leishmania infection and macrophage relationships. ....	96
12.2 - Biochemical and Biological Roles of Ecto-nucleotidases and the E-NTPDases of Leishmania. ....	99
12.3 - Purinergic signaling in the immune system in the context of Leishmania infection and macrophages.....	107

13 - Conclusion and future perspectives.....	112
Acknowledgments.....	113
14 - References.....	114
15 - Files .....	130

## RESUMO

PIMENTEL, Filipe Gadioli, D.Sc, Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2016. **E-NTPDases de *Leishmania infantum* chagasi: uma revisão de seus papéis biológicos na infecção e padronização metodológica para sua expressão heteróloga em sistema LEXSY (Leishmania Expression System)**. Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto. Coorientadores: Abelardo Silva Júnior, Eduardo de Almeida Marques da Silva, Gustavo Costa Bressan e Márcia Rogéria de Almeida Lamego.

As leishmanioses compreendem um amplo espectro de doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. No hospedeiro vertebrado estes parasitos infectam principalmente os macrófagos, onde conseguem escapar dos mecanismos de defesa e se proliferam. Muitos trabalhos relatam que a sinalização purinérgica é modulada durante o desenvolvimento e ativação das células do sistema imune. Para obterem sucesso na infecção, vários patógenos conseguem subverter a resposta imune através da modulação da sinalização purinérgica, promovendo uma diminuição dos níveis de ATP (molécula pró-inflamatória) e levando a um aumento dos níveis de adenosina (molécula imunossupressora). Este desfecho resulta da atividade conjunta de algumas ectonucleotidases, das E-NTPDases e da 5'-ecto-nucleotidase, tema que é abordado no segundo capítulo desta tese. Em *Leishmania*, as E-NTPDases são consideradas importantes porque participam da via de salvação de purinas, além de serem citadas em diversos artigos como responsáveis por aumento de virulência e infectividade em diferentes espécies. Em trabalhos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa, as E-NTPDases 1 e 2 de *L. infantum* foram caracterizadas em sistema bacteriano, demonstrando resultados promissores. A possibilidade de expressar essas proteínas em sistema de expressão *Leishmania* (*Leishmania* Expression System – LEXSY – Jena Bioscience) nos impulsionou a desenvolver o presente projeto, com o intuito de caracterizar essas enzimas em um organismo bem mais próximo ao original e avaliar o seu potencial uso como vacina viva. Portanto, a clonagem das Lic-E-NTPDases sistema LEXSY é o tema abordado no primeiro capítulo desta tese.

## ABSTRACT

PIMENTEL, Filipe Gadiolli, D.Sc, Universidade Federal de Viçosa, February 2016. **Leishmania infantum chagasi E-NTPDases: a review of their roles in infection and standardization for heterologous expression in LESXY system (Leishmania Expression System)**. Advisor: Juliana Lopes Rangel Fietto. Co-advisors: Abelardo Silva Júnior, Eduardo de Almeida Marques da Silva, Gustavo Costa Bressan and Márcia Rogéria de Almeida Lamego.

Leishmaniasis comprises a broad spectrum of parasitic diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*. In vertebrate host, these parasites mainly infect macrophages, where they can escape of defense mechanisms and proliferate. Several works have reported that the purinergic signaling is modulated during development and activation of immune cells. To achieve successful infection, many pathogens can subvert the immune response through modulation of purinergic signaling by promoting a reduction in ATP levels (pro-inflammatory molecule) and leading to increased adenosine levels (immunosuppressive molecule). This outcome results from the joint activity of some ecto-nucleotidases, the E-NTPDase and 5'-ecto-nucleotidase, a topic that is discussed in the second chapter of this thesis. In *Leishmania*, the E-NTPDases are considered important because they participate in purine salvage pathway, and are cited in various articles to be responsible for increased infectivity and virulence in different species. In work carried out by our research group, the E-NTPDase 1 and 2 of *L. infantum* were characterized in bacterial system, demonstrating promising results. The ability to express these proteins in *Leishmania* expression system (*Leishmania* Expression System - LESXY - Jena Bioscience) prompted us to develop this project, in order to characterize these enzymes in an organism similar to the original and evaluate its potential use as a live vaccine. Therefore, the cloning of Lic-E-NTPDases in LESXY system is the subject discussed in the first chapter of this thesis.

## 1 – INTRODUÇÃO

As leishmanioses compreendem uma gama de doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Os sintomas clínicos podem abranger desde lesão cutânea simples (leishmaniose cutânea e mucocutânea), até doença sistêmica extremamente grave (leishmaniose visceral). Atingem significativa parte da população mundial, principalmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, sendo endêmica em várias regiões do Brasil.

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem ciclo de vida heteróximo, onde uma parte ocorre no vetor invertebrado flebotomíneo e a outra em hospedeiros vertebrados mamíferos. Nas regiões urbanas o cão é considerado o principal reservatório do parasito com importância epidemiológica, tendo dessa forma importante participação na manutenção e na transmissão da doença ao homem. Muitos estudos focados em estratégias terapêuticas para cães têm falhado em alcançar uma consistente cura parasitológica para a Leishmaniose Visceral Canina (LVC). Para agravar ainda mais essa realidade, somam-se a esses fatores o aumento na resistência parasitária à primeira linha de drogas usadas na quimioterapia humana (antimoniais pentavalentes), à toxicidade da segunda linha de drogas usadas no tratamento humano (pentamidina e anfotericina B) e ao aumento da incidência da leishmaniose em humanos imunocomprometidos [1].

Com relação à profilaxia, ainda não existem vacinas efetivas para o uso humano e alguns poucos antígenos são utilizados em vacinas para cães. Além disso, a falta de conhecimento sobre alguns aspectos dessa enfermidade torna seu controle bastante difícil [2].

Purinas e pirimidinas são importantes reguladores de diversas funções celulares, e alterações na fisiologia da sinalização purinérgica podem resultar no desenvolvimento de uma variedade de patologias, inclusive do sistema imune [3]. As células possuem receptores importantes envolvidos nessa rota de sinalização, classificados em dois tipos (P1 e P2), envolvidos tanto na sinalização neuronal quanto na não-neuronal, incluindo modulação da inflamação e resposta imune específicas [4].

As Ecto Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases (E-NTPDases) são ectonucleotidases importantes descritas na sua maioria como proteínas de membrana localizadas externamente ou secretadas na forma solúvel, sendo caracterizadas por terem cinco regiões conservadas de apirase (ACR1 a ACR5), e possuem a habilidade de

degradar nucleotídeos tri e difosfatados (NTPs e NDPs) até a forma monofosfatada. Os nucleotídeos monofosfatados podem então servir como substrato para a ecto-5'-nucleotidase, que promove a liberação das nucleobases como a adenosina [5]. Alguns estudos sugerem que as E-NTPDases possuem um papel importante para os endoparasitas, desativando respostas do hospedeiro envolvidas com a sinalização purinérgica, exercendo um papel modulatório sobre a inflamação e a resposta imune mediada por ATP, ADP e adenosina extracelulares [6],[7],[8],[9].

O grupo de pesquisa coordenado pela Prof.<sup>a</sup> Dra. Juliana Lopes Rangel Fietto estuda há alguns anos a relação entre a virulência dos parasitos do gênero *Leishmania* e de *Trypanosoma cruzi* em diferentes espécies e cepas, focando especialmente a relação entre as ecto-nucleotidases e o controle da infecção ou resposta imune do hospedeiro [8],[7],[10],[11]. Este tema é abordado pelo artigo de revisão que compõe o segundo capítulo desta tese, onde discutimos acerca dos papéis das E-NTPDases na infecção por *Leishmania*, tendo como foco principal a sinalização purinérgica e a sua relação nas interações entre *Leishmania* e macrófagos.

As E-NTPDases já foram demonstradas como fatores de virulência em diferentes espécies de *Leishmania* e em *T. cruzi*. A E-NTPDase 2 de *Leishmania infantum chagasi* demonstrou alto potencial para uso no diagnóstico da doença canina LVC [12]. Este uso e a possível aplicação das E-NTPDases de *Leishmania* como agentes vacinais e alvos de drogas foram objeto de patente por nosso grupo de pesquisa. O primeiro capítulo do presente trabalho teve como foco a produção das E-NTPDases 1 e 2 de *L. infantum chagasi*, expressas de forma heteróloga em *Leishmania tarentolae*, a fim de se caracterizar as enzimas produzidas nesse sistema eucariótico.

# **CAPÍTULO 1**

## **Padronização da expressão heteróloga das E-NTPDases 1 e 2 de *Leishmania infantum* em Leishmania Expression System (LEXSY)**

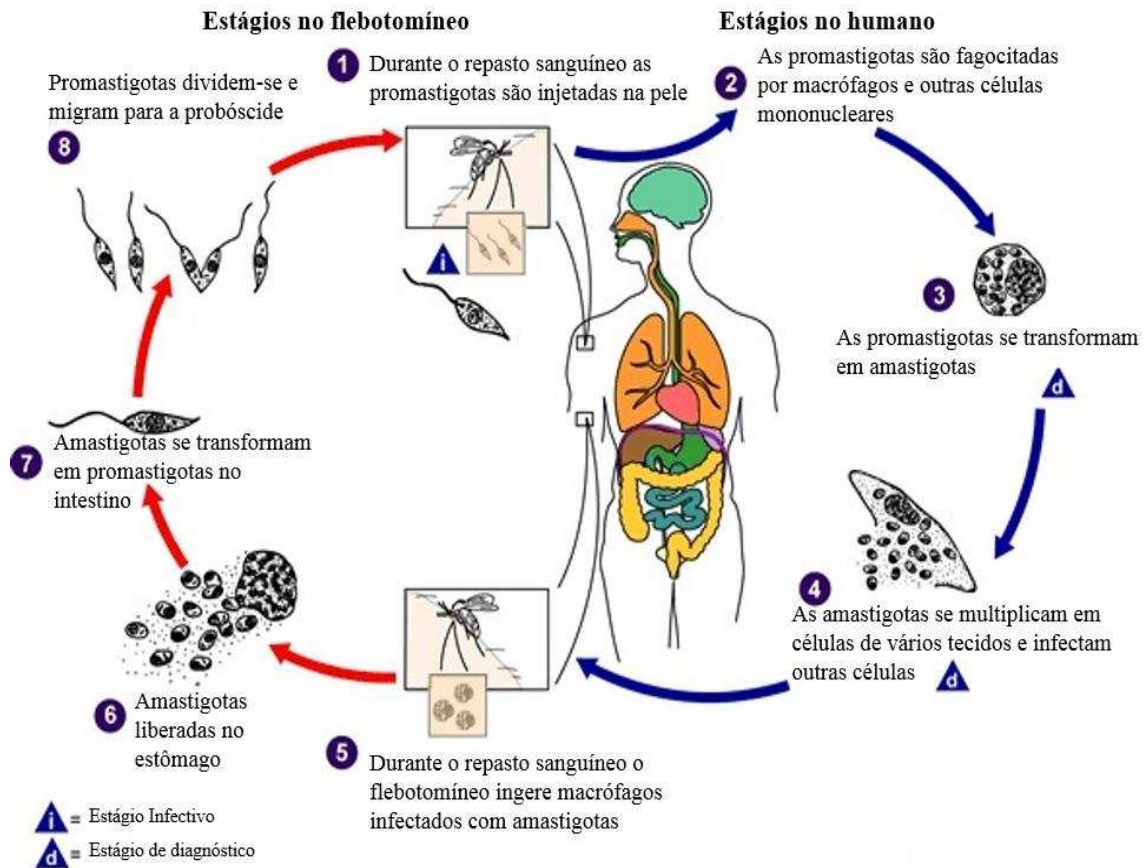
## 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 – Leishmania e Leishmanioses

As Leishmanioses compreendem um amplo espectro de doenças causadas por parasitos protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (Família Trypanosomatidae, Ordem Kinetoplastida). Esses parasitos possuem ciclo de vida heteróxico, compreendendo hospedeiros invertebrados (fêmeas dos flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* ou *Phlebotomus*) e diversos hospedeiros vertebrados mamíferos. No hospedeiro invertebrado, as formas promastigotas procíclicas (flageladas) colonizam o intestino do vetor e se multiplicam. Ao se transformarem em promastigotas metacíclicas, migram para as glândulas salivares dos flebotomíneos, podendo ser transmitidas ao hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. As formas promastigotas metacíclicas são então fagocitadas por células fagocíticas (principalmente macrófagos), onde se convertem nas formas amastigotas (arredondadas e sem flagelo) que sobrevivem e se multiplicam em vacúolos parasitóforos. Após intensa proliferação ocorre a ruptura da célula hospedeira e liberação dos amastigotas que podem novamente infectar outras células. A figura 1 mostra de maneira resumida o ciclo de vida deste parasito.

Essa doença atinge significativa parte da população mundial, principalmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, sendo endêmicas em várias regiões do Brasil. Os sintomas clínicos podem abranger desde uma lesão cutânea simples (leishmaniose cutânea e mucocutânea), com tendência à cura espontânea, até uma doença sistêmica extremamente grave (leishmaniose visceral), com crescente ascensão em pacientes imunossuprimidos. No mundo, mais de 12 milhões de pessoas em 98 países encontram-se infectadas, 350 milhões correm risco de infecção, 2 milhões de novos casos são reportados por ano (1,5 milhões para a leishmaniose cutânea e 500.000 para a visceral) e são estimadas 60.000 mortes anuais [13],[2],[14].

Os agentes causadores da Leishmaniose são capazes de resistir ao arsenal de defesa da imunidade inata e conseguem se proliferar dentro das células do hospedeiro. Todas espécies possuem um forte tropismo pelos macrófagos, apesar de também conseguirem infectar várias outras células em mamíferos (fagocíticas e não fagocíticas) [15],[16],[17],[18].



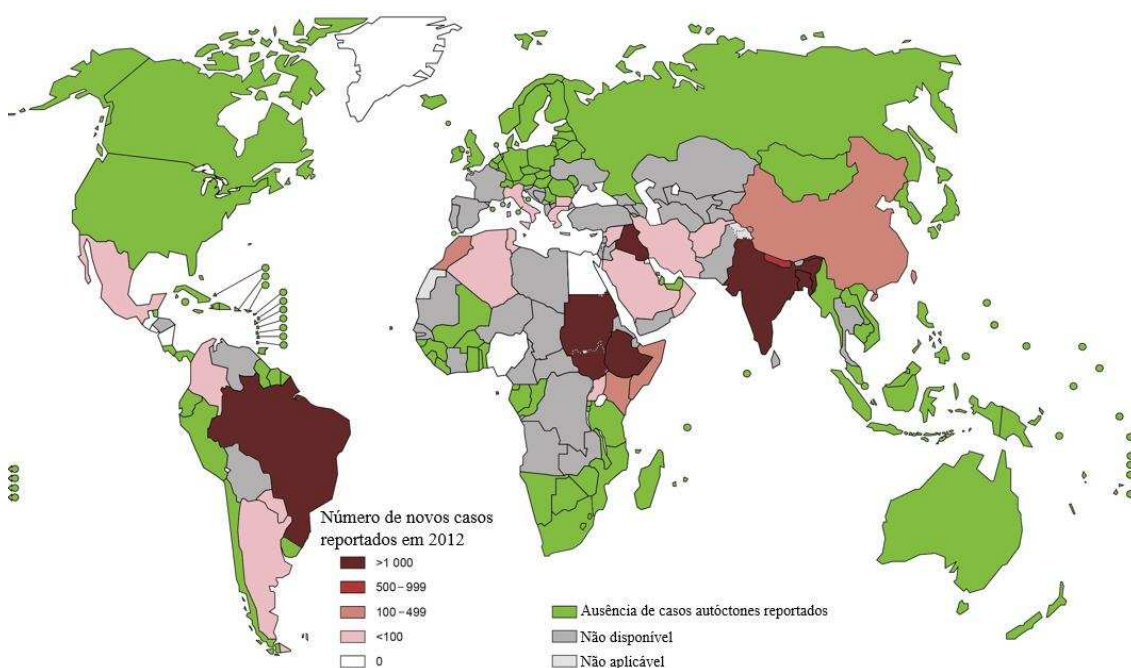
**FIGURA 1:** Ciclo de vida de *Leishmania*, demonstrando os estágios do parasito no hospedeiro invertebrado (flebotomíneo) e no hospedeiro vertebrado (humano).

Fonte: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>

Ao contrário da maioria dos patógenos que infectam macrófagos, a forma proliferativa de *Leishmania* habita os fagolisossomos no interior dessas células, sendo este parasito capaz de escapar do sistema imune modulando diversas vias de sinalização que regulam as respostas de defesa do hospedeiro [19],[20],[21]. O curso da doença é extremamente dependente dos estágios iniciais da infecção, que envolve essas diversas interações moleculares e vias de sinalização entre os macrófagos e os parasitos [22],[23],[24].

## 2.2 –Leishmaniose Visceral (LV)

Principal objeto de estudo do presente trabalho, a leishmaniose visceral (LV) é uma doença potencialmente fatal. Dentre os 500 mil casos relatados por ano, 60% ocorrem no subcontinente Indiano (Índia, Bangladesh e Nepal), principalmente entre as populações mais pobres das áreas rurais. Ultimamente tem sido considerada um problema de saúde pública emergente, devido a seu aparecimento nos grandes centros urbanos [2]. O mapa da distribuição de novos casos da LV pelo mundo em 2012 é demonstrado na figura 2.



**FIGURA 2:** Mapa da distribuição mundial da LV e números de novos casos reportados pela Organização Mundial de Saúde no ano de 2012. Só no Brasil foram relatados mais de mil novos casos. Fonte: [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis\\_VL\\_2013.png?ua=1](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_VL_2013.png?ua=1)

A LV acomete vísceras como fígado e baço, além da medula óssea e linfonodos, podendo ocasionar aumento de volume abdominal (hepatoesplenomegalia), febre alta, perda substancial de peso, anemia, hemorragia e se não tratada tem um grau de fatalidade de quase 100% em aproximadamente dois anos [25]. Nas Américas, bem como no Brasil, esta doença tem como agente etiológico principal a espécie *Leishmania infantum* (atualmente *Leishmania chagasi* é considerada sinônimo de *L. infantum*) [26], mas neste

estudo será chamada de *L. infantum chagasi* para discriminar que o trabalho foi conduzido com a cepa isolada no Brasil.

No Brasil, os principais vetores responsáveis pela transmissão da LV são flebotomíneos das espécies *Lutzomyia longipalpis* (mais abundante) e *Lutzomyia cruzi* conhecidos popularmente como “mosquito palha, birigui, asa branca, tatuquira e cangalhinha”. Com atividade crepuscular e noturna, o flebotomíneo adapta-se facilmente ao peridomicílio e a variadas temperaturas, podendo ser encontrado no interior dos domicílios e em abrigos de animais domésticos, aumentando consideravelmente o poder de dispersão e capacidade adaptativa dos parasitos causadores desta zoonose [27]. Animais silvestres como raposas (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyonthous*) e marsupiais (*Didelphis albiventris*) servem como reservatório primário de infecção para o vetor. No ambiente urbano o cão (*Canis familiaris*) é considerado o principal reservatório e fonte de infecção, transmitindo o parasito ao vetor durante o repasto sanguíneo [1]. Por ser altamente susceptível à infecção e apresentar intenso parasitismo cutâneo, os cães são considerados o principal reservatório do parasito com importância na epidemiologia da Leishmaniose Visceral humana [28].

De acordo com o Ministério da Saúde (<http://portal.saude.gov.br/saude/>) a LV é uma doença endêmica, com registro de surtos frequentes e aproximadamente 90% dos casos registrados nas Américas ocorrem no Brasil. No período entre 1980 e 2005 o Brasil registrou 59.129 casos, dos quais 82,5% foram registrados na região nordeste. Inicialmente limitada a áreas rurais e a pequenas localidades urbanas, a LV encontra-se em franca expansão para grandes centros urbanos. Este crescimento se relaciona principalmente ao desenvolvimento econômico, mudanças de hábitos e alterações ambientais que expõem mais a população e os cães aos vetores da doença. O conhecimento ainda limitado sobre alguns aspectos dessa enfermidade torna seu controle bastante difícil [2].

### **2.3 – Estratégias de controle**

As estratégias de controle da doença no Brasil são baseadas na eutanásia dos cães soropositivos, tratamento sistêmico dos casos humanos e controle do vetor [29]. Porém, essas medidas adotadas demonstram-se ineficientes no controle da leishmaniose, pois não conseguem evitar a transmissão da doença por cães assintomáticos. Além disso, a própria

dinâmica populacional canina também contribui para o fracasso do programa de controle, já que os animais eutanasiados são rapidamente substituídos por outros cães, que podem adquirir a infecção em um curto espaço de tempo. Ainda soma-se a esses fatores a migração de animais de regiões endêmicas para regiões indenes resultando na instalação de novos focos [30],[31].

Com relação aos tratamentos quimioterápicos veterinários, o uso rotineiro de drogas em cães induz a remissão temporária dos sinais clínicos, porém, não previne a ocorrência das frequentes recidivas, tem efeito limitado na infectividade para o flebotomíneo e apresenta elevado risco de selecionar parasitas resistentes às drogas utilizadas [32]. Por causa desses problemas, o Ministério da Saúde emitiu a Portaria Interministerial 1426/2008 de 14/07/2008, proibindo em todo o território nacional o tratamento da leishmaniose visceral em cães infectados ou doentes com produtos de uso humano ou produtos não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Dos métodos disponíveis para diagnóstico da leishmaniose visceral canina e humana, os mais utilizados são o teste de aglutinação direta, imunocromatografia, ELISA e PCR. A Organização Mundial de Saúde considera como mais apropriados e recomenda para os programas de controle o teste de aglutinação direta (que usa antígenos de promastigotas para detectar anticorpos presentes no soro) e o teste de imunocromatografia (que se utiliza do antígeno recombinante rK39 para a detecção). Apesar das recomendações, esses métodos disponíveis possuem baixa sensibilidade e/ou especificidade, podendo apresentar resultados distintos para diferentes estágios da doença, por exemplo. No caso dos cães, os testes não discriminam animais vacinados de animais infectados naturalmente, ou até mesmo animais infectados sintomáticos de animais infectados assintomáticos [33]. O Ministério da Saúde brasileiro recomenda que o diagnóstico para LV seja realizado através das técnicas de imunofluorescência indireta (IFI) ou ELISA [34]. No entanto, em amostras coletadas de cães da região de Belo Horizonte – MG foi observada reação cruzada nos testes de imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA para *L. braziliensis*, *Trypanosoma cruzi* e *Ehrlichia canis* [35].

Muita atenção tem sido dada às estratégias de vacinação, sendo a mais alta prioridade no campo de novas estratégias para prevenir a leishmaniose. Embora evidências sobre desenvolvimento de imunidade duradoura contra a leishmaniose tenha inspirado a formulação de protocolos de vacinação contra a doença, poucos têm

progredido além dos estágios experimentais. Vários antígenos recombinantes têm sido testados em protótipos vacinais ou como vacinas de DNA, mas a maioria dos resultados observados levou apenas à proteção parcial ou nenhuma proteção frente a infecções experimentais [36].

No mercado brasileiro apenas uma vacina contra a leishmaniose visceral canina está devidamente registrada no MAPA, a Leish-Tec, comercializada pelo laboratório Hertape Calier Saúde Animal. A Leishmune®, que era comercializada pelo laboratório Fort Dodge Saúde Animal, foi descontinuada. Apesar de tais vacinas já terem passado pelos estudos de fase I, II e III, o Ministério da Saúde, através da normativa interministerial 31 (IN-31), não recomenda o seu uso em saúde pública por entender que testes complementares para esse fim são necessários e manteve a indicação de eutanásia de animais soro-reagentes, mesmo vacinados, que porventura sejam encontrados nas áreas de transmissão onde inquéritos caninos foram realizados (Nota Técnica de 29 de setembro de 2005), dado que os testes diagnósticos utilizados pelos laboratórios públicos não conseguem distinguir entre animais vacinados e naturalmente infectados.

#### **2.4 – Nucleotídeos extracelulares e Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases**

Os nucleotídeos extracelulares são descritos na literatura como moléculas mensageiras em diversos tipos celulares. No sistema imune eles participam da regulação das respostas pro-inflamatórias, incluindo a proliferação de linfócitos, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e da liberação de citocinas e quimiocinas [37].

No ambiente extracelular os nucleotídeos (ex: ATP, UTP, ADP e NAD), nucleosídeos e seus derivados são liberados de forma controlada por diferentes tipos celulares para fornecer as respostas iniciais da sinalização purinérgica [38]. Os componentes finais da via de sinalização purinérgica compreendem as ecto-nucleotidases, que hidrolisam nucleotídeos extracelulares para gerar outros nucleotídeos e nucleosídeos. Assim, as ecto-nucleotidases podem “desligar” a sinalização através da diminuição da concentração dos substratos que ativam o receptor purinérgico, ou elas podem “ligar” a sinalização se o produto de sua atividade for um ativador da via purinérgica [39],[40].

Dentre as importantes enzimas que formam a família das ecto-nucleotidases estão as Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases (E-NTPDases) [41], que podem ser encontradas na superfície celular, nas membranas de algumas organelas, solúveis no

citossol, ou até mesmo secretadas [42]. Essa família de proteínas compartilha cinco domínios conservados, chamados de regiões conservadas de apirase (ACRs), que são essenciais para sua atividade catalítica [39], [43], [44]. Resumidamente, as E-NTPDases hidrolisam ATP a ADP e este em AMP, que pode ser hidrolisado em adenosina pela 5'-ecto-nucleotidase [45].

Estas enzimas possuem diversos papéis nas vias de sinalização de organismos eucarióticos [46],[47],[48],[49],[50]. Muitos patógenos podem subverter a resposta imune do hospedeiro através da produção de adenosina, que é o produto final da ação conjunta da E-NTPDase com a 5'-ecto-nucleotidase. Este nucleosídeo modula funções celulares via receptores de membrana acoplados às proteínas G (A1, A2A, A2B, A3) [51]. A expressão diferencial dos receptores de adenosina em vários estágios da inflamação é importante para um controle preciso de sua capacidade de resposta, maximizando suas habilidades em alterar as funções celulares de forma que geralmente leve a uma restauração da homeostase [52].

As E-NTPDases já foram encontradas em vários parasitos protozoários: *Toxoplasma gondii* [53], *Trichomonas vaginalis* [54], *Trypanosoma cruzi* [55], *Leishmania amazonensis* [56], *Leishmania braziliensis* [57] e outros organismos [58]. Em Tripanossomatídeos essas enzimas são importantes componentes da via de salvação de purinas [55], visto que esses parasitos são incapazes de realizar a síntese de novo de purinas [59]; além de outros papéis que serão discutidos no próximo tópico.

## **2.5 - Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases de *Leishmania***

Várias moléculas secretadas ou expressas por *Leishmania* estão de alguma forma relacionadas à inativação de funções importantes nos macrófagos, tais como a produção de óxido nítrico (NO), interleucina-12 (IL-12), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas moléculas modulam as vias de sinalização da célula hospedeira favorecendo a infecção e manutenção do parasito [60].

Durante os últimos anos as E-NTPDases vêm se destacando como moléculas importantes para a infectividade de *Leishmania* e também como fatores de virulência. Dados da literatura sugerem que as E-NTPDases participam do estabelecimento da infecção [8],[7], do desenvolvimento de sinais clínicos [9] e promovem inibição da ativação de macrófagos [61]. Nesses organismos foram identificadas duas isoformas de E-NTPDases: a E-NTPDase 1 (de aproximadamente 70 kDa), também conhecida como

guanosina difosfatase e que é mais similar à E-NTPDase 1 de *T. cruzi*, descrita pela primeira vez por nosso grupo de pesquisa [55]; a E-NTPDase 2 (de aproximadamente 40 kDa), também conhecida como uma ATP-difosfohidrolase ou nucleosídeo difosfatase [58].

O primeiro grupo a estudar as ecto-nucleotidases na superfície de *Leishmania* foi o coordenado por Meyer-Fernandes, que demonstrou a presença de ecto-ATPases dependentes de Mg em promastigotas de *Leishmania tropica* [62]. Posteriormente o mesmo grupo também demonstrou a presença de uma ecto-ATPase dependente de Mg em *L. amazonensis* e sua possível participação na aquisição de adenosina e na virulência. Pela primeira vez foi demonstrado que promastigotas virulentos de *L. amazonensis* apresentavam maior atividade ecto-ATPásica quando comparados a uma cepa não virulenta [63]. Posteriormente, Maioli e colaboradores relataram que *L. amazonensis* possui uma maior atividade AMPásica que *L. braziliensis*, tendo essa diferença de atividade uma correlação positiva com a imunossupressão em camundongos [8].

Em 2006, Pinheiro e colaboradores demonstraram que a E-NTPDase de superfície da *L. amazonensis* é uma proteína da família CD39 e que essa enzima poderia ter um importante papel na via de salvação de purinas. Os autores também relataram uma maior expressão e atividade dessas proteínas nas formas amastigotas, além de observar que a adenosina regula negativamente a expressão dessa enzima. Adicionalmente, também relataram que anticorpos contra E-NTPDases levaram a uma diminuição da adesão de promastigotas em macrófagos peritoneais de camundongos [56].

No ano de 2008 Marques-da-Silva e colaboradores demonstraram que *L. amazonensis*, espécie mais virulenta, hidrolisa quantidades maiores de ATP, ADP e AMP quando comparada a *L. braziliensis* e *L. major*, o que pode ser relacionado à maior expressão da E-NTPDase 2 na membrana de *L. amazonensis*. Além disso, os autores observaram uma maior atividade AMPásica pela 5'-ecto-nucleotidase deste parasito, que foi relacionada ao aumento nos tamanhos das lesões e da carga parasitária, além de um atraso na cura das lesões nas infecções causadas em modelo murino [27].

Recentemente Gomes e colaboradores investigaram o papel da E-NTPDase 2 de *L. amazonensis* na infecção de macrófagos. Os autores observaram que uma alta atividade desta enzima na superfície dos parasitos aumentou as taxas de sobrevivência em células ativadas por LPS/IFN- $\gamma$ . Por outro lado, a inibição da E-NTPDase 2 causou uma

diminuição das taxas de sobrevivência e maior ativação dos macrófagos, além de ter levado a uma redução da sobrevivência do parasito em macrófagos J774 ativados [61].

Os relatos consistentes da participação das E-NTPDases de *L. amazonensis* na infecção e a evidência da presença das mesmas ortólogas às E-NTPDases 1 e 2 em *L. infantum* impulsionou nosso grupo de pesquisa a caracterizar essas enzimas nesta espécie. Em 2013, foi investigado o uso da E-NTPDase-2 de *L. infantum* (Lic-E-NTPDase-2) como antígeno para diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina (CVL) por ensaio de ELISA. Neste trabalho, anticorpos contra a E-NTPDase-2 foram detectados nas amostras de 100% dos cães infectados, independentemente do estágio da doença, demonstrando a expressão desta proteína em *L. infantum* e destacando sua imunogenicidade [12]. Posteriormente, nosso grupo estudou a atividade ecto-nucleotidásica da Lic-E-NTPDase-2, sua expressão em promastigotas e sua possível participação na infecção de macrófagos. Foi confirmado que essa enzima é uma nucleotidase genuína da família CD39, já que sua capacidade de hidrolisar nucleotídeos tri e difosfatados (ATP, ADP, GTP, GDP, UTP e UDP mas não AMP) é dependente de cátions divalentes ( $Mg^{2+}$  ou  $Ca^{2+}$ ) e inibida parcialmente através do uso de inibidores da família CD39. A atividade nucleotidásica da proteína recombinante foi similar à observada em promastigotas vivos e adicionalmente, foi detectada a expressão das E-NTPDases na superfície dessas células. Também foi investigado o papel da Lic-E-NTPDase-2 durante a adesão e infecção por *L. infantum* em macrófagos, onde os resultados sugerem que esta proteína participa como um facilitador desses processos. Em ensaios realizados com anticorpo anti-E-NTPDase-2 ou com a proteína recombinante, ambos funcionando como competidores, observou-se significativa diminuição nos índices de adesão e infecção dos macrófagos; entretanto, a proliferação do parasito dentro dessa célula não foi afetada. Desde modo, os resultados sugerem a existência de um possível sítio de ligação (talvez um receptor desconhecido) para a Lic-E-NTPDase-2 em macrófagos, que poderia participar na facilitação da adesão e da infecção [58]. Estes dados corroboram com resultados anteriores observados em *Trypanosoma cruzi* [64].

## **2.6 – Sistemas de expressão heteróloga**

O advento da clonagem gênica aliado ao posterior surgimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) permitiram que inúmeras novas possibilidades fossem

criadas dentro dos laboratórios de pesquisa. Além do surgimento de novas disciplinas (biotecnologia moderna, ciência forense, ecologia molecular, arqueologia biomolecular, entre outras), surgiram também os grandes projetos de sequenciamento de genomas, estudos nos processos de regulação de genes, identificação de organismos pela filogenética molecular, isolamento e caracterização de genes individuais, entre outros.

No domínio das incontáveis ferramentas de biologia molecular disponíveis, sugeriram diversos sistemas de clonagem molecular e também de expressão de proteínas recombinantes, que permitem o isolamento e a produção de proteínas específicas para diferentes finalidades biotecnológicas. Na teoria, os passos para se obter uma proteína específica são relativamente simples: escolha do sistema de expressão, isolamento do gene alvo, clonagem molecular, expressão e purificação. Entretanto, a simplicidade não deve ser confundida com facilidade, já que várias características das proteínas alvo devem ser avaliadas antes de se escolher um sistema de expressão, pois cada um possui seus pontos positivos e negativos. Dentre as principais características a serem avaliadas estão: tamanho do gene/proteína a ser expresso, localização intracelular ou secreção, obrigatoriedade de dobramento correto, padrão de glicosilação, presença de códons raros, rendimento final e necessidade de aumento na escala de produção, estratégia de purificação, entre outros.

Em geral, a primeira escolha dos pesquisadores que buscam obter determinada proteína é a sua clonagem e expressão em *E. coli*, que é um organismo já bastante conhecido e explorado na ciência, com diversas ferramentas disponíveis. Como sistema de expressão possui muitas vantagens: é simples de manusear e barato, a proteína alvo pode ser obtida em poucas horas e com alto rendimento, grande variedade na disponibilidade de técnicas e de protocolos na literatura científica. Até o ano de 2003, aproximadamente 80% das estruturas tridimensionais de proteínas depositadas no banco de dados (PDB) foram obtidas através da expressão em sistemas bacterianos (90% deles obtidos via expressão em sistemas pET, baseados no promotor T7) [65].

No entanto, mesmo com as diversas vantagens, os sistemas de expressão baseados em *E. coli* possuem suas limitações. Um dos fatores limitantes conhecidos é o uso preferencial de códons (codon bias usage), visto que alguns RNAs transportadores (tRNAs) correspondentes à arginina, prolina, isoleucina e leucina são encontrados em baixas quantidades nesta bactéria [66]. Existem estratégias disponíveis para contornar esse problema e dentre as mais utilizadas estão: o uso de cepas modificadas, como a BL21

(DE3) por exemplo, que contêm cópias extras dos tRNAs raros [67]; a construção sintética do gene, de modo a substituir os códons raros por cópias mais frequentes [66]. No entanto, em alguns casos relatados na literatura essas metodologias produziram efeitos indesejáveis, visto que a relação entre a expressão heteróloga e o uso de códons preferenciais não é tão simples como algumas vezes é sugerida [68]. O trabalho publicado por Lammertyn e colaboradores por exemplo, mostrou que o ajuste de códons levou a uma diminuição da estabilidade do mRNA e conseqüentemente a um menor rendimento na expressão [69].

Outra situação que pode ser um empecilho e que muitas vezes ocorre durante a superexpressão de proteínas recombinantes em *E. coli* é a formação de corpos de inclusão, que são agregados citoplasmáticos ou periplasmáticos insolúveis de proteínas dobradas incorretamente [70]. A recuperação de proteínas em suas formas ativas a partir dos corpos de inclusão pode ser muitas vezes trabalhosa, adicionando passos extras aos experimentos e muitas vezes resultando em baixo rendimento na obtenção da proteína de interesse [71].

Existem outros sistemas procarióticos que são menos utilizados mas que oferecem algumas vantagens à expressão em *E. coli*, tais como a possibilidade de secreção das proteínas-alvo para o meio de cultivo [72],[73],[74], ausência de endotoxinas [73],[74]. Contudo, esses sistemas também sofrem com alguns inconvenientes similares aos observados em *E. coli*, dentre eles o dobramento incorreto, formação de corpos de inclusão e degradação da proteína de interesse (*Lactococcus lactis*) [72]. Outros sofrem com instabilidade genética de plasmídeos e necessidade de integração dos genes recombinantes no genoma, o que diminuí os níveis de expressão (*Bacillus*) [73]; limitação quanto ao tamanho das proteínas expressas (*Caulobacter crescentus*) [74]; baixos níveis de expressão (*Streptomyces lividans*) [75].

Alguns organismos eucarióticos também vêm sendo utilizados para expressão heteróloga de proteínas, com destaque para leveduras, células de mamíferos, células de inseto e *Leishmania*.

Os benefícios no uso de leveduras como sistema de expressão são sua capacidade de crescer em grande densidade celular, secretar grandes quantidades da proteína recombinante (similar à bactéria em alguns casos) e realizar modificações pós-traducionais (glicosilação). No entanto, os padrões de glicosilação obtidos em leveduras são diferentes do organismo original, geralmente levando a uma super-glicosilação da

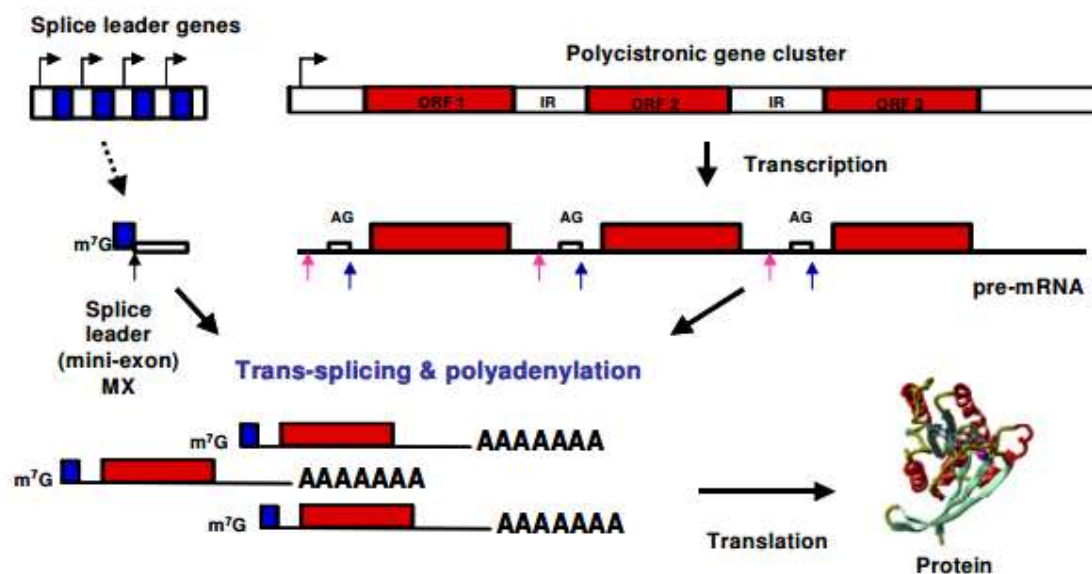
proteína recombinante [76]. As leveduras também possuem limitações quanto ao uso de promotores, visto que promotores heterólogos não funcionam nesse sistema [77]. Dentre outros problemas, em alguns tipos de proteínas os rendimentos de expressão são baixos, particularmente em casos de produção de hetero-oligômeros, proteínas de membrana ou proteínas propensas à degradação proteolítica [78].

A expressão de proteínas em sistemas baseados em linhagens celulares de mamíferos são implantados quando o padrão de glicosilação da proteína alvo possui relevância na atividade da molécula (receptores, secreção, moléculas de adesão, reconhecimento) ou quando é necessária a produção de proteínas de alto peso molecular (tais como fatores do sangue e anticorpos multiméricos) [66]. Dentre as desvantagens desse sistema, destacam-se o crescimento lento das células, níveis de expressão mais baixos, meios de cultivo bem mais caros, necessidade de crescimento em meios mais complexos [77].

As linhagens celulares de inseto possuem algumas vantagens quando comparadas às de mamíferos. Elas crescem bem em meios de cultura definidos, sem a necessidade de adição de produtos de origem animal e possuem um perfil viral mais seguro, os níveis de expressão são melhores e crescem mais rápido [66],[77]. As células de inseto realizam modificações pós-traducionais, como a N-glicosilação, mas com algumas diferenças na natureza das cadeias de oligossacarídeos. Provavelmente isto ocorre porque as células de inseto não conseguem processar os oligossacarídeos maduros da mesma forma que as células de mamíferos [79]. Além do mais, apesar de os sinais de secreção de mamíferos serem reconhecidos pelo sistema de insetos, outros sítios de proteólise são mal ou não reconhecidos nessas culturas [80].

## **2.7 – *Leishmania tarentolae* como sistema de expressão**

A família Trypanosomatidae, onde destacam-se os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, possui características únicas. Os mRNAs desses organismos são transcritos como precursores policistrônicos, processados de maneira pós-transcricional em mRNAs individuais por mecanismos de trans-splicing e poliadenilação nas regiões intergênicas. A regulação da expressão proteica ocorre principalmente a nível do RNA e pode ser influenciada pela estrutura das regiões intergênicas [81],[82]. A figura 3 demonstra o processo geral de síntese do mRNA em tripanossomatídeos.



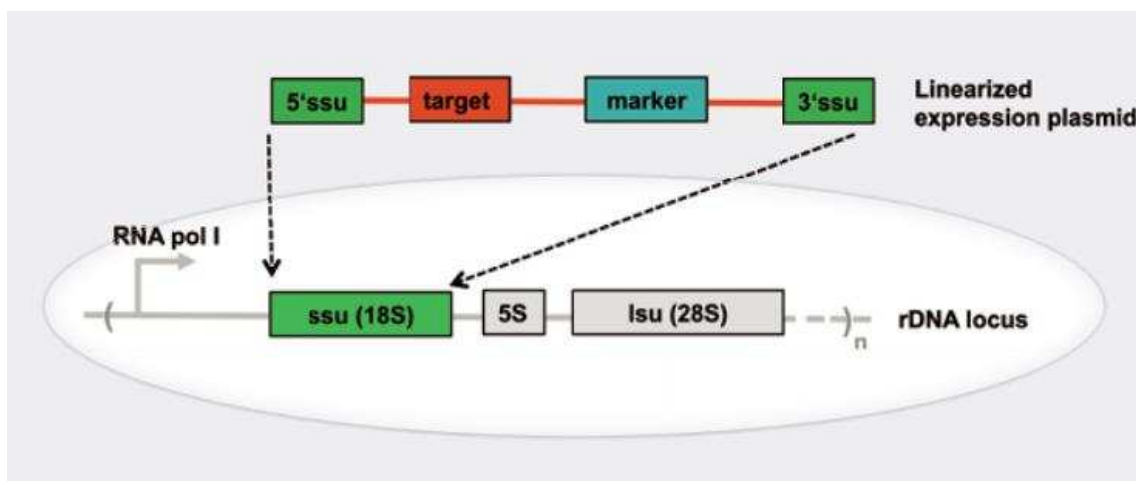
**FIGURA 3:** Processo geral da síntese de mRNA em tripanossomatídeos. Os genes desses organismos estão organizados em grandes grupos policitrônicos (ORFs, em vermelho) direcionais na mesma fita de DNA de um cromossomo. Os genes do RNA Splice leader (SL, em azul) estão localizados em outro cromossomo, contendo várias cópias em tandem dessas estruturas. A transcrição policitrônica é mediada pela RNA Polimerase II e os mRNAs maduros são obtidos por duas reações de clivagem: a primeira, chamada de trans-splicing, adiciona o SL na região 5' terminal de todos os transcritos de *Leishmania*, e a segunda, a poliadenilação, adiciona nucleotídeos de adenina na região 3' terminal dos transcritos [81],[82]. Fonte: manual do sistema LEXSYcon2 Expression Kit (Jena Bioscience).

Os integrantes desta família são organismos ricos em glicoproteínas, que podem compreender até mais de 10% das proteínas totais [83]. Muitas vezes as estruturas dos oligossacarídeos dessas glicoproteínas são similares às de mamíferos e em alguns casos, podem até incluir oligossacarídeos complexos, como por exemplo a fucose, resíduos de ácido siálico e  $\alpha$ -galactose [84].

A disponibilidade de ferramentas moleculares aliadas às modificações pós-traducionais realizadas pelos membros da família Trypanosomatidae os torna bastante atrativos para o uso em aplicações biotecnológicas. Graças a esforços de parasitologistas moleculares, alguns métodos de manipulação genética e expressão heteróloga em membros desta família já foram reportados com sucesso. Proteínas de mamíferos produzidas a partir desses organismos foram purificadas em pequenas quantidades (microgramas por litro de cultura) mas biologicamente ativas [85],[86],[87]. Entretanto, baixo rendimento não é o maior dos problemas e sim o fato desses ensaios terem sido

realizados com espécies patogênicas a humanos. Dentre outros empecilhos também devem ser consideradas as baixas taxas de crescimento e a necessidade do uso de soro para o cultivo, limitando assim o potencial desse sistema de expressão [88].

O protozoário *Leishmania tarentolae*, isolado inicialmente da lagartixa *Tarentola mauritanica* [89], é um parasito não patogênico a mamíferos encontrado em algumas espécies da família Gekkonidae. Em 2002, Breitling e colaboradores desenvolveram um vetor de expressão para *L. tarentolae* capaz de promover produção de proteínas heterólogas em alto rendimento, tanto via produção intracelular quanto via extracelular (secreção), denominando este como Sistema de Expressão em *Leishmania* (LEXSY - *Leishmania* Expression System). Através da integração dos genes de interesse ao locus da subunidade 18S do DNA ribossômico (ssu) as proteínas escolhidas foram produzidas via expressão constitutiva, sob controle da RNA polimerase I [88]. A arquitetura deste sistema de expressão é mostrada na figura 4.



**FIGURA 4:** Arquitetura do sistema LEXSY constitutivo (cepa P10). O plasmídeo linearizado é utilizado na transfecção da célula e integrado na região do gene 18S do rRNA (ssu) por recombinação homóloga. Fonte: retirada do site [www.jenabioscience.com](http://www.jenabioscience.com) (Jena Bioscience).

Também já foi investigada a capacidade dessa espécie em produzir glicoproteínas recombinantes. A expressão da eritropoietina humana (EPO) em *L. tarentolae* provou que essa proteína foi eficientemente secretada, clivada na região apropriada, mostrando-se biologicamente ativa nos ensaios. Ao se analisar as estruturas dos N-glicanos, foi constatado que *L. tarentolae* foi capaz de produzir glicosilações semelhantes às de eucariotos superiores, notando-se apenas a ausência de ácido siálico. Além disso, o repertório de glicosilação produzido por essa célula demonstrou bastante homogeneidade,

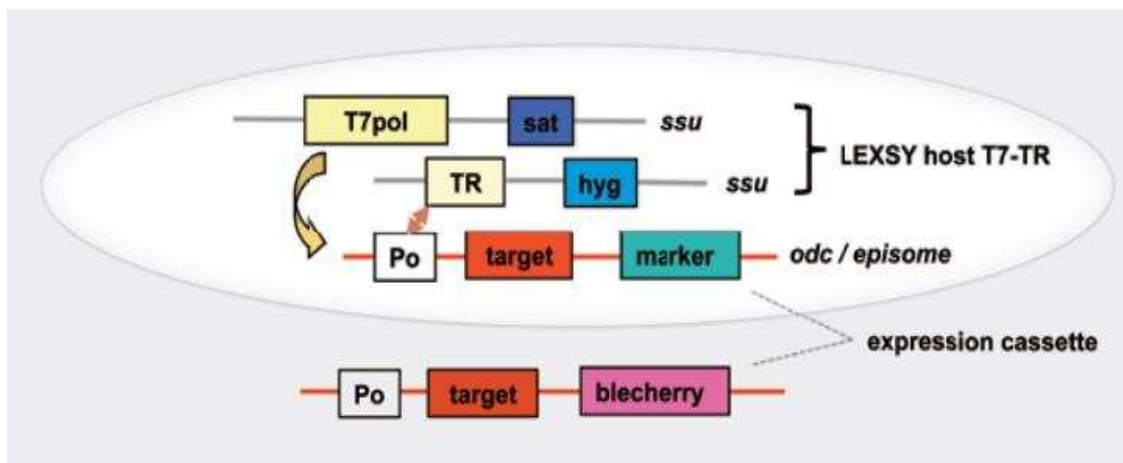
o que é particularmente importante em estudos estruturais de proteínas (cristalização) ou na produção de produtos para fins farmacêuticos (onde a consistência na glicosilação é alvo de regulamentação rigorosa). Na discussão do trabalho, os autores sugeriram ainda a possibilidade de aumento dos níveis de expressão através da integração de mais cópias do gene de interesse ou pela clonagem deste gene sobre o controle de um promotor heterólogo forte [88], como a T7 RNA polimerase (que se mostrou 10 vezes mais eficiente que a Pol I em Trypanosomatidae) [90],[91].

Um problema fundamental na expressão de proteínas heterólogas em organismos eucarióticos está relacionado ao fato de todos esses sistemas serem baseados em organismos de vida livre que utilizam sua RNA polimerase II endógena (Pol II) para realizar a transcrição. Devido às constantes alterações no meio em que vivem, os eucariotos de vida simples são forçados a controlar constantemente sua expressão gênica, principalmente em nível transcricional. Em alguns casos, induzir a superexpressão de proteínas heterólogas pode afetar a fisiologia do hospedeiro, levando a uma redução da expressão da proteína recombinante pela ativação de mecanismos de controle transcricionais. A complexidade desta maquinaria de controle transcricional opõe-se à construção de eucariotos que produzam grandes quantidades de proteínas [92].

Uma das manipulações que obtiveram sucesso e que é amplamente utilizada atualmente foi obtida com a implementação da maquinaria de transcrição/tradução do bacteriófago T7 (T7 polimerase) em sistemas de expressão baseados em *E. coli* [93]. A bactéria não consegue controlar a polimerase de alta processividade do fago, que inunda a célula do hospedeiro com RNA heterólogo. Contudo, transplantar essa abordagem para as plataformas de expressão eucarióticas não é possível devido ao acoplamento da transcrição do DNA com o processamento de RNA. Transcritos gerados por RNA polimerases estrangeiras permanecem sem o CAP 5' nas células eucarióticas, sendo assim degradados [94]. Existem duas soluções possíveis para esse problema: desenvolver um sistema onde a adição do CAP 5' pode ser ignorada ou utilizar um organismo onde a transcrição e a tradução são naturalmente desacopladas. A primeira abordagem utilizaria a tradução mediada por um mecanismo independente da adição do CAP5', mas esta estratégia é complicada já que necessita da identificação dos sítios de entrada internos do ribossomo (IRES) e essas sequências não foram encontradas até agora em nenhum sistema existente [95].

Em 2005, Kushnir e colaboradores utilizaram-se da segunda solução. Aproveitando-se das características únicas da maquinaria de transcrição/tradução dos Tripanosomatídeos (citadas anteriormente) e da capacidade de *Leishmania* e *Trypanosoma* em traduzirem de forma eficiente mRNAs gerados pela RNA polimerase I ou via polimerases estrangeiras (tais como a T7 e T3 RNA polimerases) [96],[97]. Os autores construíram um sistema de expressão baseado em uma cepa transgênica de *L. tarentolae*, criada através da integração dos genes da T7 RNA polimerase e do repressor de tetraciclina (TET) em seu genoma (figura 5). Após a construção e estabilização da cepa T7-TR, o gene da proteína repórter EGFP foi clonado sob o controle do promotor T7 e o rendimento final da expressão compreendeu 1-2% de proteínas totais (10 a 20 mg/L, compatíveis com o observado anteriormente para o sistema constitutivo). Ao utilizar duas cópias do gene da *egfp* integradas em diferentes locais do genoma, os níveis de expressão atingiram 4% das proteínas celulares totais. Ainda, os autores destacam que o sistema induzível tem vantagens em relação ao sistema constitutivo em situações onde a expressão de proteínas potencialmente tóxicas é necessária [92].

Os sistemas constitutivos e induzíveis de *L. tarentolae* foram implementados com sucesso mas ambos ainda possuem uma limitação em comum, que é o número limitado de cópias do gene alvo dentro do genoma da célula hospedeira. Apesar de ser possível aumentar o número de cópias de genes integrados no hospedeiro, esses processos são muito lentos e requerem bastante trabalho. Para tentar contornar as limitações da arquitetura induzível, em 2011 Kushnir e colaboradores desenvolveram vetores de expressão multicópia extracromossomais circulares e lineares, utilizados para transfectar as linhagens T7-TR desenvolvidas no trabalho anterior. Em ambas arquiteturas a maioria dos genes testados foram expressos e os níveis de expressão em alguns casos atingiram até 300 mg/L (10% das proteínas totais). Contudo, nos experimentos onde as células foram transfectadas com plasmídeos circulares apenas 20% da população total de células demonstrou altos níveis de expressão. É importante também destacar que os mecanismos de manutenção e propagação episossomal se mostraram únicos em cada caso, com possível integração dos cassetes de expressão nos cromossomos [98].



**FIGURA 5:** Arquitetura do sistema LEXSY induzível (cepa T7-TR). O plasmídeo linearizado é utilizado na transfecção da célula e é integrado no locus do gene da ornitina descarboxilase (odc) por recombinação homóloga (sistema integrativo) [92]; ou transfectado na forma circular ou linear, permanecendo como um elemento extra-cromossomal (sistema epissomal) ao genoma da célula [98] . Fonte: retirada do site [www.jenabioscience.com](http://www.jenabioscience.com) (Jena Bioscience).

Dentre as vantagens adicionais do sistema *L. tarentolae*, ainda vale destacar que seu cultivo pode ser realizado em meios baratos em volumes de 100 L (atingindo densidade de  $4 \times 10^8$  células por mL), são células de fácil rompimento (detergentes suaves ou sonicação são suficientes), permitem a produção da proteína heteróloga no citoplasma da célula ou sua secreção para o meio de cultivo, podem ser cultivadas em meio definido (menores contaminações para fins farmacêuticos) [88].

## 2.8 – *Leishmania tarentolae* e seu uso como modelo experimental para triagem de potenciais drogas leishmanicidas

Os hospedeiros vertebrados naturais de *L. tarentolae* compreendem algumas espécies de lagartos da família Gekkonidae. Esses répteis podem contrair o parasito através da picada do inseto vetor (flebótomo do gênero *Sergentomyia*) ou pela sua ingestão. No réptil, o parasito vive predominantemente em sua forma promastigota, podendo ser encontrado na corrente sanguínea ou colonizando o lúmen da cloaca ou do intestino [99]. Mesmo observando-se promastigotas ou amastigotas livres na corrente sanguínea dos répteis, em seus monócitos raramente foram encontradas amastigotas [99],[100].

Para avaliar a utilidade de *L. tarentolae* como modelo para triagem de agentes leishmanicida, Taylor e colegas conseguiram pela primeira vez cultivar essas células nas formas amastigotas axênicas e confirmaram a capacidade das mesmas em infectar várias células de mamíferos. Os autores notaram que apesar de as amastigotas infectarem macrófagos *in vitro*, elas foram incapazes de causar qualquer patologia ou sintomas ligados às manifestações da doença em hamsters ou camundongos. Esses resultados sugerem que *L. tarentolae* é um bom modelo para realização de testes *in vitro* de compostos com potencial atividade leishmanicida [101].

## **2.9 – Leishmania tarentolae e seu uso na produção de vacinas vivas**

O sequenciamento do genoma da cepa Parrot-TarII de *L. tarentolae* permitiu realizar importantes comparações entre o genoma desta espécie com os genomas de leishmanias patogênicas. Primeiramente observou-se que as espécies possuem entre si um número próximo de genes, em aproximadamente 8200. Além disso, apesar de muitos anos de divergência dentro do gênero, ao se comparar o genoma de *L. tarentolae* com os das espécies patogênicas (*L. infantum*, *L. major*, *L. braziliensis*) foi possível observar que há bastante conservação do conteúdo gênico entre estes organismos. Foram encontradas algumas divergências entre um número limitado de regiões cromossômicas de *L. tarentolae* e *L. infantum*, enquanto que para *L. major* essas regiões permaneceram sintênicas (genes situados no mesmo cromossomo). De uma forma geral, mais de 90% dos genes de *L. tarentolae* são compartilhados com outras espécies de *Leishmania*. Os autores deste trabalho identificaram 95 sequências preditas exclusivas de *L. tarentolae* e 250 genes ausentes nessa espécie. Notoriamente, a maioria dos genes ausentes foram aqueles que são encontrados somente na fase amastigota das espécies patogênicas. Adicionalmente, genes envolvidos na defesa antioxidante ou relacionados ao transporte mediado por vesículas foram identificados em menor representação em *L. tarentolae*. De um modo geral, o conteúdo genético de *L. tarentolae* parece ser mais adaptado ao estágio promastigota do inseto que ao estágio amastigota do mamífero, o que em parte explica o porquê dessa espécie ser menos adaptada para infectar macrófagos humanos e por serem reportadas como organismos predominantemente livres nos lagartos [102].

Apesar de não infectar efetivamente mamíferos, em *L. tarentolae* são encontrados conhecidos fatores de virulência de espécies patogênicas de *Leishmania* (*L. infantum*, *L.*

braziliensis e *L. major*) tais como GP63, LPG3, CPB, amastina, entre outros [102],[103]. Dentre os fatores de virulência ausentes em *L. tarentolae* destaca-se a proteína A2, expressa somente na fase amastigota e primeiramente identificada no complexo *L. donovani* [104]. Esta proteína é considerada um dos principais fatores de virulência em mamíferos e em humanos. Sua transfecção e expressão em *L. major* alterou consideravelmente o tropismo do parasito de cutâneo para visceral [105],[106]. A expressão recombinante da proteína A2 em sistema LEXSY aumentou a infectividade e sobrevivência de *L. tarentolae* no fígado de camundongos BALB/c quando comparada com a célula selvagem. De acordo com Mizbani e colaboradores, apesar dos mecanismos ainda serem desconhecidos, a perda do gene A2 pode ter sido um dos fatores que contribuiu para a perda de virulência de *L. tarentolae* [107].

Sabe-se que *L. tarentolae* pode infectar células fagocíticas humanas e se diferenciar em amastigotas, mas não há evidências concretas sobre sua replicação em macrófagos [108],[101]. Em testes realizados *in vitro*, esta espécie demonstrou tropismo exacerbado por células apresentadoras de antígenos e sobreviveu em seu interior por vários dias, mas os ensaios de infecção em camundongos BALB/c sugerem que estes parasitos não persistem por muito tempo. Utilizando *L. tarentolae* expressando GFP, Breton e colaboradores demonstraram que 1 mês após a infecção nos camundongos não foram encontrados parasitos fluorescentes nas culturas de baço e fígado isolados. Entretanto, em análises microscópicas de tecido humano linfoide cultivado *ex vivo*, foram detectados parasitos duas semanas após a infecção. Mesmo em camundongos com imunodeficiência combinada severa (SCID), que não possuem células B e T, *L. tarentolae* foi incapaz de promover qualquer tipo de patologia, independentemente da dose ou da rota de administração do parasito [108].

A vacinação de camundongos susceptíveis BALB/c com *L. tarentolae* forneceu níveis significantes de proteção em desafio realizado contra *L. donovani*. Além disso, a estratégia de vacinação utilizando-se *L. tarentolae* pode ser otimizada pela clonagem e expressão de epítomos das cepas virulentas ou em combinação desta leishmania recombinante com vacinas de DNA (prime-boost), afim de se obter proteções mais efetivas e duradoras contra as infecções por parasitos virulentos. Assim, *L. tarentolae* pode ser considerada um candidato promissor para a produção de vacinas vivas contra *Leishmania* e talvez, até de outros patógenos intracelulares que dependam da imunidade mediada por células-T para a proteção [108].

### 3 - JUSTIFICATIVA DA PROPOSTA

Como citado anteriormente, o grupo de pesquisa coordenado pela Prof.<sup>a</sup> Dra. Juliana Lopes Rangel Fietto desenvolve pesquisas investigando a relação entre a virulência dos parasitos do gênero *Leishmania* e de *Trypanosoma cruzi* em diferentes espécies e cepas, focando especialmente a relação entre as ecto-nucleotidases e o controle da infecção ou resposta imune do hospedeiro. As E-NTPDases 1 e 2 de *L. infantum* já foram clonadas, expressas e caracterizadas em sistema bacteriano (pelos doutores Matheus Silva e Bastos e Raphael de Souza Vasconcellos, respectivamente) e a potencial aplicação dessas enzimas como agentes vacinais e alvos de drogas foram objeto de patente por nosso grupo de pesquisa.

Recentemente nosso grupo de pesquisa adquiriu dois kits do sistema LEXSY (Jena Bioscience), um de expressão constitutiva e outro de expressão induzível. Como *L. tarentolae* é um organismo extremamente próximo a *L. infantum* em sua constituição genética, além da capacidade dessa célula em realizar modificações pós-traducionais e da sua aplicabilidade como protótipo para produção de vacinas vivas, acreditamos que a produção das E-NTPDases nesse sistema seria um caminho evidente a ser seguido. A possibilidade de se obter uma proteína com suas propriedades praticamente originais à do organismo alvo pode abrir novas perspectivas acerca da atividade e da importância dessas enzimas em *L. infantum* e outras espécies patogênicas. Além disso, as modificações pós-traducionais podem levar a um aumento na imunogenicidade destas proteínas, otimizando a sensibilidade de kits de diagnóstico para leishmaniose e favorecendo seu uso na produção de vacinas vivas.

## 4 – OBJETIVOS

### 4.1 - Objetivos gerais

Devido aos resultados promissores apresentados pelas E-NTPDases 1 e 2 de *L. infantum* chagasi (Lic-E-NTPDases) expressas em sistema bacteriano e tendo em mãos as ferramentas do sistema LEXSY, este projeto tem como objetivo a padronização do uso desse sistema para a produção heteróloga destas proteínas em *L. tarentolae*, almejando avaliar seu potencial em aplicações biotecnológicas.

Além disto este trabalho se propôs a realizar revisão de literatura no âmbito das E-NTPDases de *Leishmania* e sua interação com a sinalização purinérgica na infecção.

### 4.2 - Objetivos específicos

- Desenhar diferentes construções abordando estratégias distintas para a expressão das Lic-E-NTPDases em sistema LEXSY;
- Amplificar as sequências maduras das Lic-E-NTPDases 1 e 2 e clonar os amplicons em sistema LEXSY induzível;
- Padronizar as metodologias de transfecção, seleção clonal e detecção dos possíveis clones expressores da cepa T7-TR de *L. tarentolae* utilizando as construções deste trabalho;
- Pré-selecionar os clones de maior expressão via detecção da co-expressão da proteína mCherry;
- Detectar a expressão da proteína alvo nos clones selecionados;
- Induzir maiores volumes de cultura para posterior purificação das proteínas recombinantes por coluna de afinidade à cauda de histidina (6xHis).

## 5 – MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 – Técnicas Básicas de Biologia Molecular e Bioquímica

Todas as técnicas básicas para biologia molecular e bioquímica não descritas detalhadamente nesta seção, tais como preparo de géis de agarose e de poliacrilamida (SDS-PAGE), eletroforese de DNA e de proteínas, preparo de tampões, Western Blotting e Dot Blotting, foram realizadas de acordo com os protocolos propostos por Sambrook e colaboradores [109].

### 5.2 – Organismos

Durante este projeto, foram cultivadas duas diferentes estirpes de *E. coli*. Para efetuar as transformações bacterianas após as reações de clonagem via kit In-Fusion HD Cloning (Clontech Laboratories), utilizamos as linhagens competentes Stellar (fornecidas pelo kit e recomendadas em seu manual). Nos procedimentos que objetivaram a proliferação de plasmídeos (antes ou após as clonagens), foram utilizadas as células da linhagem DH5 $\alpha$ .

Também foram cultivadas duas diferentes linhagens de *L. tarentolae*: a cepa P10, apropriada para a expressão constitutiva integrativa [88] e a cepa T7-TR, adequada para a expressão induzível episomal [98].

### 5.3 - Estratégias de clonagem

Antes de iniciarmos os experimentos propriamente ditos, elaboramos diferentes estratégias de clonagem para os dois sistemas disponíveis em nosso laboratório, o que consequentemente necessitou do desenho de alguns conjuntos de iniciadores (primers), permitindo assim distintas abordagens de clonagem e expressão das Lic-E-NTPDases.

Como nosso objetivo era realizar as clonagens com a utilização do kit In-Fusion HD Cloning (Clontech Laboratories), os primers foram primeiramente obtidos através da ferramenta on-line disponibilizada pela Clontech ([http://www.clontech.com/US/Products/Cloning\\_and\\_Compentent\\_Cells/](http://www.clontech.com/US/Products/Cloning_and_Compentent_Cells/)

[Selection Guides/Online InFusion Tools](#)) e em alguns casos modificados manualmente de acordo com a necessidade de cada estratégia. Estes primers foram desenhados com a participação do Dr. Ramon de Freitas Santos, que também realizou as clonagens virtuais no programa Geneious 6.0.6 (Biomatters Ltda).

Ao todo foram criadas doze estratégias de clonagem, cada uma compreendendo um clone, sendo seis para cada Lic-E-NTPDase. Estas abordagens variam de acordo com o plasmídeo utilizado (integrativo constitutivo ou episomal induzível), sítios de digestão utilizados para a clonagem, forma de expressão (citossólica, secretória ou deleção do peptídeo sinal), manutenção ou não do peptídeo sinal original de cada Lic-E-NTPDase ou deleção do peptídeo sinal. Os detalhes de cada clone são especificados no quadro 1.

**QUADRO 1:** Diferentes estratégias adotadas para a construção dos clones LEXSY, especificadas de acordo com o nome, detalhes da construção, vetores, sítios de restrição utilizados e tipo de indução.

**Legendas:**

<b>Clone LEXSY</b>	<b>Detalhes da construção</b>	<b>Plasmídeo utilizado</b>	<b>Sítios de restrição</b>	<b>Objetivo</b>
Clone 1	LmSAP_PST_NTPDase1_HisTag	pLEXSY_IE-blecherry4	XbaI_MspCI	Expressão induzível secretória da proteína madura
Clone 2	LmSAP_PST_NTPDase2_HisTag	pLEXSY_IE-blecherry4	XbaI_KpnI	
Clone 3	PST_NTPDase1_HisTag	pLEXSY_IE-blecherry4	BglII_MspCI	Expressão induzível da proteína com seu peptídeo sinal
Clone 4	PST_NTPDase2_HisTag	pLEXSY_IE-blecherry4	BglII_KpnI	
Clone 5	LmSAP_NTPDase1_HisTag	pLEXSY_IE-blecherry4	XbaI_MspCI	Expressão induzível secretória da proteína madura
Clone 6	LmSAP_NTPDase2_HisTag	pLEXSY_IE-blecherry4	XbaI_KpnI	
Clone 7	LmSAP_ΔSPCS_NTPDase1_HisTag	pLEXSY_IE-blecherry4	SalI_MspCI	Expressão induzível com deleção do peptídeo sinal
Clone 8	LmSAP_ΔSPCS_NTPDase2_HisTag	pLEXSY_IE-blecherry4	SalI_KpnI	

Clone 9	LmSAP_NTPDase1_HisTag	pLEXY- neo2	XbaI_MspCI	Expressão constitutiva secretória da proteína madura
Clone 10	LmSAP_NTPDase2_HisTag	pLEXY- neo2	XbaI_KpnI	
Clone 11	LmSAP_ΔSPCS_NTPDase1_His Tag	pLEXY- neo2	SaII_MspCI	Expressão constitutiva com deleção do peptídeo sinal
Clone 12	LmSAP_ΔSPCS_NTPDase2_His Tag	pLEXY- neo2	SaII_KpnI	

- LmSAP: *L. mexicana* secreted acid phosphatase (presença do peptídeo sinal do vetor para expressão secretória das proteínas alvo)
- PST: Peptídeo sinal e região transmembrana original do gene alvo
- SPCS: sítio de clivagem do peptídeo sinal do vetor
- ΔSPCS: deleção do sítio de clivagem do peptídeo sinal do vetor
- NTPDase1: porção solúvel da Lic-E-NTPDase 1
- NTPDase2: porção solúvel da Lic-E-NTPDase 2
- HisTag: cauda de hexa-histidina na região carboxi-terminal da proteína alvo

#### 5.4 – Cultivo de *E. coli*

O cultivo das linhagens de *E. coli* DH5α e Stellar foi realizado em meio Luria-Bertani (LB) líquido, constituído de 1% de bacto-triptona (p/v); 0,5% de extrato de levedura (p/v); 1% de NaCl (p/v); pH ajustado em 7,0. A adição do antibiótico de seleção ampicilina (concentração final de 50 µg/mL) foi efetuada somente para a seleção de células transformadas com os plasmídeos, após a esterilização do meio e logo antes de serem realizados os inóculos. O meio LB sólido, utilizado para a seleção clonal em placas após as transformações, continha todos os reagentes citados acima mais adição de 1,5% (p/v) de ágar.

#### 5.5 – Preparo de *E. coli* DH5α competente e transformação de *E. coli* DH5α e Stellar

Para a obtenção *E. coli* DH5 $\alpha$  competente, foi realizado um pré-inóculo a partir de 10  $\mu$ L de células retiradas do estoque mantido – 80°C, que foi inoculado em 3 mL de LB sem a adição de antibióticos e mantido por 20 horas sob agitação a 180 rpm e 37°C. Posteriormente, este pré-inóculo foi vertido em 100 mL de LB e a cultura foi mantida nas mesmas condições até atingir D.O 600 entre 0,5 de 0,8 (leitura realizada feita em cubeta com caminho ótico de 1 cm). Atingida a D.O, a cultura foi coletada e centrifugada a 3000g por 5 minutos em temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado, as células sedimentadas foram gentilmente suspensas em 40 mL de solução de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M gelado (solução estéril e mantida à 4°C) e incubadas em banho de gelo por 40 minutos. Decorrido este tempo as células foram novamente centrifugadas e posteriormente suspensas em 1,2 mL de solução de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M contendo 15% de glicerol (v/v), sendo posteriormente distribuídas em alíquotas de 100  $\mu$ L e estocadas em ultrafreezer a - 80°C. As células Stellar fornecidas pelo kit In-Fusion HD Cloning já vêm competentes e prontas para transformação.

Para se proceder a transformação bacteriana, as alíquotas de 100  $\mu$ L de células competentes foram mantidas por 20 minutos em banho de gelo na presença dos DNAs plasmidiais transformantes (na concentração mínima de 50 ng) e depois submetidas a choque térmico em banho-maria a 42 °C por 50 segundos. Após esta etapa, os tubos voltaram para o banho de gelo por mais 2 minutos e as células foram então suspensas em 1 mL de meio LB ou SOC (recomendado para as linhagens Stellar) sem antibiótico, mantidas nessas condições por 1 hora sob agitação a 180 rpm a 37°C (no caso dos vetores exclusivamente bacterianos) ou 30°C (temperatura recomendada para manutenção dos plasmídeos LEXSY em *E. coli*). Terminada a recuperação das culturas, as mesmas foram centrifugadas a 3000g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em 100  $\mu$ L de LB. A suspensão de células foi distribuída em placas LB-ágar com os antibióticos apropriados e mantidas a 30°C por 16 horas.

## **5.6 – Extração dos DNAs plasmidiais pLEXSY-neo2 e pLEXSY\_IE-blecherry4**

Após crescerem nas placas, as colônias isoladas foram coletadas com auxílio de ponteiros estéreis e inoculadas em 4 mL de meio LB contendo ampicilina. Decorridas 16 horas de cultivo sob agitação a 180 rpm e temperatura de 30°C, as células foram coletadas por centrifugação e a extração do DNA plasmidial foi feita com o uso de kits comerciais

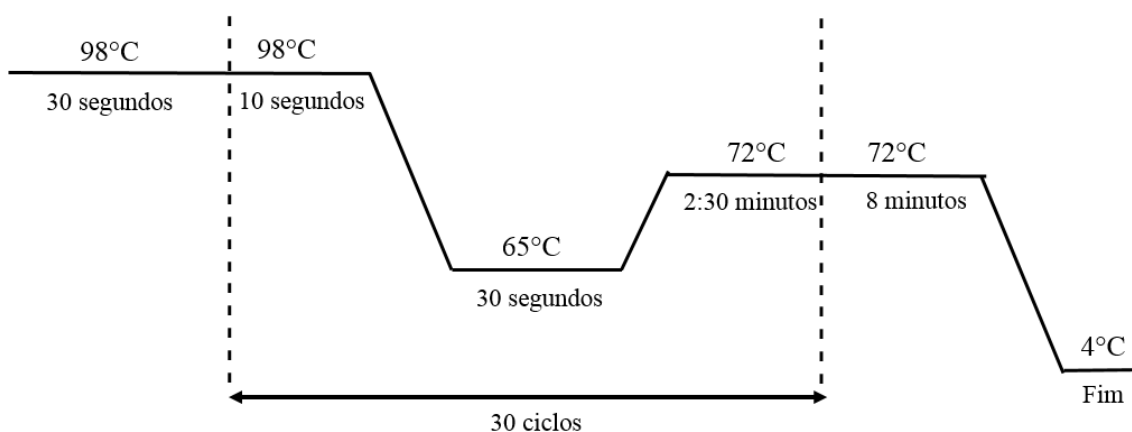
seguinto os protocolos recomendados pelo fabricante (GenElute™ Plasmid Miniprep Kit – Sigma). Após as extrações, alíquotas de 1 µL eram analisadas em gel de agarose 1% para conferir a qualidade e rendimento do processo, sendo o restante do material estocado a – 20°C até seu uso nos experimentos subsequentes.

### **5.7 – Amplificação dos genes das Lic-E-NTPDases 1 e 2 por PCR**

Como era impossível prever quais consequências a expressão das Lic-E-NTPDases teriam para o metabolismo de *L. tarentolae*, optamos por iniciar os experimentos construindo os clones 5 (Lic-E-NTPDase 1) e 6 (Lic-E-NTPDase 2), que produziriam essas proteínas via expressão induzível (o que é uma vantagem em casos onde a proteína alvo possa ser tóxica para o hospedeiro) e secretadas para o meio de cultura, prevenindo assim outros efeitos indesejáveis no interior da célula e facilitando sua purificação. Também foram realizados alguns experimentos para clonagem dos clones 11 e 12, mas não foram o objetivo principal deste trabalho. Os iniciadores utilizados neste trabalho estão especificados no quadro 2. As amplificações das sequências gênicas de interesse foram realizadas em um único programa no Termociclador, com suas características demonstradas na figura 6.

**QUADRO 2:** Conjunto de iniciadores utilizados nos experimentos de PCR.

Nome do Iniciador	Sequencia 5'-3'	Orientação	Clones LEXSY
LMSAP_NTPDase1_XbaI_FW Primer_ <b>primer 5</b>	<b>CTGGCGCCTCTCTAGACGCCAACCCGCTTCAGTCG</b>	Direto	5
LMSAP_NTPDase2_XbaI_FW Primer_ <b>primer 6</b>	<b>CTGGCGCCTCTCTAGACCCTCTGCTCTCCCATGT</b>	Direto	6
LMSAP_ΔSPCS_NT PDase1_SalI_FW Primer_ <b>primer 9</b>	<b>GGCCGTGTCGGTTCGACGCCAACCCGCTTCAGTCG</b>	Direto	11
LMSAP_ΔSPCS_NT PDase2_SalI_FW Primer_ <b>primer 10</b>	<b>GGCCGTGTCGGTTCGACCCTCTGCTCTCCCATGT</b>	Direto	12
NTPDase1_RV Primer (MspCI) <b>primer 2</b>	<b>ATGGTGGTGGGTACCCTTAAGGGTAA GAGAGAGGAGTGAG</b>	Reverso	5 e 11
NTPDase2_RV Primer (KpnI) <b>primer 4</b>	<b>TGGTGATGGTGGTGGGTACCTTCCATCTTGAGCAGGAAG</b>	Reverso	6 e 12

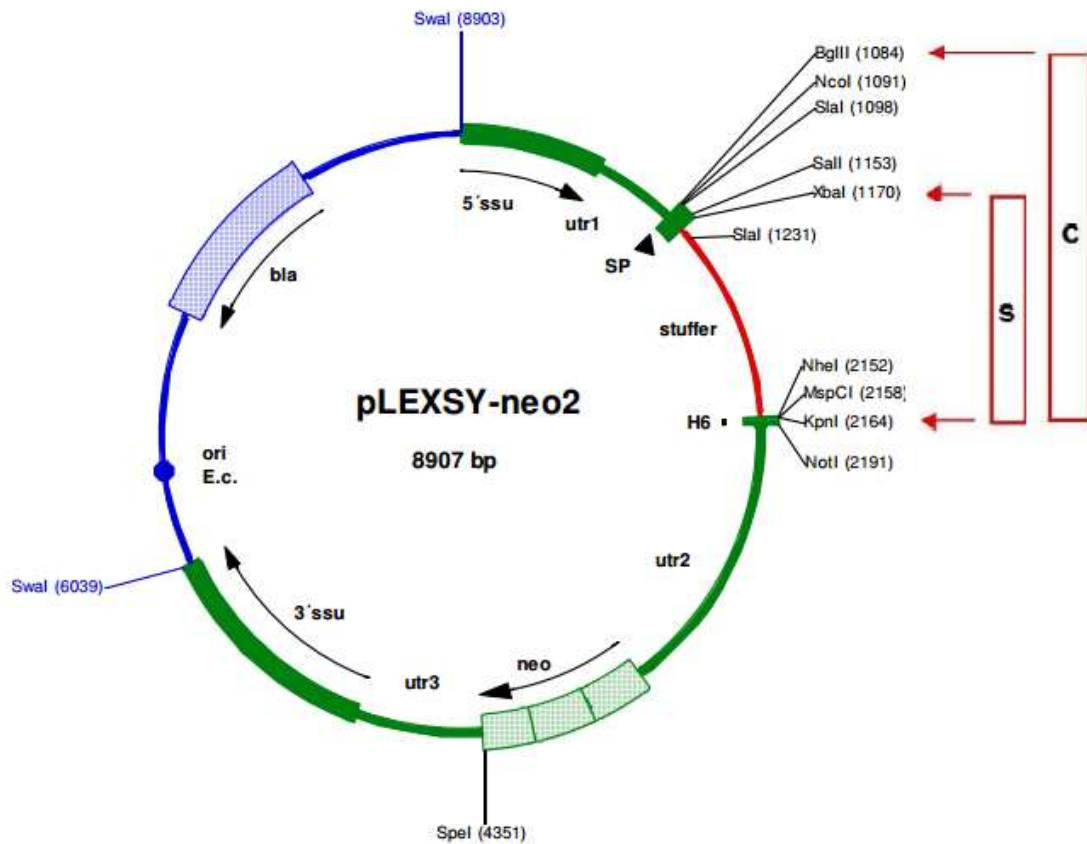


**FIGURA 6:** Ciclo de PCR utilizado para amplificar os genes das Lic-E-NTPDases, demonstrando as temperaturas e os tempos e utilizados para desnaturação, anelamento dos iniciadores e síntese das fitas molde, respectivamente.

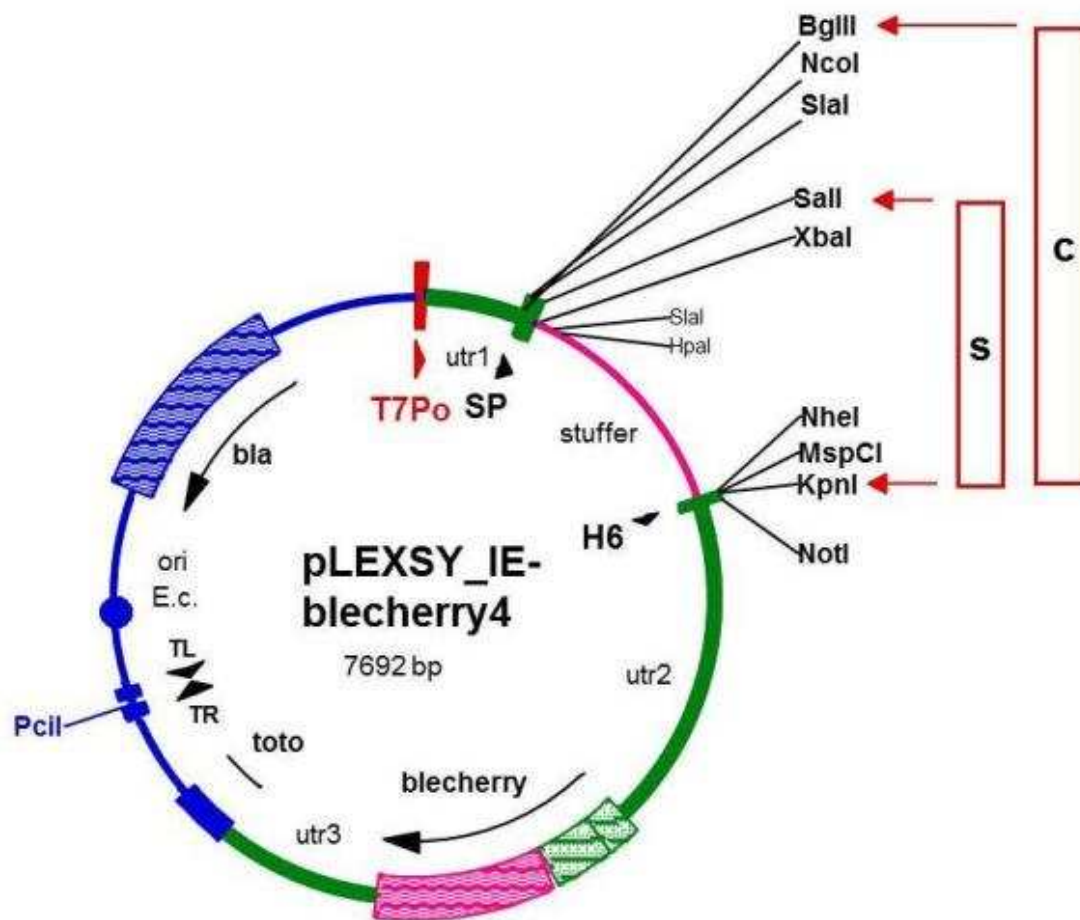
Nos experimentos onde era necessário obter o produto de PCR para posterior clonagem foi utilizado o mix de reação do CloneAmp HiFi PCR Premix, que acompanha o kit In-Fusion HD Cloning. Para confirmação das clonagens utilizou-se o Dream Taq Green PCR Master Mix 2X (Fermentas). O preparo dos mix de PCR foi realizado



em eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da eficiência do processo e posterior purificação das bandas dos amplicons.



**FIGURA 8:** Mapa do vetor de expressão constitutiva integrativa pLESXY-neo2 com algumas regiões importantes em destaque. O fragmento do stuffer é liberado durante as digestões para inserção do gene de interesse, facilitando assim as etapas de purificação do vetor. Antes da transfecção, o plasmídeo deve ser linearizado nos sítios de restrição para SwaI, que expõem as regiões de recombinação homóloga 5'ssu e 3'ssu, permitindo assim sua integração no genoma do hospedeiro (cepa P10). Os sítios utr são regiões não traduzidas de *L. tarentolae*, adicionadas com a finalidade de fornecer os sinais de splicing apropriados para as modificações pós-transcricionais dos mRNAs da proteína alvo e dos marcadores de seleção. Os locais definidos pela caixa c são os sítios de clonagem para expressão citosólica e pela caixa s para expressão secretória. Fonte: retirada do site [www.jenabioscience.com](http://www.jenabioscience.com) (Jena Bioscience).



**FIGURA 9:** Mapa do vetor de expressão induzível epissomal pLEXY IE-blecherry4. A digestão com a enzima PciI libera as regiões TL e TR, que são extremidades teloméricas necessárias para a replicação epissomal do plasmídeo em sua configuração linear (também pode ser mantido em sua forma circular na *L. tarentolae*). O T7Po é o promotor da T7 RNA polimerase ligado ao operador lac e toto é a região terminadora (em tandem) do promotor T7. O gene blecherry confere resistência à bleomicina e permite o monitoramento dos melhores clones de expressão via co-expressão da proteína mCherry. Fonte: retirada do site [www.jenabioscience.com](http://www.jenabioscience.com) (Jena Bioscience).

### 5.9 – Clonagem das Lic-E-NTPDases em sistema LEXSY

Os produtos de PCR das Lic-E-NTPDases e os DNAs plasmidiais pLEXY digeridos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%. Terminada a corrida, as bandas de interesse foram retiradas do gel com auxílio de uma lâmina e posteriormente purificadas da agarose com o uso do kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher), seguindo-se as recomendações desse fabricante. A dosagem das concentrações e a pureza dos DNAs purificados foram avaliadas em gel de agarose 1% e em equipamento NanoDrop 2000/c.

Para realizar as reações de clonagem foi utilizado o kit In-Fusion HD Cloning (Clontech Laboratories), que diferentemente da metodologia tradicional, não utiliza a T4 DNA ligase para efetuar as ligações entre os fragmentos de DNA e sim a enzima In-Fusion. Para isto, os primers a serem utilizados neste kit são desenhados de forma que suas extremidades 5'-3' contemham 15 pares de bases adicionais, idênticos às extremidades linearizadas dos plasmídeos a serem ligados. A enzima In-Fusion reconhece as extremidades homólogas e as sobrepõe, ligando assim os DNAs do vetor e inserto através de processo de recombinação. São necessários aproximadamente 100 ng de cada DNA (as concentrações variam de acordo com os tamanhos) em um volume total de 10 µL de reação, que é incubada por 15 minutos a 50 °C. Decorridos os 15 minutos a reação pode ser estocada a -20 °C e posteriormente utilizada para transformar células competentes *E. coli* Stellar (disponíveis no kit).

Após a transformação com os mix de clonagem, as células foram plaqueadas por 20 horas a 30 °C e as colônias isoladas que surgiram foram inoculadas em 4 mL de LB contendo ampicilina. Após 20 horas de cultivo os clones bacterianos foram analisados por PCR de colônias e por extração do DNA plasmidial, que foi digerido com as enzimas de restrição utilizadas na etapa de clonagem. Após as confirmações de clonagem via PCR de colônias e digestão, os plasmídeos correspondentes a cada clone foram enviados para sequenciamento. Os iniciadores utilizados nesta etapa foram o iniciador direto P1442 (5'-CCGACTGCAACAAGGTGTAG-3) e o iniciador reverso A264 (5'-CATCTATAGAGAAGTACACGTAAAAG-3'), disponíveis no kit LEXSY. O sequenciamento foi desenvolvido pelo método de Sanger e os procedimentos foram realizados na FIOCRUZ de Belo Horizonte - MG.

#### **5.10 – Cultivo de *L. tarentolae***

Todas as linhagens de *L. tarentolae* foram descongeladas e mantidas em meio BHI (Brain Heart Infusion), preparado de acordo com as recomendações do manual do kit LEXSY. Resumidamente, o meio BHI 1X foi preparado com 37 gramas de extrato de infusão de cérebro-coração para volume final de 1 litro, completado com água destilada (37g/L). No caso do preparo de BHI 2X, utilizado para a produção de placas BHI-ágar, as concentrações de extrato foram dobradas para o mesmo volume final de 1 litro (74g/L). Sua esterilização é efetuada em autoclave por exatos 15 minutos a 121°C e pressão de 1

atm (tempos adicionais causam degradação do meio). Após o preparo do meio é necessária a sua suplementação com hemina (10 mg/mL) e a adição de antibióticos, que eram realizadas sempre no momento da inoculação de *L. tarentolae*. Para preparo das placas BHI-ágar foi utilizado o meio BHI na concentração 2X, além da a adição de soro fetal bovino inativado, tampão HEPES 1M pH 7.4, hemina e antibióticos (as concentrações de todos os reagentes são especificadas no manual do sistema LEXSY).

As linhagens de expressão constitutiva integrativa e de expressão induzível epissomal são cultivadas e selecionadas com antibióticos distintos, que foram descritos na tabela 3 para melhor compreensão.

**TABELA 3:** Kits LEXSY disponíveis em nosso laboratório e que foram utilizados neste trabalho, organizados de acordo com as células, tipo de expressão e antibióticos utilizados.

	<b>KIT</b>	
	<b>LEXSYcon2<sup>®</sup></b>	<b>LEXInduce4<sup>®</sup></b>
<b>Cepa hospedeira</b>	P10	T7-TR
<b>Plasmídeo</b>	pLEXSY-neo2	pLEXSY_IE-blecherry4
<b>Tipo de expressão</b>	Constitutiva Integrativa	Induzível Epissomal
<b>Antibióticos de manutenção</b>	Penicilina-Estreptomicina	Penicilina-Estreptomicina, nourseotricina, higromicina
<b>Antibióticos de seleção</b>	Neomicina	Bleomicina
<b>Antibiótico de indução</b>	Nenhum	Tetraciclina

Para reativação das células de *L. tarentolae* estocadas a - 80°C, o conteúdo total de um criotubo (contendo  $6 \times 10^7$  células) era inoculado em 10 mL de BHI (suplementado com hemina e contendo antibióticos apropriados) e as células recuperadas por sucessivas passagens a cada 3 dias, em diluições de 1:10 ou 1:20, dependendo da densidade celular. Em todas as etapas do cultivo as células foram mantidas no escuro em temperatura de 26°C, em volumes de 10 mL com as garrafas posicionadas horizontalmente sem agitação (cultura estática), sendo checadas diariamente no microscópio para verificar sua vitalidade e presença de contaminantes no meio de cultivo. Alíquotas das células foram diluídas em 1:50 ou mais em solução de formalina 4% e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer.

O preparo de novos estoques para congelamento, tanto das cepas transformadas como das não transformadas, era realizado sempre que as células já estavam recuperadas, o que necessitava de pelo menos duas passagens após descongelamento. Em 10 mL destas culturas recuperadas (em densidade de  $8 \times 10^7$  células/mL) adicionou-se 3 mL de glicerol estéril, misturado gentilmente por inversão e as células foram distribuídas em alíquotas de 1,5 mL por criotubo, que foram mantidos por 24 horas em temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  e depois transferidos para ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **5.11 – Transfecção e seleção clonal de *L. tarentolae***

Neste trabalho foram transfectadas somente as linhagens T7-TR, que após serem recuperadas e atingirem densidade de  $6 \times 10^7$  células/mL, foram sedimentadas por centrifugação a 2000g por 3 minutos e suspensas no meio remanescente na concentração de  $10^8$  células/mL. As células foram transferidas para cubetas de eletroporação de 2 mm (Bio-Rad) e mantidas por 10 minutos em gelo juntamente com os DNAs plasmidiais transformantes (na concentração de 1 a 10  $\mu\text{g}$ ) em um volume total de 400  $\mu\text{L}$ . A eletroporação foi efetuada no aparelho Gene Pulser (Bio-Rad) seguindo seguinte programa: voltagem de 450V, capacitância de 450  $\mu\text{F}$  e pulsos de 5 a 6 milissegundos. Imediatamente após o pulso elétrico as cubetas voltaram para o gelo por mais 10 minutos e decorrido este tempo as células foram transferidas para 5 mL de BHI suplementado com hemina, penicilina-estreptomicina, nourseotricina e higromicina; mantidas no escuro a  $26^{\circ}\text{C}$  em garrafas deitadas. Após 24 horas nessas condições a vitalidade das células de *L. tarentolae* era checada em microscópio e posteriormente era seguida sua seleção clonal.

As placas de cultivo BHI-ágar foram preparadas no dia do plaqueamento das células, suplementadas com hemina e os antibióticos descritos anteriormente, além da adição do antibiótico de seleção dos transformantes, a bleomicina. Em algumas dessas placas foram adicionadas membranas de nitrocelulose estéreis em cima do ágar logo após o preparo (uma membrana por placa). Um dia após a transfecção, as células foram coletadas por centrifugação a 2000g por 3 minutos, suspensas em 200  $\mu\text{L}$  do meio residual e então distribuídas cuidadosamente sobre as placas (ou sobre a membrana de nitrocelulose). As placas foram incubadas no escuro a  $26^{\circ}\text{C}$  e até ser possível visualizar pequenas colônias passaram-se oito dias ou mais. Em média, mais doze dias foram necessários para as colônias atingirem 1 a 2 mm de diâmetro, totalizando vinte dias após

o plaqueamento. Essas colônias foram expandidas em meio BHI líquido (com todas as suplementações já citadas) gradativamente, em média de dois em dois dias: primeiramente em 200 µL, depois em 500 µL, 1 mL, 5mL e finalmente 10 mL. Após a expansão, foram cultivadas duas garrafas para cada clone, sendo uma destinada ao preparo de estoques e outra para os ensaios de indução.

No caso das placas onde as células de *L. tarentolae* cresceram sobre a membrana de nitrocelulose, esta foi retirada da placa antiga com o auxílio de uma pinça estéril e passada para uma nova placa, contendo todos os componentes citados anteriormente e adicionalmente a tetraciclina, que é o indutor do sistema T7-TR. Decorridos dois dias, as colônias com maior coloração rosa (indicando os melhores clones de expressão) foram selecionadas e então expandidas gradativamente, da mesma forma citada anteriormente.

Todos os clones LEXSY obtidos durante o projeto foram também analisados por microscopia de fluorescência em microscópio EVOS FL Imaging System (Thermo Fisher) para verificação da co-expressão da proteína mCherry.

## **5.12 – Análise da expressão dos clones selecionados por SDS-PAGE 10%**

Os testes iniciais de indução foram realizados em garrafas de culturas estáticas em volumes de 10 mL, com adição do indutor tetraciclina no início do inóculo. Três dias após a adição do indutor as células foram coletadas por centrifugação a 5000g por 5 minutos e as frações de sedimentos celulares e de meio de cultivo separadas em tubos distintos. Seguindo as recomendações do manual LEXSY, o sedimento de células foi suspenso diretamente em tampão de amostra de proteínas; este material foi fervido e alíquotas de 20 a 30 µL foram aplicadas em SDS-PAGE. Esta abordagem foi utilizada somente nos primeiros ensaios, visto que o sedimento de células com tampão de amostra ficava muito viscoso e de difícil aplicação. Para contornarmos este problema, os sedimentos celulares de novas induções foram suspensos em 1 mL de tampão Tris-NaCl (50mM e 100 mM respectivamente, pH 7.4) contendo inibidores de proteases e as células foram submetidas à sonicação em 20 ciclos com 10 segundos de sonicação e 10 segundos de intervalo, sendo mantidas em gelo durante o processo. Alíquotas de 20 µL desse extrato de células rompidas eram adicionadas com 5 µL de tampão de amostra e o material então aplicado em SDS-PAGE (o restante do extrato era mantido a -20 °C para usos posteriores).

O meio de cultivo foi concentrado de duas formas durante o decorrer dos experimentos. A primeira metodologia empregada foi a precipitação das proteínas do meio de cultivo com o uso do ácido tricloroacético (TCA), seguindo o protocolo sugerido pelo manual LEXSY. A segunda foi a concentração das proteínas através de colunas Amicon de 15 kDa (Merck Millipore), onde o meio de cultivo era concentrado por centrifugação em volumes de aproximadamente 200  $\mu$ L. Da mesma forma, 20  $\mu$ L dessas amostras concentradas eram adicionadas a 5  $\mu$ L de tampão de amostra e o material aplicado em SDS-PAGE. Os géis, tampões e a eletroforese foram realizados de acordo com as metodologias propostas por Sambrook e colaboradores [109].

### **5.13 – Análise da expressão por Western Blotting dos clones selecionados**

Em alguns casos, após a eletroforese as proteínas separadas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE) pela técnica de Western Blotting [109]. As transferências foram efetuadas em amperagem constante de 250 mA por 3 horas e decorrido este tempo as membranas foram bloqueadas com solução de BSA (albumina de soro bovino) 0,3% por uma hora no mínimo. Após o bloqueio as membranas foram lavadas com solução de PBS-T 1X por três vezes. Foram utilizadas duas estratégias para revelação das membranas, uma por detecção colorimétrica com diaminobenzidina (DAB) e a outra por detecção de emissão de fluorescência do isotiocianato de fluoresceína (FITC). Nas revelações com DAB as membranas foram incubadas por três horas com anticorpo primário monoclonal de camundongo, contra cauda de histidina, diluído em 1:3000 (GE Healthcare; código:27-4710-01). As membranas foram novamente lavadas por três vezes com solução de PBS-T 1X e posteriormente incubadas por duas horas com anticorpo secundário contra camundongo conjugado à peroxidase (Sigma; código: A 4416), em diluição de 1:10000. Após mais três lavagens a atividade peroxidásica foi detectada com o uso de solução de revelação contendo 20 mL de Tris 50 mM pH 7,5, 10 mg/mL de DAB e 20  $\mu$ L peróxido de hidrogênio 30%. No caso das revelações com FITC, foi utilizado o anticorpo primário policlonal contra histidina produzido em coelho (Sigma; código: SAB1306084-40TST), diluído em 1:1000, e anticorpo secundário contra coelho conjugado a FITC em diluição de 1:8000. A fluorescência do FITC foi detectada no foto documentador de fluorescência FLA 5100 (Fujifilm) a 475 nm. Todos anticorpos foram diluídos em tampão PBS-T 1X.

#### **5.14 – Análise da expressão dos clones selecionados por Dot Blotting**

Como os procedimentos da técnica de Western Blotting são trabalhosos e demorados, para facilitar as triagens dos clones de expressão utilizamos a técnica de Dot Blotting. Nestes ensaios não há necessidade de aplicação das amostras em SDS-PAGE e posterior transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose, já que as amostras são aplicadas diretamente sobre a membrana com o auxílio do aparato Bio-Dot (Bio-Rad), o que agiliza o processo de triagem. Após a sucção com auxílio de bomba de vácuo e adsorção das amostras nas membranas, todo o processo de lavagem, incubação com anticorpos primário (anti-His) e secundário (conjugado à peroxidase) e revelação foram procedidos utilizando a mesma metodologia correspondente à técnica de Western Blotting.

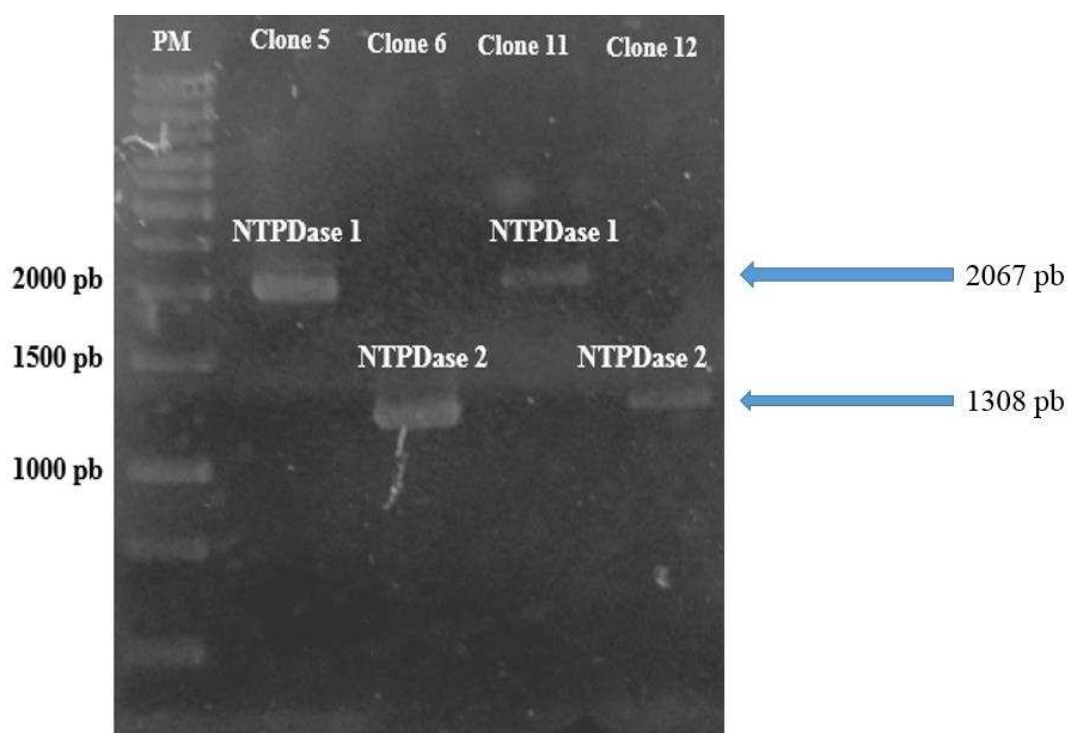
#### **5.15 – Ensaio de purificação das frações induzidas**

Para os ensaios de purificação das proteínas expressas foram utilizados volumes de 50 a 100 mL de indução total. As frações de células e dos sobrenadantes foram separadas por centrifugação e preparadas de acordo com a metodologia já descrita. Nas amostras processadas e para equilibrar a coluna de níquel (1 mL HisTrap FF crude) utilizamos o tampão de equilíbrio contendo Tris 50 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 10 mM, pH 7,5 (tampão A). Os extratos não ligados foram coletados para análise. Posteriormente, as proteínas ligadas à coluna foram eluídas com tampão B (Tris 50 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 10 mM, Imidazol 300 mM, pH 7,5). Em alguns poucos ensaios utilizamos tampão B contendo 8 M de ureia. Todos os procedimentos foram realizados de forma automatizada em equipamento de ÄKTAFPLC (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante.

## 6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 – Amplificação por PCR dos genes das Lic-E-NTPDases 1 e 2

Os genes de interesse foram amplificados a partir de clones bacterianos contendo as sequências para a Lic-E-NTPDase 1 (gi146079011) e para a Lic-E-NTPDase 2 (gi134068433), da cepa referência JPCM5. Os primers foram desenhados para amplificar somente as sequências maduras correspondentes a cada Lic-E-NTPDase, fornecidas no anexo 1 deste trabalho. Os amplicons obtidos através de PCR de colônias resultaram em bandas únicas e definidas, de 2067 pb para a Lic-E-NTPDase 1 e 1308 pb para a Lic-E-NTPDase 2, demonstrando alta especificidade dos iniciadores. Após a eletroforese e purificação desses DNAs, alíquotas de 2 µL foram aplicadas em gel de agarose 1% para determinar a qualidade do processo final, que apresentou um bom rendimento. Este material, demonstrado na figura 10, foi utilizado nas reações de clonagem subsequentes.

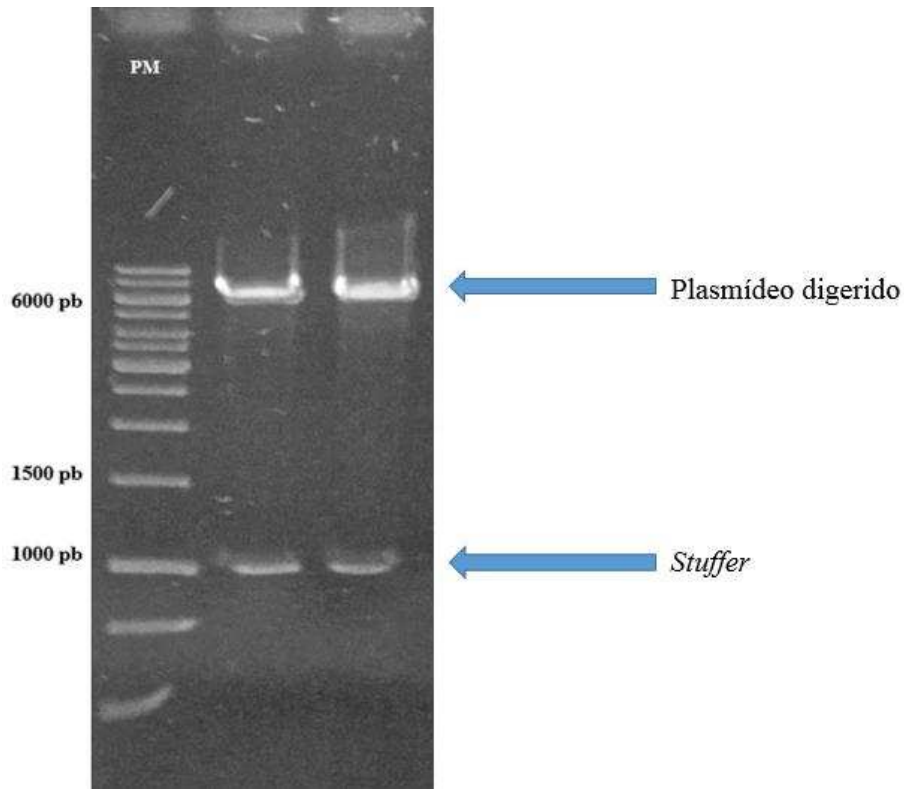


**FIGURA 10:** Gel de Agarose 1% contendo os produtos de amplificação das regiões maduras das NTPDases 1 e 2 de *Leishmania infantum*. As bandas resultantes estão no tamanho esperado para cada clone, em 2067 pb para a Lic-E-NTPDase 1 (Clones 5 e 11) e em 1308 pb para a Lic-E-NTPDase 2 (Clones 6 e 12). PM: padrão de massa molecular 1 Kb DNA ladder (Invitrogen).

## **6.2 – Digestão dos plasmídeos pLEXSY-neo2 e pLEXSY\_IE-blecherry4 com enzimas de restrição**

Após o sucesso na amplificação e purificação dos amplicons de interesse, o próximo passo foi digerir os plasmídeos LEXSY com as enzimas de restrição correspondentes a cada estratégia de clonagem desenhada, detalhadas na Tabela 1. Como esses vetores possuem entre os sítios de clonagem uma sequência stuffer (de 1000 pb), que é liberada somente se a dupla digestão ocorre com êxito, a confirmação deste processo é bastante fácil.

Em nossos resultados os plasmídeos duplamente digeridos demonstraram em gel de agarose dois fragmentos, como esperado. Os fragmentos maiores, de aproximadamente 6700 pb para o pLEXSY\_IE-blecherry4 e de aproximadamente 7900 pb para o pLEXSY-neo2 correspondem aos vetores digeridos e sem a sequência stuffer. Os fragmentos menores, de 1000 pb, correspondem à sequência stuffer liberada após a dupla digestão. A título de demonstração é possível observar na figura 11 que a dupla digestão do pLEXSY\_IE-blecherry4 XbaI e MspCI foi realizada com sucesso, sendo os vetores linearizados (6700 pb) extraídos dos géis e purificados para posterior uso nas reações de clonagem. Os fragmentos correspondentes à sequência stuffer (1000 pb) foram descartados. Todas as outras duplas digestões realizadas nesta etapa também foram realizadas com sucesso (não mostrado).

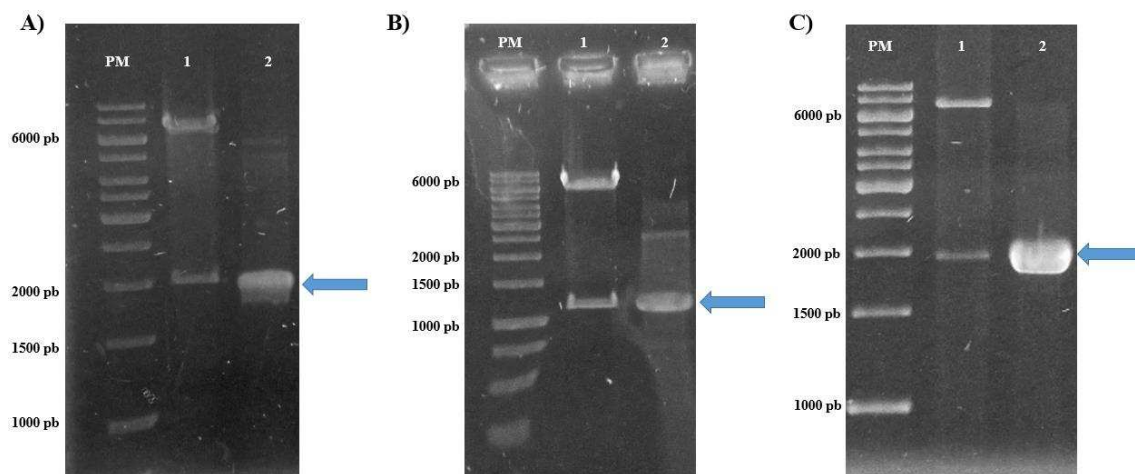


**FIGURA 11: Gel de Agarose 1% contendo produtos de digestão do pLEXSY\_IE-blecherry4.** Digestão do pLEXSY\_IE-blecherry4 por XbaI e MspCI (para construção do Clone 5). Os fragmentos inferiores de aproximadamente 1000 pb correspondem à região stuffer do plasmídeo, liberada após a dupla digestão; os fragmentos superiores de aproximadamente 6700 pb foram purificados do gel para serem utilizados nas reações de clonagem. PM: padrão de pares de bases 1 Kb DNA ladder (Invitrogen).

### 6.3 – Clonagem das Lic-E-NTPDases 1e 2 nos plasmídeos pLEXSY

Com os produtos de PCR e digestão purificados, foram realizadas as reações de clonagem através do kit In-Fusion HD Cloning (Clontech Laboratories). Os produtos de reação de clonagem foram utilizados para transformar células *E. coli* Stellar. É importante ressaltar que somente o clone 11 resultou em colônia positiva após a primeira reação de clonagem. Para a construção dos outros clones foram necessárias algumas repetições, e no decorrer dos experimentos, foram encontrados falsos-positivos, clones com inserto mas que não liberavam fragmento por digestão e até mesmo clones resistentes à ampicilina mas negativos para as PCRs de colônias (dados não mostrados). Durante os experimentos não foi possível construir o clone 12, que como não era o foco inicial deste projeto, foi deixado para futuros trabalhos. A construção dos clones 5, 6 e 11 foi realizada com sucesso; os clones bacterianos foram estocados a  $-80^{\circ}\text{C}$  e os DNAs plasmidiais correspondentes a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A figura 12 mostra que em todos os resultados os fragmentos

liberados por digestão e o DNA amplificado possuem respectivamente a mesma altura (destacados pela seta azul), indicando que os amplicons foram corretamente integrados nos plasmídeos alvo.



**FIGURA 12: Gel de Agarose 1% para confirmação das clonagens dos clones bacterianos 5, 6 e 11. A) Clone 5:** Canaleta 1 - Digestão do DNA plasmidial por XbaI e MspCI; Canaleta 2 - PCR de colônia com os primers de clonagem específicos para o clone 5. **B) Clone 6:** Canaleta 1 - Digestão do DNA plasmidial por XbaI e KpnI; Canaleta 2 - PCR de colônia com os primers de clonagem específicos para o clone 6. **C) Clone 11:** Canaleta 1 - Digestão do DNA plasmidial por Sall e MspCI; Canaleta 2: PCR de colônia com os primers de clonagem específicos para clone 11. PM: padrão de pares de bases 1 Kb DNA ladder (Invitrogen). As bandas específicas dos amplicons e as bandas referentes à digestão estão destacadas pela seta azul.

#### 6.4 – Transfecção de *L. tarentolae* T7-TR e seleção clonal

Os clones bacterianos correspondentes a cada gene ou contendo o pLEXSY\_IE-blecherry4 (pLbc4) vazio foram cultivados para amplificação e posterior extração dos DNAs plasmidiais. Aproximadamente 5  $\mu$ g dos plasmídeos circulares foram utilizados para transfectar *L. tarentolae* T7-TR, seguindo as recomendações do protocolo fornecido pela Jena Bioscience. Como a eletroporação com DNAs circulares só permite a seleção clonal, as células eram plaqueadas em meio sólido após este processo. Em nossos experimentos, as colônias surgiram em aproximadamente 8 dias após plaqueamento. Entretanto, até atingir 2 mm de diâmetro, que é o tamanho recomendado para inocular essas colônias em meio líquido, foram necessários 20 dias.

O sistema LEXSY T7-TR permite a pré-seleção dos melhores clones produtores via co-expressão da proteína mCherry, portanto esta abordagem foi adotada nas etapas iniciais deste projeto. Ao longo de todo trabalho, várias transfecções foram realizadas, e curiosamente a obtenção de clones LEXSY com a construção 6 mostrou-se mais difícil que as outras (clone 5 ou pLbc4 vazio). Após atingir o tamanho de aproximadamente 2 mm de diâmetro, as colônias foram expandidas gradativamente em crescentes volumes de meio BHI seletivo. Nas situações onde tentamos expandir colônias menores as células não sobreviveram. Nas primeiras transfecções conseguimos selecionar duas colônias para o clone 6 (Lic-E-NTPDase 2), que foram as únicas colônias que surgiram na placa. Já no caso do clone 5 (Lic-E-NTPDase 1) e do clone transfectado com o plasmídeo vazio (pLbc4) surgiram aproximadamente 30 colônias em cada placa, mas somente as com coloração rosa foram expandidas, sendo três para o clone 5 e quatro para o clone pLbc4. Na figura 12 é mostrada a placa com os clones obtidos 20 dias após a transfecção com a construção 5, demonstrando diferentes intensidades de coloração rosa.

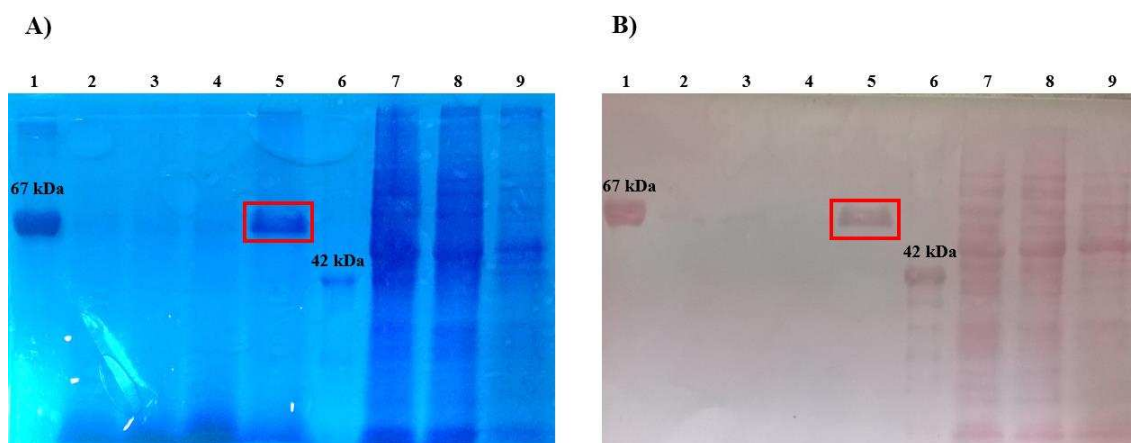


**FIGURA 12: Triagem dos melhores clones produtores através da co-expressão da proteína mCherry em meio BHI-ágar.** As placas foram preparadas com a adição de uma membrana de nitrocelulose em sua parte superior para permitir a transferência das colônias para outras placas. Após atingirem diâmetro de aproximadamente 2 mm (20 dias), a membrana de nitrocelulose contendo as colônias foi transferida para uma nova placa contendo o indutor da T7 polimerase (tetraciclina). As colônias com maior coloração rosa, desenvolvida devido a co-expressão da proteína mCherry, foram selecionadas e expandidas em cultura de pequena escala para posterior avaliação. As colônias incolores foram descartadas. Na imagem acima são mostradas várias colônias do clone 5, apresentando diferentes intensidades de coloração rosa.

### **6.5 – Primeiros ensaios de indução da expressão das Lic-E-NTPDases em LEXSY**

A fim de detectar a expressão das Lic-E-NTPDases nos clones LEXSY, foram realizadas induções em dois dos clones obtidos, sendo um para cada Lic-E-NTPDase (clones 5.1 e 6.1). A princípio, as construções foram criadas para secretar as proteínas alvo para o meio de cultivo, mas como nunca havíamos realizado testes de expressão anteriormente no sistema LEXSY resolvemos analisar todas as frações (células e meio de cultivo) em SDS-PAGE. As induções foram realizadas em células cultivadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup>, em volumes de 10 mL por 3 dias na presença do indutor. A única amostra que

demonstra uma proteína expressa de forma diferencial é a do sobrenadante concentrado do clone 6.1, mas a banda exibida é bem maior que o esperado, quase 70 kDa onde se esperava aproximadamente 42 kDa (mostrada na figura 13, destacado pelo quadrado vermelho). Além da discrepância no tamanho, esta banda não revelou no ensaio de Western Blotting usando anticorpo primário anti-His e secundário conjugado à peroxidase (não mostrado).



**FIGURA 13: Análise das induções dos clones LEXSY 5.1 e 6.1 por SDS-PAGE 10% (A) e membrana de nitrocelulose réplica do SDS-PAGE corada por Ponceau (B).** Na ordem: **1** – BSA (67 kDa); **2** – Meio de cultivo do clone 5.1; **3** - Meio de cultivo do clone; **4** – Proteínas do meio de cultivo do clone 5.1 precipitadas com TCA e concentradas 10 vezes; **5** – Proteínas do meio de cultivo do clone 6.1 precipitadas com TCA e concentradas 10 vezes; **6** – Lic-E-NTPDase 2 expressa em bactéria e purificada; **7** – Extrato de células do clone 5.1; **8** – Extrato de células do clone 6.1; **9** – Extrato de células do clone controle pLbc4. Após 5 minutos de desnaturação a 95°C, foram aplicados 30 µL de amostra em cada canaleta; exceto a proteína BSA, que foi aplicada na concentração de 0,5 µg. As proteínas transferidas para membrana de nitrocelulose por Western Blotting foram coradas por Ponceau para verificar a qualidade da transferência, que ocorreu perfeitamente. O quadrado vermelho destaca a banda diferencialmente expressa no clone 6.1. A revelação da membrana com DAB não detectou presença de expressão nos clones avaliados.

Como os primeiros ensaios de expressão não foram produtivos, outros clones foram testados. Além de testar outros clones, o 5.2 e o 5.3, diferentes tempos de indução foram avaliados. As coletas dos sedimentos celulares e dos sobrenadantes foram realizadas da seguinte forma: duas horas após a adição do indutor, quatro horas após a adição do indutor, 8 horas após a adição do indutor, 24 horas após a adição do indutor, 48 horas após a adição do indutor. Em nenhum dos tempos foi possível detectar a expressão da proteína alvo no ensaio de Western Blotting, onde somente o controle

positivo revelou (Lic-E-NTPDase 2 expressa em bactéria, de 42 kDa), como mostrado na figura 14.



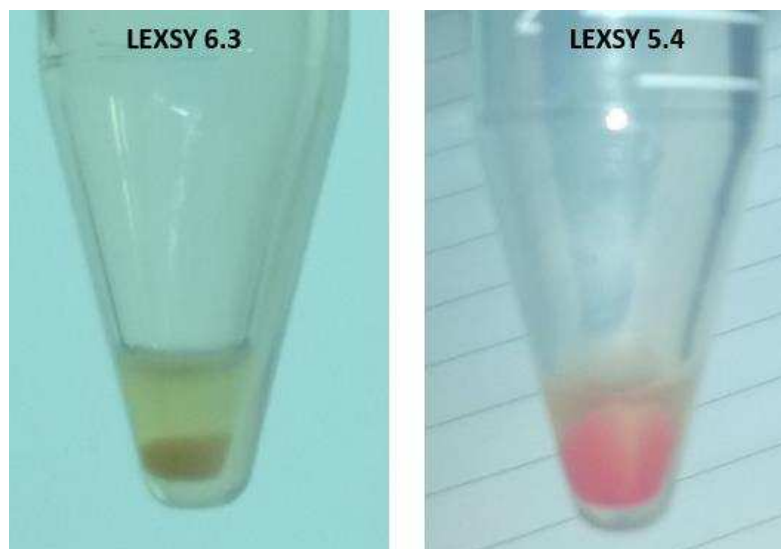
**FIGURA 14: Revelação da membrana de nitrocelulose contendo os extratos das induções dos clones 5.3 e 5.2.** Legendas na ordem: **1** – Lic-E-NTPDase 2 purificada de bactéria (controle positivo, 42 kDa); **2** – Pellet de 2 hrs de indução clone 5.3; **3** – Pellet de 4 hrs de indução clone 5.3; **4** – Pellet de 8 hrs de indução clone 5.3; **5** – Pellet de 24 hrs de indução clone 5.3; **6** – Pellet de 48 hrs de indução clone 5.3; **7** – Sobrenadante de 24 hrs de indução clone 5.3; **8** – Sobrenadante de 48 hrs de indução clone 5.3; **9** – Pellet de 24 hrs de indução clone 5.2; **10** – Sobrenadante de 24 hrs de indução clone 5.2. A membrana foi incubada com anticorpo primário anti-histidina, anticorpo secundário conjugado à peroxidase e revelada por reação com DAB e peróxido de hidrogênio.

Com a metodologia utilizada, não foi possível detectar a expressão das proteínas alvo nos extratos celulares ou no meio de cultivo dos clones LEXSY 5.1, 5.2, 5.3, 6.1 e 6.2. Portanto, ao longo deste trabalho, além de algumas alterações na metodologia de indução, foram necessárias outras transfecções e análises de novos clones. Ao todo foram obtidos 4 clones LEXSY abrigando a construção 6 (Lic-E-NTPDase 2) e oito clones abrigando a construção 5 (Lic-E-NTPDase 1).

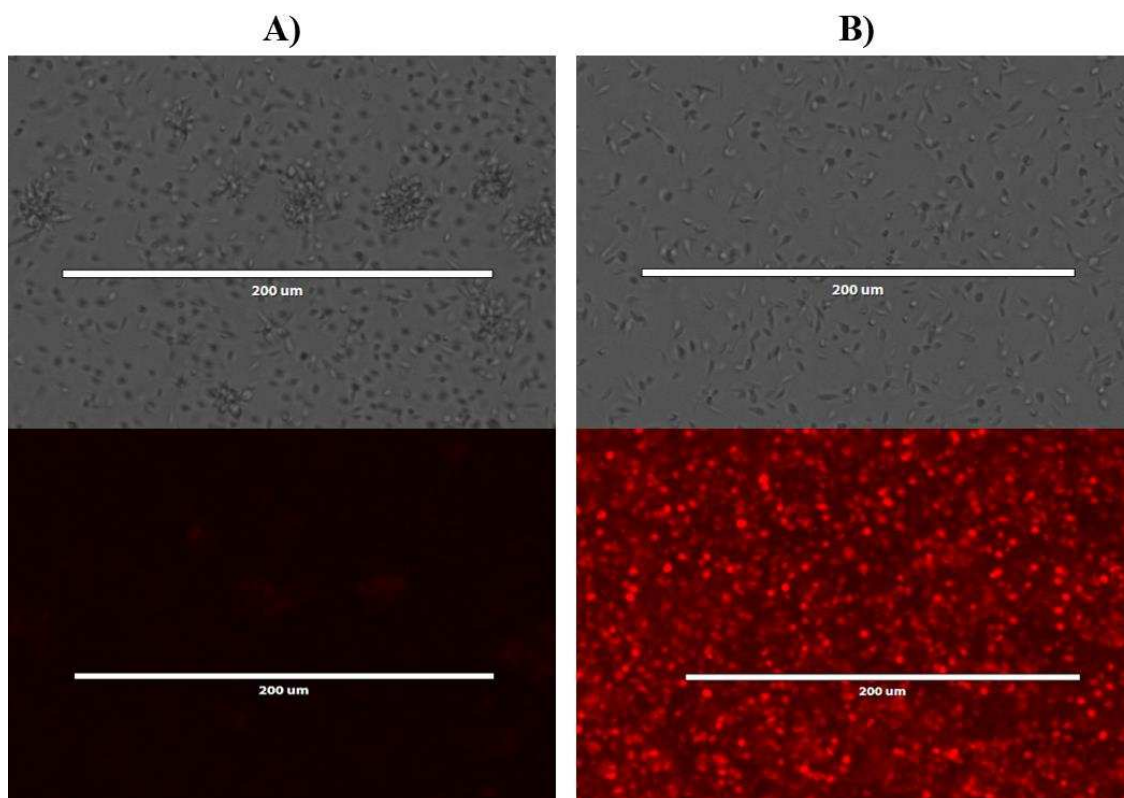
## **6.6 – Seleção de novos clones LEXSY e detecção da expressão da proteína mCherry**

Devido aos experimentos com os clones iniciais não terem sido satisfatórios, realizamos novas transfecções de *L. tarentolae* T7-TR e conseguimos obter mais alguns

clones, que inicialmente se mostraram bastante promissores. De acordo com o manual do sistema LEXSY T7-TR o desenvolvimento da cor rosa (e da fluorescência) é baseado na co-expressão do gene blecherry, que é co-transcrito com o gene alvo pela T7 RNA polimerase e indica que o sistema induzível está intacto. A intensidade da coloração rosa seria uma correlação direta dos níveis de expressão do gene alvo [110]. Portanto, além da observação visual da expressão da mCherry através do surgimento da cor rosa, a presença da proteína repórter foi detectada também em microscópio de fluorescência EVOS FL Imaging System (figura 16) e em leitora de microplacas. Em nossos ensaios todos os clones demonstraram níveis de fluorescência distintos entre si. Essas diferenças também foram observadas nos pellets de células, que apresentaram diferentes intensidades na coloração rosa (figura 15).



**FIGURA 15: Sedimentos celulares dos clones LEXSY 6.3 e LEXSY 5.4 após 3 dias de indução.** O clone 6.3 demonstra pouca coloração rosa; já no clone 5.4 observa-se forte coloração, indicando altos níveis expressão da proteína mCherry.

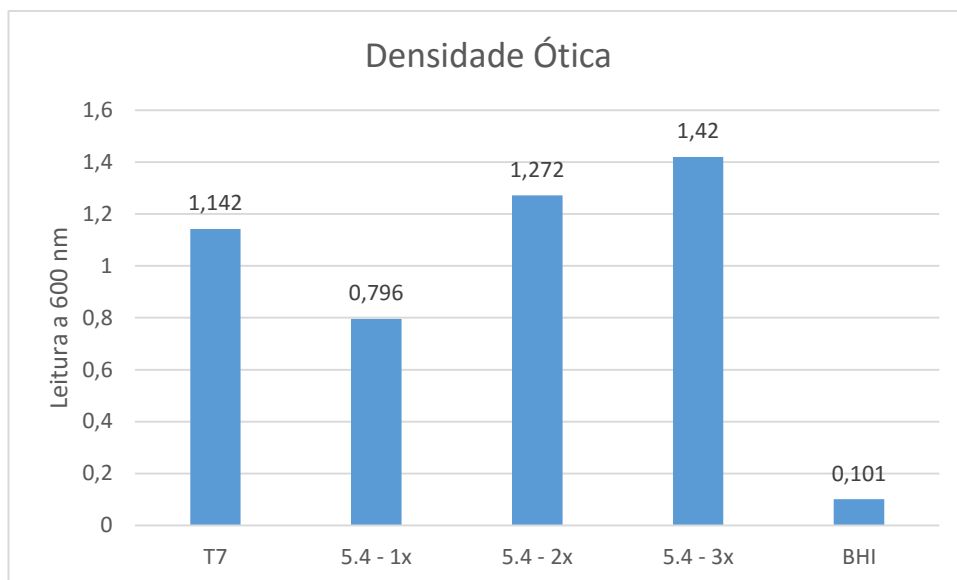


**FIGURA 16: Microscopia dos clones LEXSY 6.3 (A) e LEXSY 5.4 (B) após 3 dias de indução.** As imagens detalham as células aumentadas vinte vezes, sem fluorescência (imagem cinza) e com intensidade de 30% de fluorescência (vermelho). Imagens obtidas no EVOS FL Imaging System.

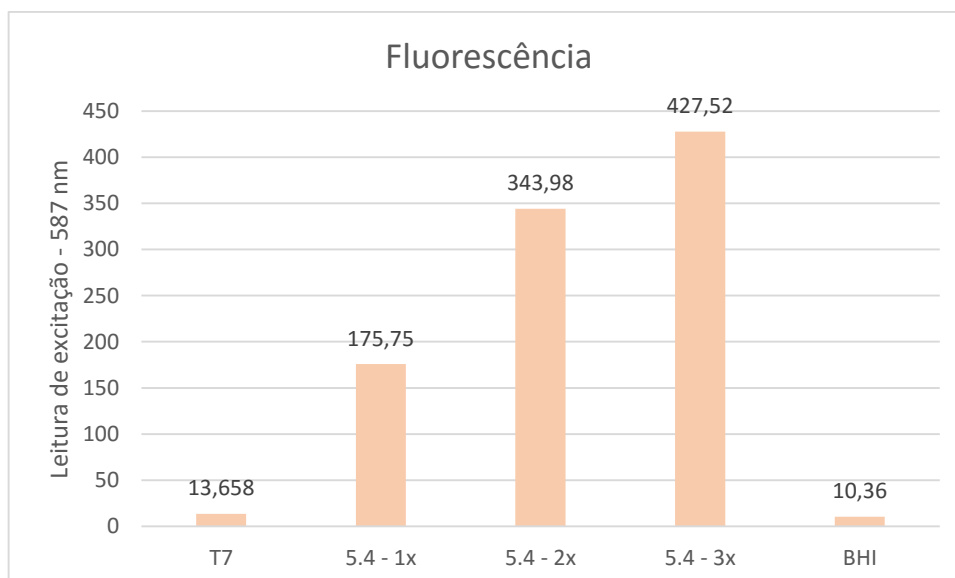
### **6.7 – Análise da densidade celular e intensidade de fluorescência em diferentes concentrações de inóculo inicial no clone 5.4**

Estes testes foram realizados para verificar o crescimento do clone 5.4 em diferentes concentrações de inóculos iniciais e como isto influenciaria no crescimento das células e na expressão da proteína mCherry. Inicialmente, observamos que a partir de um inóculo inicial de  $6 \times 10^7$  células/mL, diluídas em 1:10 (concentração total na garrafa de  $6 \times 10^6$  células), após 3 dias voltavam a atingir esta concentração final e estagnavam. Desta vez, foram testados três inóculos para o clone 5.4, com adição do indutor no momento da diluição:  $6 \times 10^7$  células (1X);  $1,2 \times 10^8$  células (2X);  $1,8 \times 10^7$  células (3X). A linhagem T7-TR sem plasmídeo foi utilizada como referência (inóculo de  $6 \times 10^7$  células/mL). Nas concentrações iniciais de  $6 \times 10^7$  células/mL, a célula controle T7-TR cresceu mais que o clone 5.4 nessas mesmas condições, o que era esperado, já que a super-expressão de proteínas desvia a maquinaria da célula e conseqüentemente leva a crescimentos mais lentos. Entretanto, a adição de maiores quantidades iniciais de inóculo (o dobro e o triplo)

favoreceu o crescimento das células transformadas mesmo na presença do indutor (figura 17), inclusive levando a maiores níveis de fluorescência (figura 18).



**FIGURA 17:** Gráfico da leitura de Densidade Ótica (D.O.) a 600 nm do cultivo dos clones LEXSY 5.4 em diferentes concentrações iniciais de células. Legendas: **T7:** clone T7-TR; **5.4 - 1x:** clone 5.4 em inóculo inicial de  $6 \times 10^7$  células; **5.4 - 2x:** clone 5.4 em inóculo inicial de  $1,2 \times 10^8$  células; **5.4 - 3x:** clone 5.4 em inóculo inicial de  $1,8 \times 10^8$  células. As leituras foram realizadas após 3 dias de indução. D.O = 1 corresponde a  $6 \times 10^7$  células/mL.

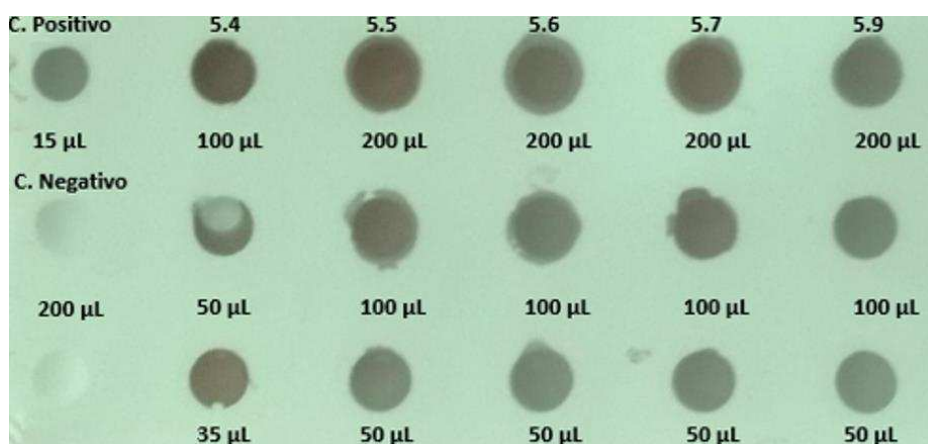


**FIGURA 18:** Gráfico da leitura de fluorescência dos clones LEXSY 5.4 em diferentes concentrações iniciais de células. Legendas: **T7:** clone T7-TR; **5.4 - 1x:** clone 5.4 em inóculo inicial de  $6 \times 10^7$  células; **5.4 - 2x:** clone 5.4 em inóculo inicial de  $1,2 \times 10^8$  células; **5.4 - 3x:** clone 5.4 em inóculo inicial de  $1,8 \times 10^8$  células. As leituras foram realizadas após 3 dias de indução, em uma excitação de 587 nm.

## 6.8 – Triagem dos novos clones por Dot Blotting

Os primeiros testes de indução dos novos clones foram realizados em placas de cultivo de 6 poços, no volume de 2 mL de cultura por poço, o que interessantemente resultou em clones com maior densidade celular proporcional. Nas garrafas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, em volumes de 10 mL, a densidade celular dos clones variou entre 6x10<sup>7</sup> células/mL a 1x10<sup>8</sup> células/mL; nas placas de 6 poços com 2 mL em cada, a densidade de células em cada poço atingiu até 2,45x10<sup>8</sup> células/mL. Portanto, esta condição foi explorada também em outros experimentos realizados.

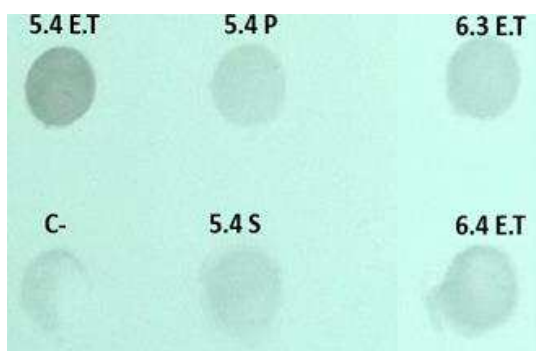
Para facilitar as triagens os extratos totais de cada clone, contendo o pellet de células lisadas e meio de cultivo em um extrato único, foram aplicados diretamente em membrana de nitrocelulose com auxílio do equipamento de Dot Blotting. Após incubação com os anticorpos (anti-His e conjugado à peroxidase), a revelação da membrana com DAB e peróxido de hidrogênio identificou a presença de proteína com cauda de histidina em todos os extratos aplicados, conforme demonstrado na figura 19.



**FIGURA 19: Dot Blotting dos extrato totais de indução (2 mL) dos novos clones LEXSY 5 obtidos.**

A indução foi realizada em menor escala, em placas de cultivo de 2 mL. Os volumes de extrato total, contendo células lisadas e meio de cultivo foram aplicados diretamente na membrana e adsorvidos por vácuo. Foram aplicados diferentes volumes, demonstrados na figura acima. Como controle positivo foi utilizada a Lic-E-NTPDase 2 produzida em bactéria e como controle negativo uma célula LEXSY não induzida transfectada com pLbc4. A membrana foi incubada com anticorpo primário anti-histidina, anticorpo secundário conjugado à peroxidase e revelada por reação com DAB e peróxido de hidrogênio. Todos os clones LEXSY carregando a construção 5 mostraram-se positivos para a expressão de uma proteína com cauda de 6xHis.

Ao realizar a indução do clone 5.4 cultivado em garrafas em volumes de 10 mL, tanto as frações do pellet quanto do sobrenadante também revelaram no ensaio de Dot Blotting. Entretanto, as intensidades de coloração nos pontos dessas frações foram menores do que a observada no extrato total (cultivo em 2 mL). O mesmo experimento também mostrou a produção de proteína com cauda de histidina nos extratos totais dos clones 6.3 e 6.4 (também em menor intensidade quando comparados com o clone 5.4). As revelações referentes às células cultivadas em volumes de 10 mL (em garrafas de 25 mL) foram menos intensas quando comparadas com as células cultivadas em placas de 6 poços (2 mL). Até mesmo clones com menor coloração rosa, como os com a construção 6, resultaram em maiores revelações nesta situação (figura 20).

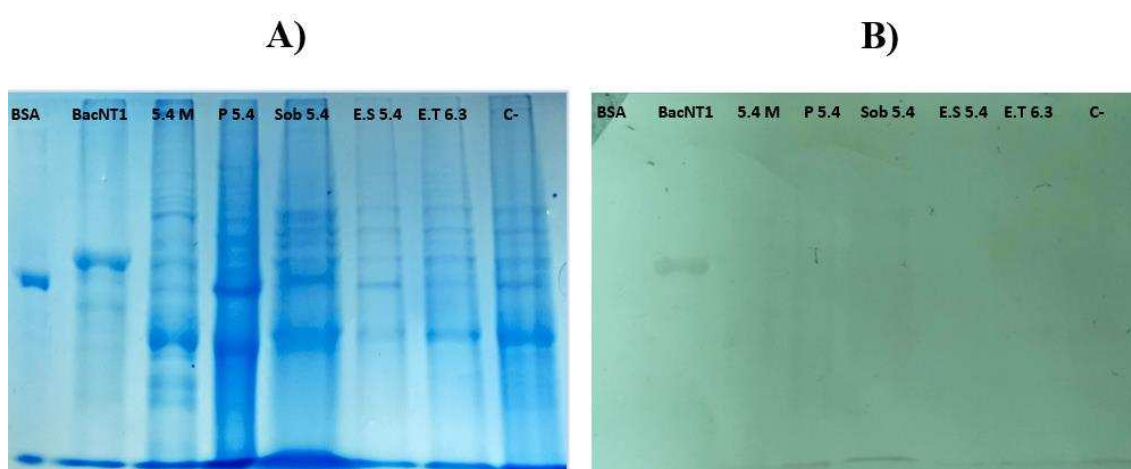


**FIGURA 20: Dot Blotting de diferentes clones e diferentes condições de indução.** Legendas: **5.4 E.T:** Extrato total da indução do clone 5.4 LEXSY (2 mL); **C - :** Controle negativo; extrato total de indução do clone pLbc4 (2 mL); **5.4 P:** Pellet da indução de 10 mL do clone 5.4; **5.4 S:** Sobrenadante da indução de 10 mL do clone 5.4; **6.3 E.T:** Extrato total da indução do clone 6.3 (2 mL); **6.4 T:** Extrato total da indução do clone 6.4 (2 mL). A membrana foi incubada com anticorpo primário anti-histidina, anticorpo secundário conjugado à peroxidase e revelada por reação com DAB e peróxido de hidrogênio. Foram aplicados 30 µL de amostras por poço.

Apesar de todos os clones 5 terem resultado positivamente para o ensaio de Dot Blotting, durante os experimentos subsequentes optamos por utilizar prioritariamente o clone LEXSY 5.4, visto que esse demonstrou maior coloração da proteína mCherry e maiores níveis fluorescência em análise no microscópio EVOS FL Imaging System.

## 6.8 – Western Blotting

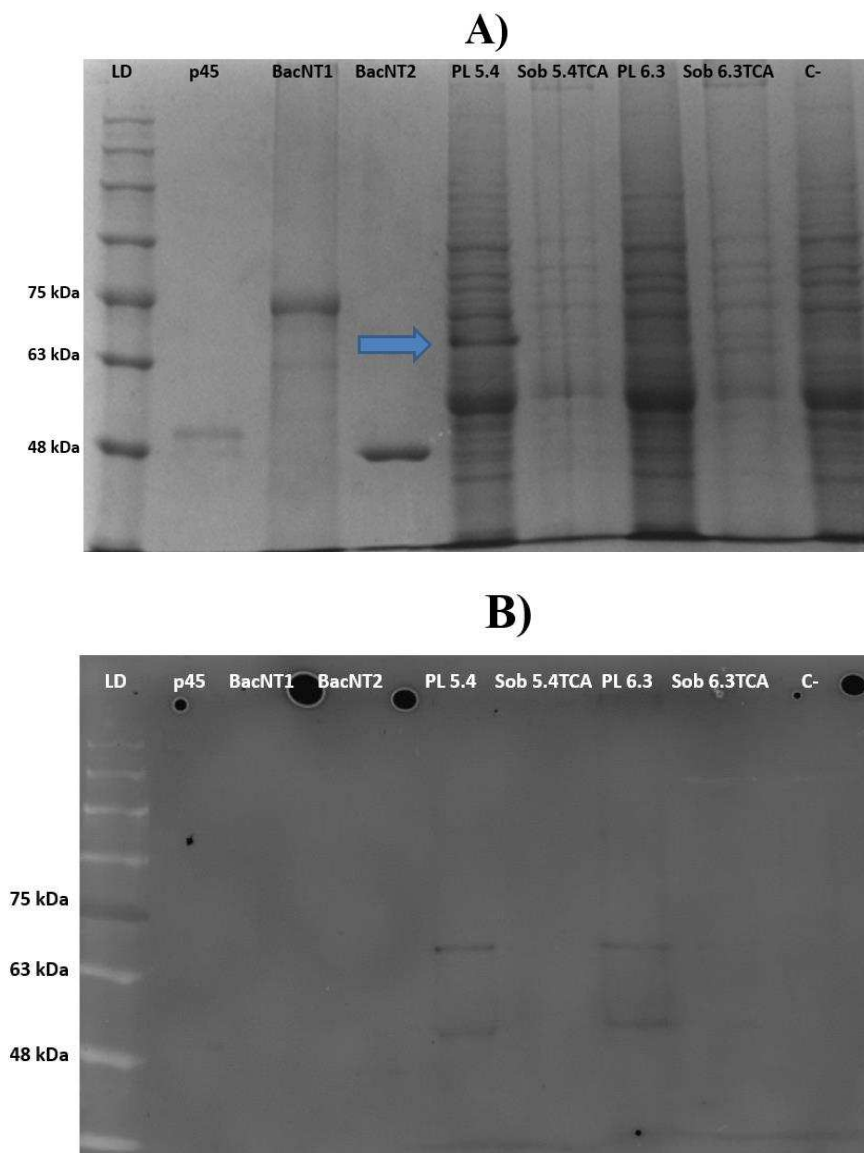
De acordo com os resultados do Dot Blotting foi possível confirmar que os novos clones LEXSY estão produzindo proteínas com cauda de 6xHis. Entretanto, este tipo de análise não permite inferir o tamanho da proteína ou proteínas que são detectadas na membrana. Portanto, realizamos alguns ensaios de Western Blotting para detectar as bandas de interesse, estimadas em aproximadamente 70 kDa para a Lic-E-NTPDase 1 e 42 kDa para a Lic-E-NTPDase 2. Não foi possível detectar no ensaio a presença das Lic-E-NTPDases recombinantes em LEXSY, onde somente a Lic-E-NTPDase 1 bacteriana revelou (figura 21).



**FIGURA 21: A) SDS-PAGE 10% e B) Western Blotting da indução dos clones LEXSY 5.4 e LEXSY 6.3.** Legendas: **BSA:** proteína BSA (67 kDa); **BacNT1:** Lic-E-NTPDase-1 expressa em bactéria e purificada (70 kDa); **5.4 M:** Fração de membrana do Clone 5.4; **P5.4:** pellet total (sem sobrenadante) do Clone 5.4; **Sob5.4:** sobrenadante concentrado do clone 5.4; **ES 5.4:** Extrato solúvel (SEM membrana) do clone 5.4; **ET 6.3:** extrato total do clone 6.3; **C- :** Controle negativo; extrato total de indução do clone pLbc4 (2 mL). A membrana foi incubada com anticorpo primário anti-histidina, anticorpo secundário conjugado à peroxidase e revelada por reação com DAB e peróxido de hidrogênio.

Como estes resultados entraram em conflito com o observado no Dot Blotting, suspeitamos que a sensibilidade de revelação do DAB para o experimento de Western Blotting talvez não estivesse sendo satisfatória. Decidimos portanto trocar a metodologia de revelação, para que dessa vez as proteínas recombinantes fossem detectadas com o uso de anticorpo secundário conjugado a FITC. Com essas alterações a revelação do Western Blotting demonstrou a marcação de duas bandas nas mesmas alturas nos clones 5.4 e 6.3, entretanto, os controles do experimento, contendo cauda de hexa-histidina (p45,

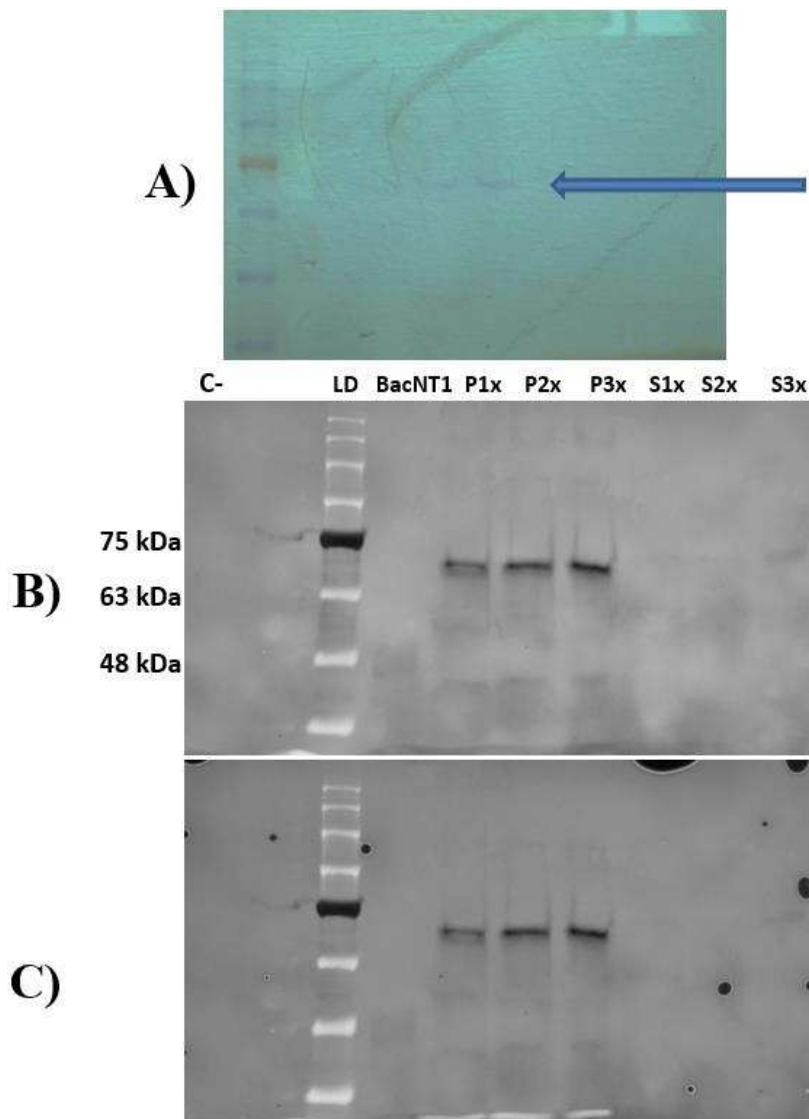
BacNT1 e BacNT2) não revelaram, o que diminuiu a confiabilidade do resultado. Além disso, os dois clones que resultaram positivamente demonstram um padrão de revelação idêntico, o que é improvável já que os genes alvo que cada um expressa têm quase 800 pb de diferença entre si. No SDS-PAGE da figura 22 é possível observar uma banda diferencialmente expressa no pellet de indução do clone LEXSY 5.4 (indicada pela seta azul), na mesma altura da proteína revelada. Resolvemos então investigar esses resultados com outras abordagens.



**FIGURA 22: A) SDS-PAGE 10% e B) Western Blotting da indução dos clones LEXSY 5.4 e LEXSY 6.3 revelados com FITC.** Legendas: LD: marcador de massa molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder; p45: proteína de 45 kDa com cauda de 6xHis; BacNT1: Lic-E-NTPDase-1 expressa em bactéria e purificada (70 kDa); BacNT2: Lic-E-NTPDase-2 expressa em bactéria e purificada (42 kDa); P 5.4: extrato de proteínas do pellet do clone 5.4; Sob 5.4TCA: sobrenadante concentrado do clone 5.4 por precipitação com TCA; Sob 5.4AM: sobrenadante concentrado do clone 5.4 via coluna amicon; P 6.3: extrato de

proteínas do pellet do clone 6.3; C- : Controle negativo; extrato de proteínas do pellet do clone pLbc4. Amostras não fervidas.

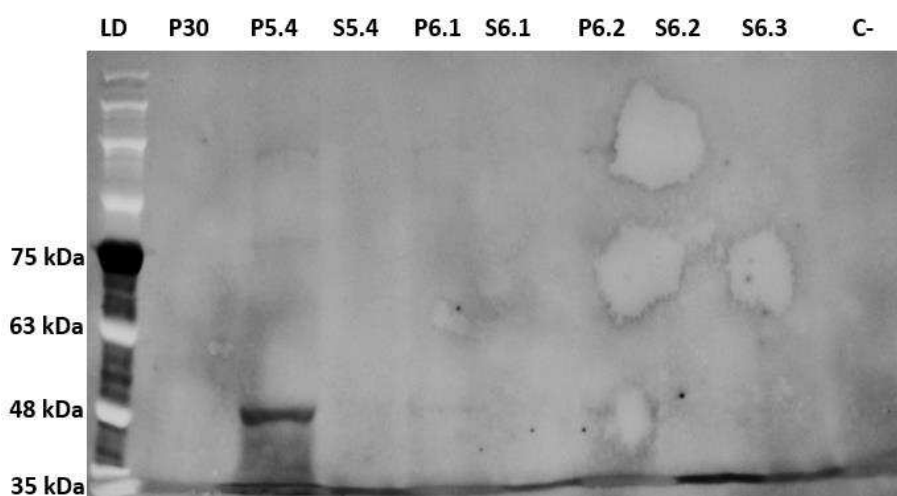
Dentre nossas suspeitas, a que ganhou mais força foi a possibilidade de as revelações estarem ocorrendo devido a presença da proteína mCherry, que é expressa no sistema T7-TR. Devido à sua coloração e fluorescência naturais esta proteína poderia estar sendo detectada pelo leitor de fluorescência. A suspeita ficou ainda mais evidente quando em um SDS-PAGE foi possível observar bandas na cor rosa diretamente no gel, logo após a eletroforese (Figura 23 A, indicadas pela seta azul). Terminada a eletroforese e a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose, a revelação da membrana com anticorpos conjugados a FITC demonstrou padrão semelhante ao resultado da Figura 22 B (Figura 23 B). Para confirmar que não eram os anticorpos conjugados que estavam revelando e sim a proteína mCherry, a mesma membrana teve os anticorpos desligados após revelação, através da incubação em solução ácida de Ponceau por 15 min. Depois de lavada várias vezes para remoção do Ponceau, a membrana foi levada novamente ao foto documentador de fluorescência FLA 5100 e continuou demonstrando o mesmo padrão de fluorescência (Figura 23 C).



**FIGURA 23: A) SDS-PAGE 10%, B) Western Blotting revelado com anticorpos conjugados, C) Western Blotting revelado após desligamento dos anticorpos.** As figuras A), B), C) correspondem ao mesmo gel (A) e posterior transferência (B,C) para membrana de nitrocelulose. Legendas: **LD:** marcador de massa molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder; **BacNT1:** Lic-E-NTPDase 1 expressa em bactéria e purificada; **P1x:** Extrato de células do clone 5.4 com concentração inicial de células padrão; **P2x:** Extrato de células do clone 5.4 com concentração inicial de células dobrada; **P3x:** Extrato de células do clone 5.4 com concentração inicial de células triplicada.

Um último Western Blotting confirmou de vez a suspeita de que a proteína mCherry era a banda detectada nas revelações. Dessa vez as amostras foram fervidas antes de serem aplicadas no SDS-PAGE. Imediatamente após a transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose, sem realizar qualquer incubação com anticorpos, a mesma foi levada ao foto documentador e revelada. Na figura abaixo é

possível observar a revelação da mCherry, agora em uma banda próxima a 48 kDa, correspondendo à esta proteína completamente desnaturada, que aparece no pellet do clone 5.4 e em menor intensidade no pellet do clone 6.1 (figura 24). A altura detectada é semelhante às bandas inferiores observadas na figura 22 B. Depois deste resultado, desistimos de revelar os experimentos de Western Blotting com anticorpos secundários conjugados a FITC. A revelação desta membrana com DAB também não resultou em bandas.



**FIGURA 24:** A) Western Blotting revelado sem a presença de anticorpos, com extratos de diferentes amostras fervidos antes da aplicação em SDS-PAGE. Legendas: **LD:** marcador de massa molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder; **P30:** proteína de 30 kDa contendo 6xHis; **P5.4:** pellet de células fervido do clone 5.4; **P6.1:** extrato de células de nova indução do clone 6.1; **S6.1:** sobrenadante concentrado via amicon da nova indução do clone 6.1; **P6.2:** extrato de células de nova indução do clone 6.2; **S6.2:** sobrenadante concentrado via amicon da nova indução do clone 6.2; **S6.3:** sobrenadante concentrado via amicon da nova indução do clone 6.3; **C-:** pellet do clone pLbc4.

## 6.8 – Tentativa de purificação das proteínas recombinantes

Mesmo com os ensaios de Western Blotting não funcionando como esperado, os resultados positivos nos experimentos de Dot Blotting e os altos níveis de expressão da proteína mCherry nos levaram a tentar purificar as proteínas produzidas nos clones LEXSY. Para os experimentos de purificação, as induções foram realizadas em volumes de pelo menos 100 mL; as frações processadas de pellet ou de sobrenadante foram injetadas em equipamento de cromatografia líquida, FPLC AKTA PURIFIER UPC 10

(GE Healthcare), com uma coluna de afinidade (resina de níquel) de 1 mL (HisTrap FF crude) acoplada.

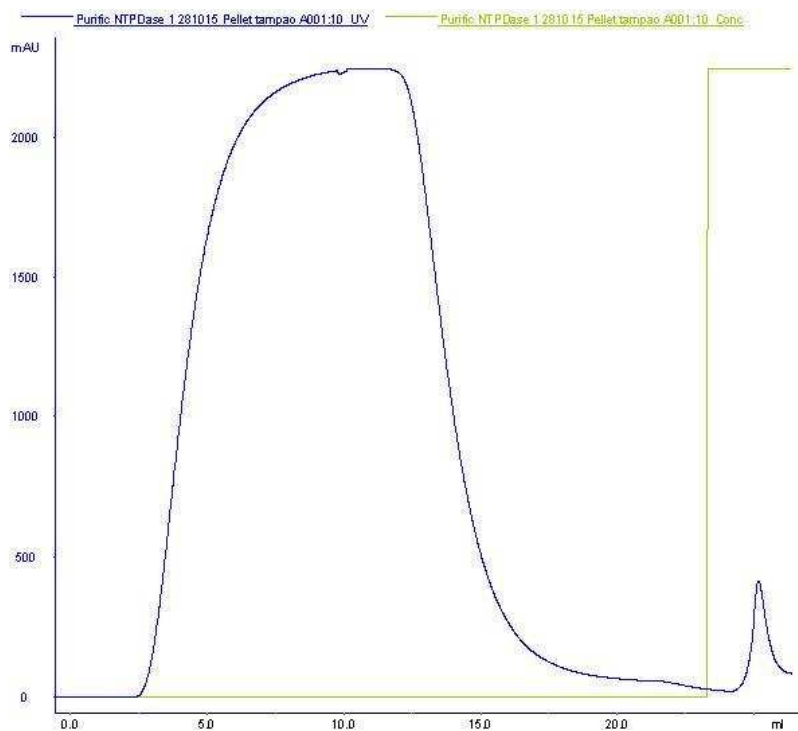
Em algumas dessas purificações conseguimos identificar picos similares aos observados quando há purificação de proteínas (figuras 25 e 26), entretanto, ao aplicar essas amostras em gel as concentrações proteicas eram mínimas, o que impedia de visualizar as bandas e também fazer estimativas com relação à concentração das amostras por Bradford.

Algumas estratégias foram testadas no decorrer dos ensaios de purificação. Como o clone 5.4 era o mais promissor, resolvemos realizar os testes com ele, consistindo das seguintes estratégias:

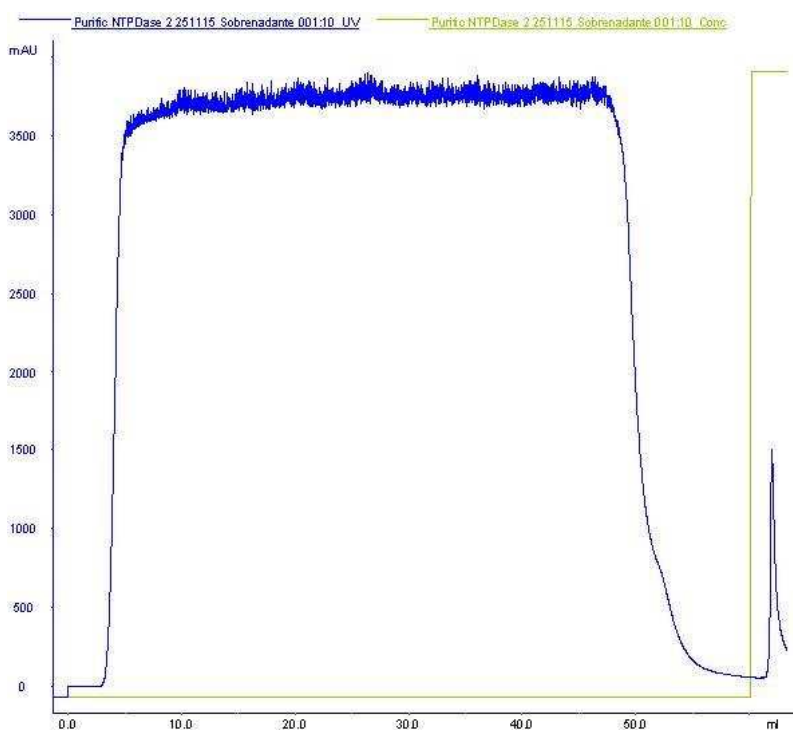
- Estratégia 1: aplicar 10 mL do meio de cultivo diretamente na coluna;
- Estratégia 2: concentrar o meio de cultivo e diluir em 10 mL de tampão A (Tris 50 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 10 mM);
- Estratégia 3: sedimentar 20 mL de cultura, suspender em 10 mL de tampão A, sonicar e filtrar em membrana de 0,22  $\mu$ M;
- Estratégia 4: preparar um extrato total de 10 mL de cultura, centrifugar a 16000g por 20 min e injetar as proteínas solúveis na coluna;

Estratégia 5: concentrar o sobrenadante e diluir em tampão com 10 mL de uréia 8 M.

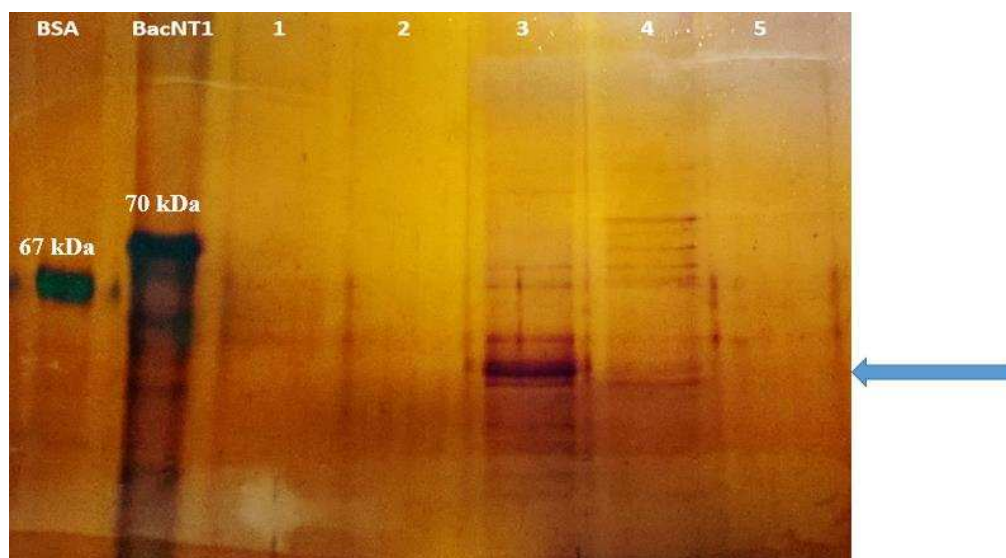
Apesar de a estratégia 3 resultar em um pico e demonstrar a presença de uma banda única no gel, as quantidades de proteínas foram tão baixas que não foi possível estimá-las por Bradford. Na figura 25 é possível notar que gel revelado por prata teve que corar mais que o necessário para que as bandas pudessem ser vistas. A banda mais forte observada na purificação está em tamanho menor que o esperado para a Lic-E-NTPDase 1 (bem inferior a 70 kDa, indicada pela seta azul). Resultados similares foram encontrados nas purificações do clone 6.3.



**FIGURA 25: Purificação de pellet do clone 5.4.** Cromatograma obtido no processo de purificação do pellet de indução do clone 5.4.



**FIGURA 26: Purificação de sobrenadante do clone 6.3.** Cromatograma resultante da purificação do sobrenadante de indução do clone 6.3.

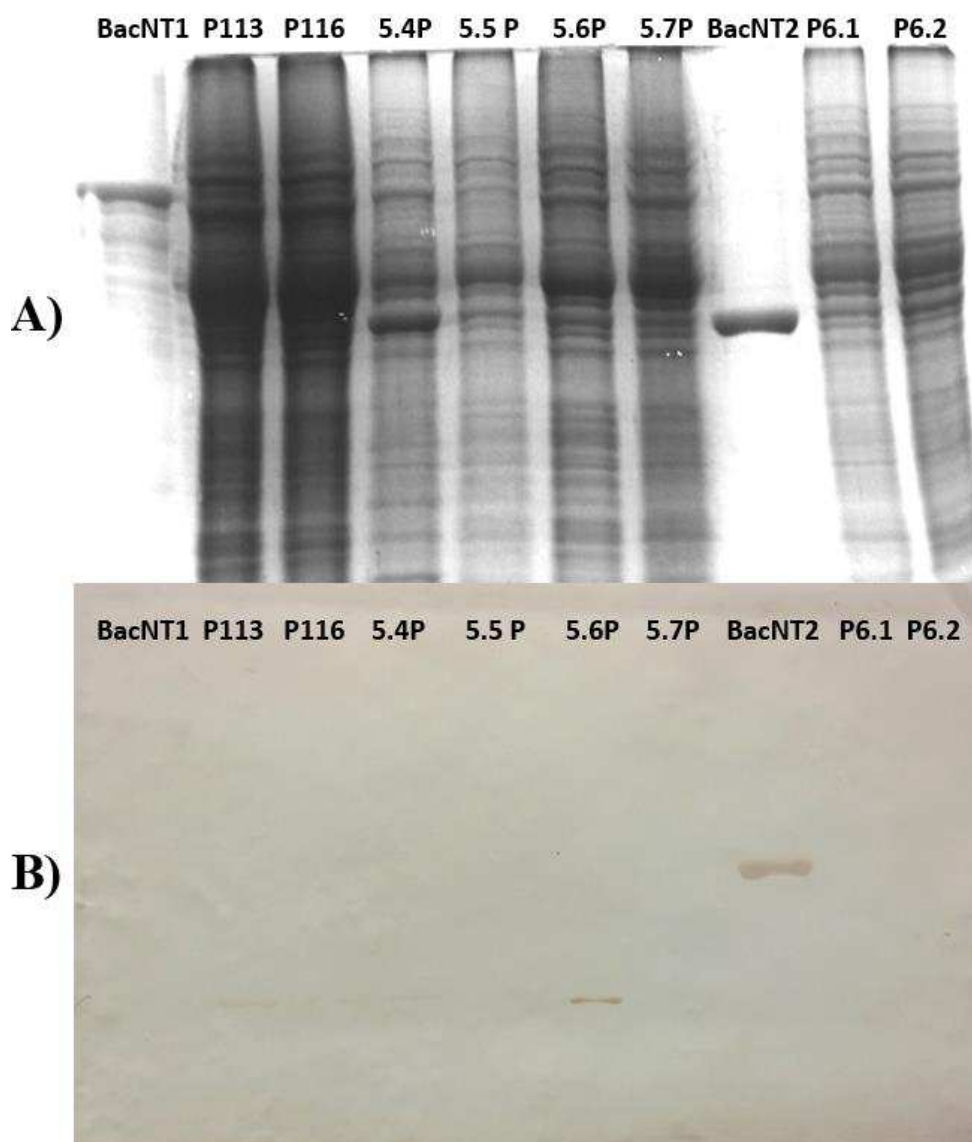


**FIGURA 27: SDS-PAGE 10% com as cinco estratégias de purificação da indução do clone 5.4.** Legendas: **BSA:** proteína BSA; **BacNT1:** Lic-E-NTPDase-1 expressa em bactéria e purificada; **1:** amostra da estratégia 1; **2:** amostra da estratégia 2; **3:** amostra da estratégia 3; **4:** amostra da estratégia 4; **5:** amostra da estratégia. Foram aplicados 30  $\mu$ L de amostra em cada canaleta. A seta azul indica a altura de uma banda mais forte, obtida pela estratégia 3.

### 6.9 – Western Blotting da indução do clone 11 e dos clones 5 e 6

Apesar de este trabalho não ter focado na expressão dos clones constitutivos, como a construção 11 já havia sido realizada nas fases iniciais do projeto e a Pós-doutoranda Christiane Mariotini-Moura conseguiu selecionar um clone LEXSY abrigando essa construção, uma análise da expressão deste foi realizada no fim do presente trabalho, a fim de verificar se as falhas no processo de expressão das Lic-E-NTPDases poderiam ocorrer devido a algum problema no sistema induzível. O sistema constitutivo não necessita da adição de indutores ao meio de cultivo, portanto, foram cultivadas duas garrafas do clone 11, sendo uma mantida por três dias e a outra por seis dias. Como os Westerns anteriores não funcionaram bem, dessa vez preparou-se um SDS-PAGE 12%, já que havia a suspeita de as proteínas recombinantes estarem em tamanhos menores que o esperado. Além dos pellets do clone 11, foram ainda analisados os pellets de indução dos clones 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 6.1 e 6.2. Mais uma vez os clones 6 não demonstraram qualquer tipo de revelação. Curiosamente o clone 5.6 mostrou uma revelação relativamente forte de uma banda bem abaixo da Lic-E-NTPDase 2 de bactéria. Com exceção do clone 5.7, os outros clones 5 e os dois pellets do clone 11 também demonstraram revelação em altura similar, entretanto, com intensidade muito menor.

Este resultado demonstra que há uma alteração do tamanho final da proteína alvo nos clones transformados com a Lic-E-NTPDase 1. Já nos clones transformados com a Lic-E-NTPDase 2, em ensaios de Western Blotting não foi possível detectar qualquer expressão (figura 28). Esses resultados que sugerem que podem ter ocorrendo algum tipo de controle ou alteração na expressão dessas proteínas no interior da *L. tarentolae*.



**FIGURA 28:** A) SDS-PAGE 12% e B) Western Blotting da indução de diversos clones LEXSY obtidos neste trabalho. Legendas: **BacNT1:** Lic-E-NTPDase 1 expressa em bactéria e purificada (revelou muito pouco devido à degradação); **P113:** extrato de células da indução do clone 11 por 3 dias; **P116:** extrato de células da indução do clone 11 por 6 dias; **5.4P:** Pellet da indução do clone 5.4; **5.5P:** Pellet da indução do clone 5.5; **5.6P:** Pellet da indução do clone 5.6; **5.7P:** Pellet da indução do clone 5.7; **BacNT2:** Lic-E-NTPDase 2 expressa em bactéria e purificada; **6.1P:** Pellet da indução do clone 6.1; **6.2P:** Pellet da indução do clone 6.2. A membrana foi incubada com anticorpo primário anti-histidina, anticorpo secundário conjugado à peroxidase e revelada por reação com DAB e peróxido de hidrogênio.

## 6.9 – PCR de colônias dos clones LEXSY

Já que não foi possível isolar nenhuma das Lic-E-NTPDases em nenhum dos clones selecionados e testados nesse projeto, como experimento final foi realizada uma PCR de colônias de quase todos os clones disponíveis. O objetivo desse ensaio foi detectar a presença, ausência ou até mesmo alterações nos genes das Lic-E-NTPDases inseridas nas *L. tarentolae*. Nos resultados mostrados na figura 29, os clones contendo a Lic-E-NTPDase 2, 6.1, 6.2, 6.3 não demonstraram qualquer amplificação. Os clones 5.4, 5.5 e o 5.6 (em menor intensidade) demonstraram amplificação do gene em altura ligeiramente acima da banda do clone bacteriano, o que é esperado já que os primers amplificam também algumas sequências do pLbc4 (pouco mais de 30 pb); os clones 5.7 e 5.9 não resultaram em amplificação. O clone 11 também não demonstrou amplificação.



**FIGURA 29: PCR de colônias de diversos clones LEXSY.** Legendas: **LD1:** 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen), imagem retirada do manual; **6.1:** PCR do clone 6.1; **6.2:** PCR do clone 6.2; **6.3:** PCR do clone 6.3; **NT2:** PCR do clone bacteriano contendo a Lic-E-NTPDase 2 com os primers do clone 6; **p4N2:** PCR do pLbc4 utilizada como controle negativo da reação (primers do clone 6); **LD2:** 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen) aplicado no gel; **p4N1:** PCR do pLbc4 utilizada como controle negativo da reação (primers do clone 5); **NT1:** PCR do clone bacteriano contendo a Lic-E-NTPDase 1; **5.4-5.9:** PCR dos clone 5.4 até 5.9 na ordem; **pIN:** PCR do pLneo utilizada como controle negativo (primers do clone 11); **NT1.1:** PCR do clone bacteriano contendo a Lic-E-NTPDase 1 com os primers do clone 11; **11:** PCR do clone 11.

## 6.10 – Discussões finais e hipóteses

No intuito de se obter as E-NTPDases de *L. infantum* com propriedades bioquímicas mais semelhantes ao organismo original, o que pode levar a uma conclusão mais fiel da atividade biológica dessas enzimas, além da possibilidade de utilizar os organismos recombinantes como vacinas vivas, desenhamos várias estratégias de clonagem em vetores de expressão do sistema LEXSY. Obtivemos sucesso na clonagem da Lic-E-NTPDase 1 tanto no vetor pLEXSY-neo2 como no vetor pLEXSYblecherry4; a Lic-E-NTPDase 2 foi clonada com sucesso no vetor pLEXSYblecherry4. As construções em pLEXSYblecherry4 foram utilizadas para transfectar células T7-TR, onde foram isolados por seleção clonal quatro clones hospedando a Lic-E-NTPDase 2 e oito clones hospedando a Lic-E-NTPDase 1. É importante ressaltar que todos estes clones foram selecionados em meio contendo o antibiótico bleomicina, cuja resistência é fornecida pela presença e manutenção do vetor no interior da célula.

Todos os clones foram induzidos para avaliação da expressão das proteínas-alvo. Apesar de os ensaios de Dot Blot mostrarem que nesses clones há a presença de proteínas contendo cauda de histidina, os ensaios de Western Blotting falharam nesta avaliação ou resultaram em bandas bem menores que o esperado. A PCR de colônias dos clones LEXSY, utilizando-se dos primers de clonagem para amplificar as Lic-E-NTPDases, demonstrou resultados variáveis entre os diferentes clones. Em alguns casos sequer houve amplificação, em outros, as bandas apareceram em tamanhos diferentes e levemente maiores que a banda referência.

Contudo, diversos resultados deste trabalho mostraram que os clones LEXSY obtidos estavam em perfeitas condições para expressar as proteínas clonadas: o sequenciamento dos clones bacterianos com confirmação do frame e integridade dos genes clonados; o cultivo dos clones LEXSY transfectados em meio seletivo contendo bleomicina; a super-expressão da proteína repórter mCherry em altos níveis em alguns clones; e a detecção de uma proteína apresentando cauda de histidina. Então, como explicar a não detecção ou a detecção em tamanhos diferentes do esperado das proteínas alvo? Uma hipótese que acabou ganhando bastante força no final deste trabalho foi a possibilidade de que a *L. tarentolae* estaria promovendo a recombinação das Lic-E-NTPDases em seu genoma. O mecanismo de recombinação homóloga está envolvido na regulação da expressão gênica, amplificação de genes em resposta a estímulos e na produção de rearranjos cromossômicos envolvidos na evolução genômica [111].

Alguns fatos dão base para a nossa hipótese de recombinação. O primeiro deles é a presença de regiões não traduzidas (UTRs) da própria *L. tarentolae* nos vetores LEXSY. Essas UTRs foram adicionadas para fornecerem os sinais de splicing apropriados para o processamento pós-transcricional do mRNA dos genes alvo e dos marcadores de resistência na célula hospedeira. Entretanto, a presença dessas regiões pode favorecer a recombinação homóloga dos plasmídeos no genoma da *L. tarentolae*. Em uma publicação de 2011, os próprios criadores do sistema LEXSY mostraram que clones transfectados com plasmídeos circulares demonstraram uma maior heterogeneidade tanto no tamanho quanto na quantidade dos epissomos. Estes também exibiram maiores alterações na abundância e estrutura dos epissomos ao longo das gerações. A digestão do DNA total dos clones transfectados com vetores circulares resultou no surgimento de várias bandas reativas de tamanhos múltiplos, demonstrando bandas até maiores que o vetor original, indicando que os epissomos sofreram grandes rearranjos. Segundo os autores não foi possível estabelecer uma relação clara entre os tamanhos e abundância dos epissomos ou os níveis de expressão da proteína fluorescente analisada [98], mas esses resultados são dados não mostrados no trabalho. Os autores ainda sugerem que as bandas observadas em ensaios de eletroforese de campo pulsátil possam representar unidades individuais de transcrição ou seus concatâmeros integrados aos cromossomos. Além disso, eles afirmam que como todos os plasmídeos LEXSY contêm UTRs derivadas do genoma de *L. tarentolae* essas integrações podem ser possíveis [98].

Outro fato que também fornece embasamento à nossa hipótese é a similaridade entre as E-NTPDases de *L. tarentolae* com as de *L. infantum*. Em análise de alinhamento utilizando-se ferramentas de bioinformática do site <http://tritrypdb.org/tritrypdb/>, foi possível observar que a sequência da Lic-E-NTPDase 1 clonada neste trabalho possui 84% de identidade com a sua correspondente em *L. tarentolae*; a Lic-E-NTPDase 2 demonstrou 86% de identidade com o gene correspondente em *L. tarentolae*.

Uma outra possibilidade levantada é inerente à própria função das E-NTPDases. Como se tratam de enzimas que hidrolisam nucleotídeos di e trifosfatados, um possível excesso dessas proteínas poderia levar a depleção de nucleotídeos no organismo hospedeiro. Isso pode parcialmente explicar o fato de que não foi possível isolar um número muito grande de clones, mesmo com várias repetições de transfecção. Além disso, clones hospedando a Lic-E-NTPDase 2 foram mais difíceis de serem obtidos e de forma geral exibiram baixa expressão da proteína mCherry, o que torna também essa

hipótese viável, já que esta enzima isolada de bactéria demonstra níveis de atividade mais altos quando comparada com a isoforma 1.

É possível que algumas das nossas hipóteses estejam corretas ou até mesmo que a resposta esteja na junção delas. Contudo, compreender os mecanismos que possam levar a uma regulação negativa da expressão de proteínas heterólogas em um organismo hospedeiro não é uma tarefa simples e sequer foi o objetivo deste trabalho. A extração do DNA genômico dos clones LEXSY, amplificação do genoma com os primers de clonagem e sequenciamento do amplicon poderia fornecer respostas mais conclusivas, mas não existem garantias. Além disso, mais clones de expressão constitutiva precisam ser testados para confirmar se estes também falham em expressar as Lic-E-NTPDases; neste trabalho somente uma população policlonal foi avaliada em um único teste.

É válido ainda reforçar que o sistema LEXSY está disponível a relativamente pouco tempo no mercado, o que portanto torna a padronização das técnicas e compreensão dos resultados um processo mais lento. Em uma busca realizada na internet, foram encontrados dois trabalhos brasileiros que utilizaram este sistema para expressão heteróloga de proteínas. Em dissertação de mestrado, Michel Gomes Chagas clonou a proteína de envelope E do vírus da febre amarela em sistema LEXSY mas não obteve sucesso em detectar a expressão proteína recombinante na célula hospedeira [112]. Na tese de doutorado de Marcos Michel de Souza, os autores sequer conseguiram transfectar *L. tarentolae*. Duas pesquisadoras foram para os laboratórios da empresa Jena Bioscience (que comercializa o kit), onde conseguiram transfectar a célula hospedeira mas não detectaram expressão da proteína alvo (proteína capsidial do Leishmania RNA vírus 1-4) [113].

## **7 – CONCLUSÕES**

- As clonagens das Lic-E-NTPDases 1 e 2 foram realizadas com sucesso nos plasmídeos LEXSY (Clones 5, 6 e 11);
- Foi possível transfectar e realizar a seleção clonal das *L. tarentolae* T7-TR com as construções 5 e 6 circulares;
- Obtivemos sucesso também na expressão da proteína repórter mCherry com os clones selecionados;
- Nos ensaios de Dot Blot os clones LEXSY deste trabalho se mostraram positivos em testes com anticorpo monoclonal anti-histidina;
- Já nos ensaios de Western Blot não foram encontradas bandas correspondentes às Lic-E-NTPDases nas alturas esperadas;
- A PCR de colônias dos clones LEXSY demonstrou resultados variáveis entre os diferentes clones. Em alguns casos sequer houve amplificação, em outros, as bandas apareceram em tamanhos diferentes e levemente maiores que a banda referência.

## **8 – PERSPECTIVAS**

- Extrair o DNA genômico dos clones LEXSY deste trabalho, realizar PCR com primers de clonagem e sequenciar o amplicon;
- Transfectar e analisar mais clones de expressão constitutiva;
- Clonar proteínas de *Leishmanias* virulentas que tenham pouca similaridade ou que sejam ausentes em *L. tarentolae*.
- Clonar outras proteínas eucarióticas no sistema LEXSY induzível.

## 9 – REFERÊNCIAS

- [1] F. Dantas-Torres, “The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*,” *Vet Parasitol*, vol. 149, no. 3–4, pp. 139–46, 2007.
- [2] World Health Organization, “Control of the leishmaniasis,” *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.*, no. 949, pp. 22–26, 2010.
- [3] M. P. Abbracchio and G. Burnstock, “Purinergic signalling: pathophysiological roles,” *Japanese journal of pharmacology*, vol. 78, pp. 113–145, 1998.
- [4] F. M. Sansom, H. J. Newton, S. Crikis, N. P. Cianciotto, P. J. Cowan, A. J. F. d’Apice, and E. L. Hartland, “A bacterial ecto-triphosphate diphosphohydrolase similar to human CD39 is essential for intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*,” *Cell. Microbiol.*, vol. 9, no. 8, pp. 1922–1935, 2007.
- [5] F. M. Sansom, S. C. Robson, and E. L. Hartland, “Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 72, no. 4, pp. 765–781, Table of Contents, 2008.
- [6] N. Mizumoto, T. Kumamoto, S. C. Robson, J. Sévigny, H. Matsue, K. Enyoji, and A. Takashima, “CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness,” *Nat. Med.*, vol. 8, no. 4, pp. 358–365, 2002.
- [7] E. de Almeida Marques-da-Silva, J. C. de Oliveira, A. B. Figueiredo, D. de Souza Lima Júnior, C. M. Carneiro, J. L. Rangel Fietto, and L. C. Crocco Afonso, “Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection,” *Microbes Infect.*, vol. 10, pp. 850–857, 2008.
- [8] T. U. Maioli, E. Takane, R. M. E. Arantes, J. L. R. Fietto, and L. C. C. Afonso, “Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice,” *Parasitol. Res.*, vol. 94, pp. 207–212, 2004.
- [9] P. M. Leite, R. S. Gomes, A. B. Figueiredo, T. D. Serafim, W. L. Tafuri, C. C. de Souza, S. a L. Moura, J. L. R. Fietto, M. N. Melo, F. Ribeiro-Dias, M. a P. Oliveira, A. Rabello, and L. C. C. Afonso, “Ecto-Nucleotidase Activities of Promastigotes

- from *Leishmania (Viannia) braziliensis* Relates to Parasite Infectivity and Disease Clinical Outcome,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 6, no. 10, 2012.
- [10] R. F. Santos, M. a S. Pôssa, M. S. Bastos, P. M. M. Guedes, M. R. Almeida, R. DeMarco, S. Verjovski-Almeida, M. T. Bahia, and J. L. R. Fietto, “Influence of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 3, no. 3, 2009.
- [11] M. C. de Souza, E. A. de Assis, R. S. Gomes, E. de A. Marques da Silva, M. N. Melo, J. L. R. Fietto, and L. C. C. Afonso, “The influence of ecto-nucleotidases on *Leishmania amazonensis* infection and immune response in C57B/6 mice,” *Acta Trop.*, vol. 115, no. 3, pp. 262–269, 2010.
- [12] R. F. De Souza, Y. L. dos Santos, R. de Souza Vasconcellos, L. Borges-Pereira, I. S. Caldas, M. R. de Almeida, M. T. Bahia, and J. L. R. Fietto, “Recombinant *Leishmania (Leishmania) infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase NTPDase-2 as a new antigen in canine visceral leishmaniasis diagnosis,” *Acta Trop.*, vol. 125, no. 1, pp. 60–66, 2013.
- [13] P. Desjeux, “Leishmaniasis: Current situation and new perspectives,” *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 27, no. 5, pp. 305–318, 2004.
- [14] J. Alvar, I. D. Vélez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, and M. de Boer, “Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence,” *PLoS One*, vol. 7, no. 5, 2012.
- [15] C.-H. C. Hsiao, N. Ueno, J. Q. Shao, K. R. Schroeder, K. C. Moore, J. E. Donelson, and M. E. Wilson, “The effects of macrophage source on the mechanism of phagocytosis and intracellular survival of *Leishmania*,” *Microbes Infect.*, vol. 13, no. 12–13, pp. 1033–44, 2011.
- [16] N. C. Peters, J. G. Egen, N. Secundino, A. Debrabant, N. Kimblin, S. Kamhawi, P. Lawyer, M. P. Fay, R. N. Germain, and D. Sacks, “In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies,” *Science*, vol. 321, no. 5891, pp. 970–4, 2008.
- [17] N. C. Peters and D. L. Sacks, “The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis,” *Cell. Microbiol.*, vol. 11, no. 9, pp. 1290–6, 2009.

- [18] L. G. Ng, A. Hsu, M. A. Mandell, B. Roediger, C. Hoeller, P. Mrass, A. Iparraguirre, L. L. Cavanagh, J. A. Triccas, S. M. Beverley, P. Scott, and W. Weninger, "Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites.," *PLoS Pathog.*, vol. 4, no. 11, p. e1000222, 2008.
- [19] D. Liu and J. E. Uzonna, "The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 2, no. June, pp. 1–8, 2012.
- [20] N. J. Lapara and B. L. Kelly, "Suppression of LPS-induced inflammatory responses in macrophages infected with *Leishmania*," *J. Inflamm. (Lond.)*, vol. 7, no. 1, p. 8, 2010.
- [21] D. S. Lima-Junior, D. L. Costa, V. Carregaro, L. D. Cunha, A. L. N. Silva, T. W. P. Mineo, F. R. S. Gutierrez, M. Bellio, K. R. Bortoluci, R. a Flavell, M. T. Bozza, J. S. Silva, and D. S. Zamboni, "Inflammasome-derived IL-1 $\beta$  production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*," *Nat. Med.*, vol. 19, no. 7, pp. 909–15, 2013.
- [22] G. Sehgal, K. Zhang, R. F. Todd, L. a Boxer, and H. R. Petty, "Lectin-like inhibition of immune complex receptor-mediated stimulation of neutrophils. Effects on cytosolic calcium release and superoxide production.," *J. Immunol.*, vol. 150, no. 10, pp. 4571–80, 1993.
- [23] R. Ben-Othman, A. R. Flannery, D. C. Miguel, D. M. Ward, J. Kaplan, and N. W. Andrews, "Leishmania-mediated inhibition of iron export promotes parasite replication in macrophages.," *PLoS Pathog.*, vol. 10, no. 1, p. e1003901, 2014.
- [24] M. Podinovskaia and A. Descoteaux, "Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction.," *Future Microbiol.*, vol. 10, no. 1, pp. 111–29, 2015.
- [25] B. D. Pandey, S. B. Pun, O. Kaneko, K. Pandey, and K. Hirayama, "Case report: Expansion of visceral leishmaniasis to the western hilly part of Nepal," *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 84, no. 1, pp. 107–108, 2011.
- [26] M. O. Harhay, P. L. Olliaro, D. L. Costa, and C. H. N. Costa, "Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil," *Trends in Parasitology*, vol. 27, no. 9. pp. 403–409, 2011.

- [27] E. de Almeida Marques-da-Silva, J. C. de Oliveira, A. B. Figueiredo, D. de Souza Lima Júnior, C. M. Carneiro, J. L. Rangel Fietto, and L. C. Crocco Afonso, “Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection,” *Microbes Infect.*, vol. 10, no. 8, pp. 850–857, 2008.
- [28] M. da Saúde, *Guia de vigilância epidemiológica*, Sexta Edição. Brasília, 2005.
- [29] J. Moreno and J. Alvar, “Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model,” *Trends in Parasitology*, vol. 18, no. 9, pp. 399–405, 2002.
- [30] C. Henrique, N. Costa, and C. M. M. Tapety, “Controle da leishmaniose visceral em meio urbano : estudo de intervenção randomizado fatorial Control of visceral leishmaniasis in urban areas : randomized factorial intervention trial,” *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, vol. 40, no. 4, pp. 415–419, 2007.
- [31] V. Tomaz-Soccol, E. A. Castro, I. T. Navarro, M. R. de Farias, L. M. de Souza, Y. Carvalho, S. Bispo, N. A. Membrive, J. C. Minozzo, J. Truppel, W. Bueno, and E. Luz, “Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: Implicações epidemiológicas,” *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, vol. 18, no. 3, pp. 46–51, 2009.
- [32] I. Arevalo, G. Tulliano, A. Quispe, G. Spaeth, G. Matlashewski, A. Llanos-Cuentas, and H. Pollack, “Role of imiquimod and parenteral meglumine antimoniate in the initial treatment of cutaneous leishmaniasis,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 44, no. 12, pp. 1549–1554, 2007.
- [33] G. A. S. Romero and M. Boelaert, “Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 4, no. 1, p. e584, 2010.
- [34] M. da Saúde, *Manual de Vigilancia e Controle da Leishmaniose Visceral*. Brasília, 2006.
- [35] E. de C. Ferreira, M. de Lana, M. Carneiro, A. B. Reis, D. V. Paes, E. S. da Silva, H. Schallig, and C. M. F. Gontijo, “Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations,” *Vet. Parasitol.*, vol. 146, no. 3–4, pp. 235–241, 2007.
- [36] A. Das and N. Ali, “Vaccine development against *Leishmania donovani*,” *Frontiers in Immunology*, vol. 3, no. MAY, 2012.

- [37] F. Di Virgilio, J. M. Boeynaems, and S. C. Robson, "Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity," *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 9, pp. 507–513, 2009.
- [38] J. Lüthje, "Origin, metabolism and function of extracellular adenine nucleotides in the blood," *Klin. Wochenschr.*, vol. 67, p. 558, 1989.
- [39] E. G. Vasconcelos, T. Ferreira, M. U. De Carvalho, W. De Souza, A. M. Kettlun, M. Mancilla, M. A. Valenzuela, and S. Verjovski-almeida, "Partial Purification and Immunohistochemical Localization of ATP Diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*," vol. 271, no. 36, pp. 22139–22145, 1996.
- [40] G. Beldi, Y. Wu, X. Sun, M. Imai, K. Enjyoji, E. Csizmadia, D. Candinas, L. Erb, and S. C. Robson, "Regulated Catalysis of Extracellular Nucleotides by Vascular CD39/ENTPD1 Is Required for Liver Regeneration," *Gastroenterology*, vol. 135, pp. 1751–1760, 2008.
- [41] F. Kukulski, S. a. Lévesque, E. G. Lavoie, J. Lecka, F. Bigonnesse, a. F. Knowles, S. C. Robson, T. L. Kirley, and J. Sévigny, "Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8," *Purinergic Signal.*, vol. 1, pp. 193–204, 2005.
- [42] A. F. Knowles, "The GDA1\_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions," *Purinergic Signal.*, vol. 7, pp. 21–45, 2011.
- [43] M. Handa and G. Guidotti, "Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*)," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 218, pp. 916–923, 1996.
- [44] J. Schulte Am Esch, J. Sévigny, E. Kaczmarek, J. B. Siegel, M. Imai, K. Koziak, A. R. Beaudoin, and S. C. Robson, "Structural elements and limited proteolysis of CD39 influence ATP diphosphohydrolase activity," *Biochemistry*, vol. 38, pp. 2248–2258, 1999.
- [45] G. G. Yegutkin, "Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1783, pp. 673–694, 2008.
- [46] J. Sévigny, C. Sundberg, N. Braun, O. Guckelberger, E. Csizmadia, I. Qawi, M. Imai, H. Zimmermann, and S. C. Robson, "Differential catalytic properties and

- vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation,” *Blood*, vol. 99, no. 8, pp. 2801–2809, 2002.
- [47] C. Goepfert, M. Imai, S. Brouard, E. Csizmadia, E. Kaczmarek, and S. C. Robson, “CD39 modulates endothelial cell activation and apoptosis,” *Mol. Med.*, vol. 6, no. 7, pp. 591–603, 2000.
- [48] M. Imai, C. Goepfert, E. Kaczmarek, and S. C. Robson, “CD39 modulates IL-1 release from activated endothelial cells,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 270, no. 1, pp. 272–8, 2000.
- [49] A. Papanikolaou, A. Papafotika, C. Murphy, T. Papamarcaki, O. Tsolas, M. Drab, T. V. Kurzchalia, M. Kasper, and S. Christoforidis, “Cholesterol-dependent lipid assemblies regulate the activity of the ecto-nucleotidase CD39,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 28, pp. 26406–26414, 2005.
- [50] S. C. Robson, E. Kaczmarek, J. B. Siegel, D. Candinas, K. Koziak, M. Millan, W. W. Hancock, and F. H. Bach, “Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation,” *J. Exp. Med.*, vol. 185, no. 1, pp. 153–163, 1997.
- [51] B. B. Fredholm, a P. IJzerman, K. a Jacobson, K. N. Klotz, and J. Linden, “Nomenclature and classification of adenosine receptors,” in *International Union of Pharmacology. XXV.*, 2001, vol. 53, no. 4, pp. 527–52.
- [52] G. Haskó and P. Pacher, “Regulation of Macrophage Function by Adenosine,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 32, no. 4, pp. 865–869, 2012.
- [53] D. Bermudes, K. R. Peck, M. A. Afifi, C. J. M. Beckers, and K. a. Joiner, “Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 46, pp. 29252–29260, 1994.
- [54] J. B. De Jesus, A. A. De Sá Pinheiro, A. H. C. S. Lopes, and J. R. Meyer-Fernandes, “An ectonucleotide ATP-diphosphohydrolase activity in *Trichomonas vaginalis* stimulated by galactose and its possible role in virulence,” *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.*, vol. 57, no. i, pp. 890–896, 2002.
- [55] J. L. R. Fietto, R. DeMarco, I. P. Nascimento, I. M. Castro, T. M. U. Carvalho, W.

- De Souza, M. T. Bahia, M. J. M. Alves, and S. Verjovski-Almeida, "Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 316, pp. 454–460, 2004.
- [56] C. M. Pinheiro, E. S. Martins-Duarte, R. B. Ferraro, a. L. Fonseca de Souza, M. T. Gomes, a. H. C. S. Lopes, M. a. Vannier-Santos, a. L. S. Santos, and J. R. Meyer-Fernandes, "Leishmania amazonensis: Biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities," *Exp. Parasitol.*, vol. 114, pp. 16–25, 2006.
- [57] V. E. Rezende-Soares FA1, Carvalho-Campos C, Marques MJ, Porcino GN, Giarola NL, Costa BL, Taunay-Rodrigues A, Faria-Pinto P, Souza MA, Diniz VA, Corte-Real S, Juliano MA, Juliano L, "Cytochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes and identification of an antigenic and catalytically active isoform.," *Parasitology*, 2010.
- [58] R. D. S. Vasconcellos, C. Mariotini-Moura, R. S. Gomes, T. D. Serafim, R. D. C. Firmino, M. Silva e Bastos, F. F. De Castro, C. M. De Oliveira, L. Borges-Pereira, A. C. A. de Souza, R. F. de Souza, G. A. T. Gómez, A. D. C. Pinheiro, T. E. F. Maciel, A. Silva-Júnior, G. C. Bressan, M. R. Almeida, M. M. A. Baqui, L. C. C. Afonso, and J. L. R. Fietto, "Leishmania infantum Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 is an Apyrase Involved in Macrophage Infection and Expressed in Infected Dogs," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 8, no. 11, p. e3309, 2014.
- [59] J. J. Marr, R. L. Berens, and D. J. Nelson, "Purine metabolism in *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis*," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 544, no. 2, pp. 360–371, 1978.
- [60] M. Olivier, D. J. Gregory, and G. Forget, "Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view.," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 18, no. 2, pp. 293–305, 2005.
- [61] R. S. Gomes, L. C. F. de Carvalho, R. de Souza Vasconcellos, J. L. R. Fietto, and L. C. C. Afonso, "E-NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) of *Leishmania amazonensis* inhibits macrophage activation," *Microbes Infect.*, pp.

1–9, 2014.

- [62] J. R. Meyer-Fernandes, P. M. Dutra, C. O. Rodrigues, J. Saad-Nehme, and A. H. Lopes, “Mg-dependent ecto-ATPase activity in *Leishmania tropica*,” *Arch.Biochem.Biophys.*, vol. 341, no. 1, pp. 40–46, 1997.
- [63] M. Berrêdo-Pinho, C. E. Peres-Sampaio, P. P. Chrispim, R. Belmont-Firpo, A. P. Lemos, A. Martiny, M. A. Vannier-Santos, and J. R. Meyer-Fernandes, “A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence.” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 391, no. 1, pp. 16–24, 2001.
- [64] C. Mariotini-Moura, M. S. E. Bastos, F. F. de Castro, M. L. Trindade, R. de Souza Vasconcellos, M. A. A. Neves-do-Valle, B. P. Moreira, R. de Freitas Santos, C. M. de Oliveira, L. C. S. Cunha, X. M. Souto, G. C. Bressan, A. Silva-Júnior, M. M. A. Baqui, M. T. Bahia, M. R. de Almeida, J. R. Meyer-Fernandes, and J. L. R. Fietto, “*Trypanosoma cruzi* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion,” *Acta Trop.*, vol. 130, pp. 140–147, 2014.
- [65] H. P. Sørensen and K. K. Mortensen, “Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*,” *J. Biotechnol.*, vol. 115, no. 2, pp. 113–28, 2005.
- [66] R. Sodoyer, “Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals,” *BioDrugs: clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*, vol. 18, pp. 51–62, 2004.
- [67] T. Kleber-Janke and W. M. Becker, “Use of modified BL21(DE3) *Escherichia coli* cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 19, no. 3, pp. 419–24, 2000.
- [68] C. G. Kurland, “Codon bias and gene expression,” *FEBS Lett.*, vol. 285, no. 2, pp. 165–169, 1991.
- [69] E. Lammertyn, L. Van Mellaert, a P. Bijmens, B. Joris, and J. Anné, “Codon adjustment to maximise heterologous gene expression in *Streptomyces lividans* can lead to decreased mRNA stability and protein yield.” *Mol. Gen. Genet.*, vol. 250, no. 2, pp. 223–9, 1996.

- [70] G. A. Bowden, A. M. Paredes, and G. Georgiou, "Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*," *Biotechnology*. (N. Y.), vol. 9, no. 8, pp. 725–730, 1991.
- [71] S. M. Singh and A. K. Panda, "Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 99, no. 4, pp. 303–10, 2005.
- [72] F. P. Douillard, M. O. Connell-motherway, C. Cambillau, and D. Van Sinderen, "Expanding the molecular toolbox for *Lactococcus lactis*: construction of an inducible thioredoxin gene fusion expression system," pp. 1–10, 2011.
- [73] Y. Ming-Ming, Z. Wei-Wei, Z. Xi-Feng, and C. Pei-Lin, "Construction and characterization of a novel maltose inducible expression vector in *Bacillus subtilis*," *Biotechnol. Lett.*, vol. 28, pp. 1713–1718, 2006.
- [74] W. H. Bingle and J. Smit, "High-level expression vectors for *Caulobacter crescentus* incorporating the transcription/translation initiation regions of the paracrystalline surface-layer-protein gene," *Plasmid*, vol. 24, no. 2, pp. 143–148, 1990.
- [75] J. Anné, B. Maldonado, J. Van Impe, L. Van Mellaert, and K. Bernaerts, "Recombinant protein production and streptomycetes," *J. Biotechnol.*, vol. 158, no. 4, pp. 159–167, 2012.
- [76] G. Gellissen and C. P. Hollenberg, "Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis*- a review," *Gene*, vol. 190, no. 1, pp. 87–97, 1997.
- [77] R. Verma, E. Boleti, and a J. George, "Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems," *J. Immunol. Methods*, vol. 216, no. 1–2, pp. 165–81, 1998.
- [78] M. Ahmad, M. Hirz, H. Pichler, and H. Schwab, "Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, no. 12, pp. 5301–5317, 2014.
- [79] P. Hsieh and P. W. Robbins, "Regulation of asparagine-linked oligosaccharide processing. Oligosaccharide processing in *Aedes albopictus* mosquito cells," *J Biol Chem*, vol. 259, no. 4, pp. 2375–2382, 1984.

- [80] K. Kuroda, C. Hauser, R. Rott, H. D. Klenk, and W. Doerfler, "Expression of the influenza virus haemagglutinin in insect cells by a baculovirus vector.," *EMBO J.*, vol. 5, no. 6, pp. 1359–65, 1986.
- [81] S. M. Teixeira, "Control of gene expression in Trypanosomatidae.," *Braz. J. Med. Biol. Res.*, vol. 31, pp. 1503–16, 1998.
- [82] C. E. Clayton, "Genetic manipulation of kinetoplastida," *Parasitol. Today*, vol. 15, no. 9, pp. 372–378, 1999.
- [83] M. a Ferguson, "The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites.," *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 352, no. 1359, pp. 1295–1302, 1997.
- [84] a J. Parodi, "N-glycosylation in trypanosomatid protozoa.," *Glycobiology*, vol. 3, no. 3, pp. 193–9, 1993.
- [85] A. C. La Flamme, F. S. Buckner, J. Swindle, J. Ajioka, and W. C. Van Voorhis, "Expression of mammalian cytokines by *Trypanosoma cruzi* indicates unique signal sequence requirements and processing," *Mol Biochem Parasitol*, vol. 75, no. 1, pp. 25–31, 1995.
- [86] W. W. Zhang, H. Charest, and G. Matlashewski, "The expression of biologically active human p53 in *Leishmania* cells: a novel eukaryotic system to produce recombinant proteins.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 23, no. 20, pp. 4073–4080, 1995.
- [87] J. F. Tobin, S. L. Reiner, F. Hatam, S. Zheng, C. L. Leptak, D. F. Wirth, and R. M. Locksley, "Transfected *Leishmania* expressing biologically active IFN-gamma.," *J. Immunol.*, vol. 150, no. 11, pp. 5059–5069, 1993.
- [88] R. Breitling, S. Klingner, N. Callewaert, R. Pietrucha, A. Geyer, G. Ehrlich, R. Hartung, A. Müller, R. Contreras, S. M. Beverley, and K. Alexandrov, "Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production," *Protein Expr. Purif.*, vol. 25, no. 2, pp. 209–218, 2002.
- [89] Wenyon DM., "Observations on the intestinal protozoa of three Egyptian lizards, with a note on a cell-invading fungus.," *Parasitology*, vol. 12, pp. 133–40, 1921.
- [90] E. Wirtz, S. Leal, C. Ochatt, and G. a M. Cross, "A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*," *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 99, no. 1, pp. 89–

101, 1999.

- [91] J. H. LeBowitz, H. Q. Smith, L. Rusche, and S. M. Beverley, "Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*," *Genes Dev.*, vol. 7, no. 6, pp. 996–1007, 1993.
- [92] S. Kushnir, K. Gase, R. Breitling, and K. Alexandrov, "Development of an inducible protein expression system based on the protozoan host *Leishmania tarentolae*," *Protein Expr Purif*, vol. 42, no. 1, pp. 37–46, 2005.
- [93] F. W. Studier and B. a Moffatt, "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.," *J. Mol. Biol.*, vol. 189, no. 1, pp. 113–130, 1986.
- [94] K. Dower and M. Rosbash, "T7 RNA polymerase-directed transcripts are processed in yeast and link 3' end formation to mRNA nuclear export," *RNA*, vol. 8, no. 5, pp. 686–697, 2002.
- [95] S. R. Thompson, K. D. Gulyas, and P. Sarnow, "Internal initiation in *Saccharomyces cerevisiae* mediated by an initiator tRNA/eIF2-independent internal ribosome entry site element.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 23, pp. 12972–7, 2001.
- [96] S. Biebinger, L. E. Wirtz, P. Lorenz, and C. Clayton, "Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*," *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 85, no. 1, pp. 99–112, 1997.
- [97] E. Wirtz, C. Hartmann, and C. Clayton, "Gene expression mediated by bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases in transgenic trypanosomes.," *Nucl.*, vol. 22, no. 19, pp. 3887–94, 1994.
- [98] S. Kushnir, I. C. Cirstea, L. Basiliya, N. Lupilova, R. Breitling, and K. Alexandrov, "Artificial linear episome-based protein expression system for protozoan *Leishmania tarentolae*," *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 176, no. 2, pp. 69–79, 2011.
- [99] V. C. L. C. Wilson and B. A. Southgate, "Lizard *Leishmania*. In: Lumsden W, Evans D, editors. *Biology of Kinetoplastida.*" *Acad. Press London New York*, pp. 241–68, 1979.
- [100] L. Simpson and G. Holzjr, "The Status of *Leishmania tarentolae* / *Trypanosoma*

- platydaetyli,” vol. 4, no. 4, pp. 115–118, 1988.
- [101] V. M. Taylor, D. L. Muñoz, D. L. Cedeño, I. D. Vélez, M. a. Jones, and S. M. Robledo, “Leishmania tarentolae: Utility as an in vitro model for screening of antileishmanial agents,” *Exp. Parasitol.*, vol. 126, pp. 471–475, 2010.
- [102] F. Raymond, S. Boisvert, G. Roy, J.-F. Ritt, D. Légaré, A. Isnard, M. Stanke, M. Olivier, M. J. Tremblay, B. Papadopoulou, M. Ouellette, and J. Corbeil, “Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 3, pp. 1131–47, 2012.
- [103] H. Azizi, K. Hassani, Y. Taslimi, H. S. Najafabadi, B. Papadopoulou, and S. Rafati, “Searching for virulence factors in the non-pathogenic parasite to humans *Leishmania tarentolae*.,” *Parasitology*, vol. 136, no. 7, pp. 723–735, 2009.
- [104] W. W. Zhang, H. Charest, E. Ghedin, and G. Matlashewski, “Identification and overexpression of the A2 amastigote-specific protein in *Leishmania donovani*,” *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 78, pp. 79–90, 1996.
- [105] W. W. Zhang and G. Matlashewski, “Characterization of the A2-A2rel gene cluster in *Leishmania donovani*: Involvement of A2 in visceralization during infection,” *Mol. Microbiol.*, vol. 39, no. 4, pp. 935–948, 2001.
- [106] W. W. Zhang, S. Mendez, A. Ghosh, P. Myler, A. Ivens, J. Clos, D. L. Sacks, and G. Matlashewski, “Comparison of the A2 gene locus in *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and its control over cutaneous infection,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 37, pp. 35508–35515, 2003.
- [107] A. Mizbani, Y. Taslimi, F. Zahedifard, T. Taheri, and S. Rafati, “Effect of A2 gene on infectivity of the nonpathogenic parasite *Leishmania tarentolae*.,” *Parasitol. Res.*, vol. 109, no. 3, pp. 793–9, 2011.
- [108] M. Breton, M. J. Tremblay, M. Ouellette, and B. Papadopoulou, “Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis.,” *Infect. Immun.*, vol. 73, no. 10, pp. 6372–82, 2005.
- [109] J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor laboratory press. 1989.

- [110] Jena Bioscience, “Manual LEXSInduce4 Expression Kit For inducible expression of recombinant proteins in *Leishmania tarentolae*,” Ifta Ag, vol. 4, 2015.
- [111] J. F. Tobin, A. Laban, and D. F. Wirth, “Homologous recombination in *Leishmania enriettii*,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, no. 3, pp. 864–8, 1991.
- [112] M. G. Chagas, “Expressão da proteína de envelope E do vírus da febre amarela em *Leishmania tarentolae*,” Fundação Oswaldo Cruz, 2013, Dissertação.
- [113] M. M. de Souza, “Expressão, purificação e caracterização do *Leishmania* RNA Virus 1-4 e da proteína U5-15k do *Trypanosoma brucei*,” USP, 2012, Tese.

## 10 – ANEXOS

### 10.1 – Anexo 1

Sequências completas das Lic-E-NTPDases 1 e 2, onde as regiões correspondentes às proteínas maduras estão destacadas na cor azul claro. O códon de iniciação está destacado em verde e o códon de parada em vermelho.

#### Sequência da E-NTPDase 1 de *L. infantum* (gi 146079011)

```
ATGAGTCGCGTCTTTGTTGCCTTCTTCGCTGCTGTGCTTTTCGTCGTCTTTCTCACCGCG  
TACGAAGTCGGCGTTGGCACCGCCAACCCGCTTCAGTCGCGGCACATGCAGCTCACGCAG  
AACGCAGTGAAGAAGAGTGAGGCAAATCTAGTGAACTGCCGCGAGGTCAACCGGGATTTA  
AAGAGCGGTGGTGGCGTCAATGCCGCACAGGCGATTGCGGAGATGAGGCGGCAGAGAGAG  
GAGCTGATGAACATCGTCGCGCTGGAGCGTGAGCGTGTAGTGTGGCGCGTAGTCTGCTG  
CAGGTTTGGCAGGATGAGCTAGCCAGCGACCTCAGTGTACTCTTCGGTGTGCGCGACCAC  
AACTTCACTGCGCGCATCCGGTCGTTGGAGGAAAAGCGGAAACATTTGGAGGGTTTGCAC  
TCGATGCTCAACACGACCCCGTTTGGTGCAGTGGAGCTGCGCCGAGCAGCGAAATCCGT  
GCACTGCAGGCGGCTCTCTTTCACGAGATGCGCGCCAGCAAGAAGAAAGCAGAAAACGGT  
GTGGCGAACGGCGAAGCGTGCACGAAGACTTCGGACAAGTACTCCGTCGTGTTTCGACATC  
GGCAGCACTGGAAATCGTGTCCATGTCTACAAGTACAGAGTGGCCCCGCCACGCATAACC  
GCTGCTGCGGCCGGCAGTGAGCTCAGCGACATCGACCTCGTCGAGGAGTTGTTTGAGCTA  
AATCACAAGCCCTTAGCGAGCTCGATAATCCGGTGCAGGATGCGCCGGAAGCCTTATGG  
GAGCTCTTCATGAAAGCCAAGTACTTTGTACCGGCGGAGCTGCACGCATGCACGGCAGTC  
GAGTTCAAGGCTACCGCGGGACTGCGCATGCTGGGGATGGAGAAGGCCACCGAAATCTT  
GACGGGATTTCGCGCGCTACCGCAACGAAACGTTCTGGTTGCGCGGCAATGCACCGGTT  
CGCATCTTGGATGCCTGCGAGGAGGGCCCAATGGCGTGGCTCACGGTAAACTACTTACTG  
GGGGTATTCTCCAGGGGTACAAAGGCAACCGCCTCGACGGTGGCCGTCATCGACCTCGGA  
GGCGGCTCCACGCAGATCGTCTTCGAACCCGGCGAGAGCGCGTTCCACGGGATGCGCACC  
GATTTGCGCTACTCGGCAACCTTGGGCAGCCGGTCTGTGAGTGCCTACCAACACAGCTAC  
GAAGGCTACGGCCTGCACGCGGCCACCAAGGAGCTGCTTTTCCACATTCAAGGCAAGAGC  
CAAGAGAAGCCGGGAGGCGGTACCACCACCAGCACAGCAACGACGACCACCACGACAACA  
CCGGCAAAACAGCGGCGACAAGGCTCTGTCTGTTTGGAACGTTCTGGGAAACCTGGGTGCA  
GACGGGAGCAGCGAGCGAGACGACATCGTCCACCAAGAGAGCGCCGCGGATGCCACCACCG  
CCACTGCCGGACGCGGAGGCGGTGGAGGCGTTCCCTGCTTCGCTGTGCGGTACGAAGAC  
CCGCTAGGGGTGAAGAACATCAAGAAAAACAATACCGGGAGCCGGCTATGCCCCCGAAC  
TTCCAGGCTTGC CGGAACCTTTTCCGCGATCGGCTGCTAAAGCCAGTGGGGCTGACATGT  
GAGGCGGCCAACTGCGGCATCGCTGGTGTGATGCAGCCACCGCTGACCAACTTCACCGGG  
GAAATCTACGTGTTTTCGTTCATCTTTGATCTGCTGGCCTTGGCGAACAGCTCCCTGGTG  
CCAGCGGGGGCTGCCGTGTCAAGGGAAAAGTTTGAGGTGAAGCTGCCGGACCTAGCGACG  
ATTGCGGAGGGTCACTGCGCCGCTTCTCCCTACCCGTATCGCCGAGGCGACCGCCAAG  
GAGGGCCTCGGTAGCCTGAAGCCGGAGTACGAGTGCATGTATTACTCCTACGTGTACGCG  
CTTCTCCGCTACGGGTACGAGGTGCCAGAGGATCGCGTGTGTCACGTGGTGAAGAAGATC  
CGCGGCTACGAGACCGCTGGTCCCTCGGCGCCTCACTCCTCTCTTACCTAA
```

## Sequência da E-NTPDase 2 de *L. infantum* (gi 134068433)

**ATG**CGACCGTACTCCTCGGTGCGGCGCATGACTCAACAGTCTGAAGCGACTGCGCATCGCC  
GGCACCCCTTGTGCTTAGCGCGCTTGTATCTTCGGTTTCCTCGTTTACTATCAAAGCCCT  
CTGCTCTCCCCATGTGACTCGGGCTACGCGAATGTATACGACGTCGTCATCGACGCCGGC  
AGCACTGGCTCACGTGTGCATGTGTTCCAATACGAGCGCGGGCCGCACCGGTCTCGTACTT  
CTGAGAGAGCGCTTCAAACGAGTAGAGCCGGGTCTATCCTCTTTTGCCACCGACCCAGAC  
GGCGCCAAGGAGTCGCTTGGCGGGCTGCTGCGCTTCGCGGATAAGGTGGTCCCACAAAGC  
TACCAGAAGTGCACCTTCGTACCCCTCAAGGCCACCGCCGGCCTTCGGCTCCTACCTGAG  
TCCGTCCAGCAGGTGCTGCTGGACGCTGCCAGCACACACTCAACGCATCTCCATTTTCAG  
TCTCGTGGTGCTCCATCATCTCTGGCGCTCAAGAGGGCGTCTACGGGTGGCTGACGGTG  
AACTACCTGCTGAACAGGCTCGACACGGACGTTGCCACCGTCGCGACCATCGACATGGGA  
GGTGCTCGACACAGGTGCTCTTCGAGACGACGCCACGCTCTGGAGAATGGCTGCCCTTC  
AACTATGCCACAGCTGCGCACACCAAAGCGCACGATCACCATGTATCAGCACAGCTAT  
CTCGGCCTTGGGATGAACGAGGCGAAGAAGAAGCTTATGATGTCATTCGCCGAAGCGAAC  
GGGACGTCGCTTTCCCGTGCTTCCGAGAGGGTATGCGAAGCGCCTGAACGATGTGGAA  
CTTCGAAACAGTGACGCCACGGACTTTGACGCGTGTGCAGGACTATTTTCGCGAACATGTC  
ATAACAAAGACGACCTGCAAGTTTGTATGCCTGTGGCGCCCGGGCGTCCCGCAGCCGCTG  
TTTCCGTCAAGGCGCATCTCATCTACGCTTCTCCTACTTTTACGACCGACTCTACCAC  
TTCAGCAAGGAGGGGAGCCCGGTCTACGCTCTCGTCTGTAAGGAGGTCGGGCAAGAGGTG  
TGCCACCGGAACTGCGAGGCGGACCACCGCCCTGAGGAAACGGCCTGCATGGAGCTG  
GCGTACATGTACAGCTTCTTGACATACGGCCTAGGGCTTAGTGACGCCACGGCTCTCAGC  
GTGCCAACCGCATCGAGGGTATGGCGGTTTCCTGGTCTCTTGGCTCCTCTCTCTCTTC  
CTGCTCAAGATGGAA**TGA**

## 10.2 – Anexo 2

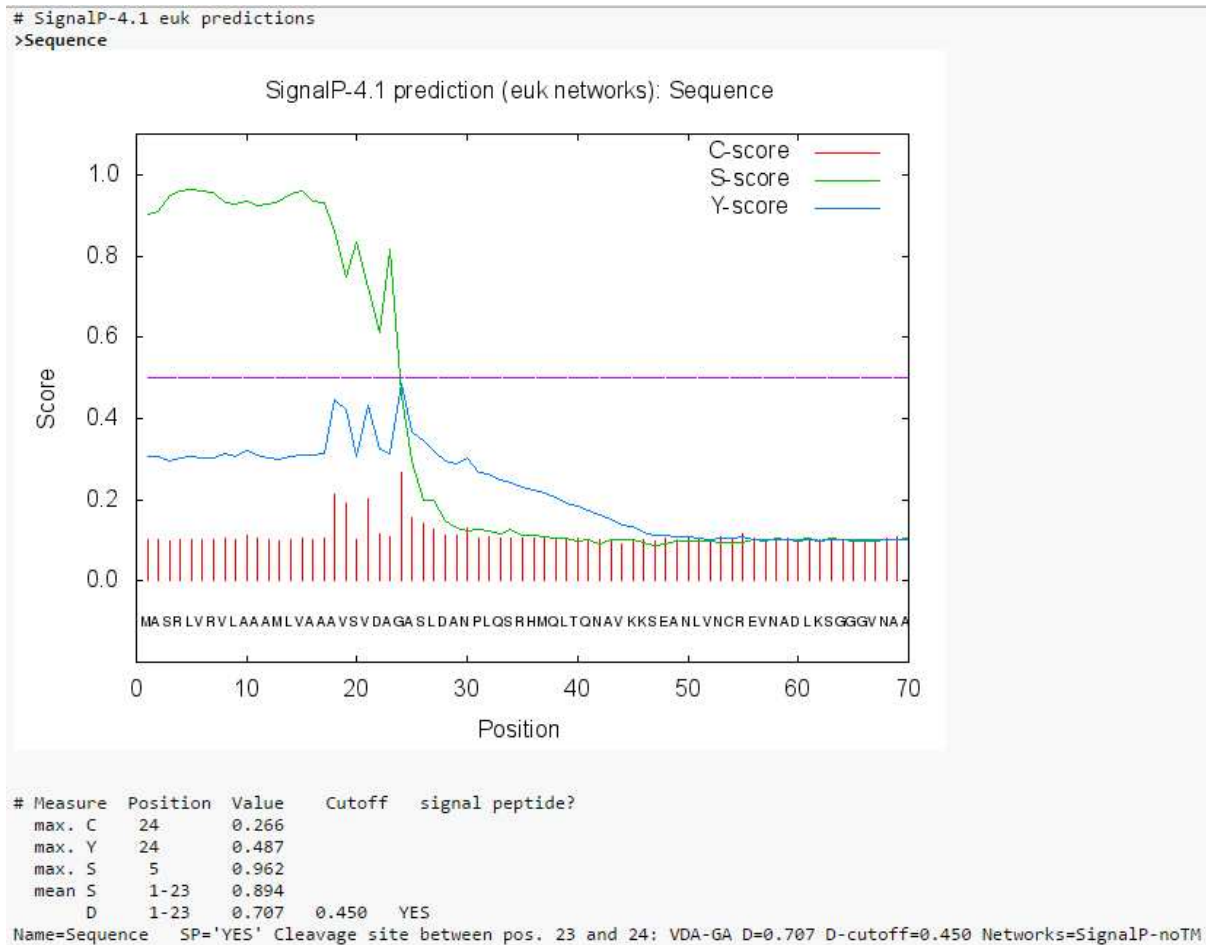
Tradução das sequências das Lic-E-NTPDases 1 e 2 clonadas em pLEXSY\_IE-blecherry4, com cálculo do ponto isoeletrico (pI) e massa molecular (Mw) teóricos e análise do sinal de clivagem com o uso dos softwares online disponíveis em <http://web.expasy.org>. As sequências referentes ao peptídeo sinal da fosfatase ácida secretada de *L. mexicana* (LMSAP) estão destacadas em laranja.

### Tradução da Lic-E-NTPDase 1 clonada em pLEXSY\_IE-blecherry4

MASRLVRVLAAMLVAAAVSV**DAGA**SLDANPLQSRHMQLTQNAVKKSEANLVNCREVNADLKSGGGVNAA  
QAIAEMRRQREELMNIVALERERVVSARSLLQVCEDELASDLSVLFVADHNFARIRSLLEKRKHLEGL  
HSMLNTPFGAVELRRSSEIRALQAALFHEMRASKKKAENGVANGEACTKTSKYSVVFDIGSTGNRVHV  
YKYRVAPATHTAAAAGSELSIDIDLVEELFELNKHKALSELDNPVQDAPEALWELFMKAKYFVPAELHACTA  
VEFKATAGLRMLGMEKATEILDGIRARYRNETFWLRGNAPVRILDACEEGPMAWLTVNYLLGVFSRGTKA  
TASTVAVIDLGGGSTQIVFEPGESAFHGMRTDLRYSATLGSRSVSAYQHSYEGYGLHAATKELLFHIQK  
SQEKPGGGTTTSTATTTTTTPANSGDKALSVWNLGNLGDGSSERDDIVTKRAPPMPPLPDAAEAVE  
AFPCFVAVGYEDPLGVKNIKKNTGEPAMPPNFQACANLFRDRLKPVGLTCEAANCGIAGVMQPPLTNFT  
GEIYVFSFIFDILLALANSSIVPAGAAVSREKFEVKLPDLATIAEGHCAAFSLTRIAEATAKEGLGSLKPE  
YECMYYSYVYALLRYYGYEVPEDRVLHVVKIRGYETAWSLGASLLSLLTKGTHHHHHH-

- pI/Mw teóricos: 6.26 / 74588.88

- Após remoção do peptídeo sinal, pI/Mw teóricos: 6.19 / 72192.98



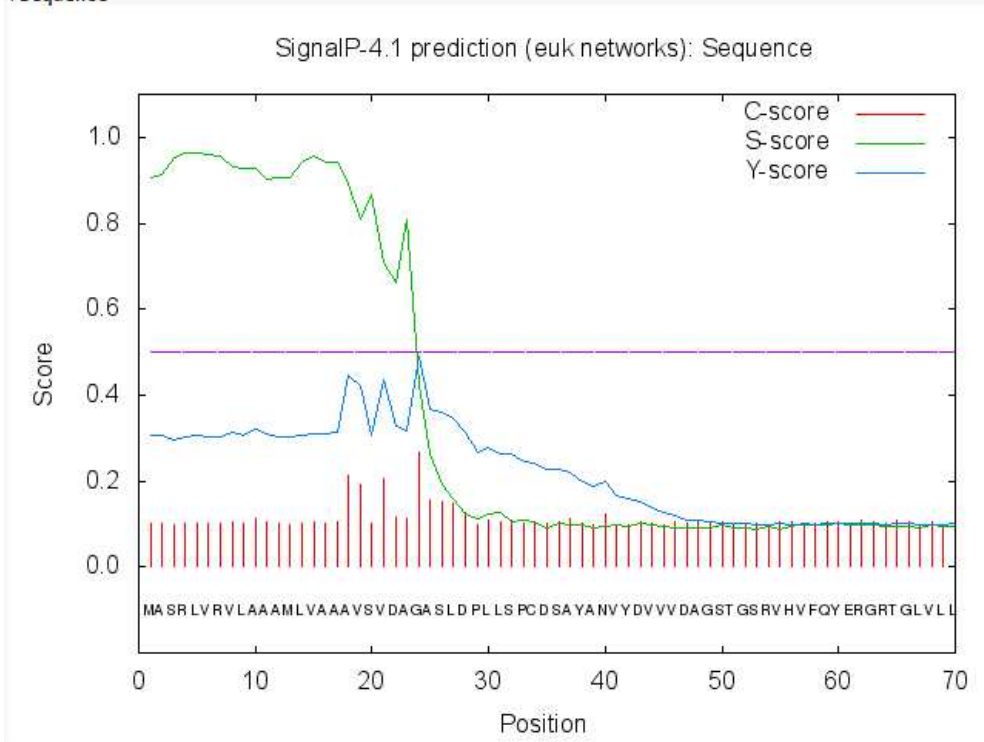
## Tradução da Lic-E-NTPDase 2 clonada em pLEXY IE-blecherry4

MASRLV RVLAAAMLVAAA VSV **DGA**SLDPLLSPCDSAYANVYDVVVDAGSTGSRVHV FQYERGR TGLVLL  
 RERFKRVEPGLSS FATDPDGAKESLAGLLRFADK VVPQSYQKCTFVTLKATAGL RLLPESVQQVLLDAAQ  
 HTLNASPFQSRGASII SGAQEGVYGWLT VNYLLNRLD TDVATVATIDMGGASTQVVFETTPTS GEWLPFN  
 YAHQLRTPKRTITMYQHSYLG LGMNEAKKLMMSFAEANGTSSFP CFPRGYAKRLNDVELRNS DATDFDA  
 CAGLFREHVI TKTTC KFDACGARGVPQPLFP SRRHLIYAFSYFYDRLYHFSKEGSPVYVSSYKEVGQEV C  
 HRESARRTTAPEETACMELAYMYSFLTYGLGLSDATA LTPNRIEGMAVSWSLGSSLSL SFLMKMEGTHHHH  
 HH-

- pI/Mw teóricos: 7.65 / 46381.74

- Após remoção do peptídeo sinal, pI/Mw teóricos: 7.21 / 43985.84

```
# SignalP-4.1 euk predictions
>Sequence
```



# Measure	Position	Value	Cutoff	signal peptide?
max. C	24	0.268		
max. Y	24	0.490		
max. S	5	0.963		
mean S	1-23	0.898		
D	1-23	0.710	0.450	YES

Name=Sequence SP='YES' Cleavage site between pos. 23 and 24: VDA-GA D=0.710 D-cutoff=0.450 Networks=SignalP-noTM

### 10.3 – Anexo 3

Alinhamento entre sequências gênicas das Lic-E-NTPDases 1 e 2 e suas correspondentes em *L. tarentolae*, realizados com as ferramentas online disponíveis no site <http://tritypdb.org/tritypdb/>.

Alinhamento das NTPDases 1 de *L. infantum* e *L. tarentolae*

```
> LtaP10.0140 | organism=Leishmania_tarentolae_Parrot-TarII |
product=Nucleoside
phosphatase, putative;nucleoside diphosphatase,
putative | location=LtaP10:64322-66478(+) | length=2157
| sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=2157
```

```
Score = 2078 bits (2304), Expect = 0.0
Identities = 1636/1959 (84%), Gaps = 21/1959 (1%)
Strand=Plus/Plus
```

```
Query 1 GCCAACCCGCTTCAGTCGCGGCACATGCAGCTCACGCAGAACGCAGTGAAGAAGAGTGAG 60
||||| ||||| ||||| | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 214 GCCAATCCGCACCAGTCCCTGCACACACAGCTCACGGAGAACGCTGTGAAGAACGGTGAG 273
Query 61 GCAAATCTAGTGAAGTCCGCGGAGGTCAACGCGGATTTAAAGAGCGGTGGTGGCGTCAAT 120
||| | || | ||||| ||||| | || ||||| ||||| || ||||| ||||| ||
```

Sbjct 274 GCACAGCTGGCGAACTGCCGCTATGTGAACGCGAATTTAAAGGGCAGTGGTGGCGTCGAT 333

Query 121 GCCGCACAGGCGATTGCGGAGATGAGGCGGCAGAGAGAGGAGCTGATGAACATCGTCGCG 180  
 |||||  
 Sbjct 334 GCCGCACAGGCGATGGCGGAGGTAAGGCGGCAGAGAGAGGAGCTGATGAGTATGCTCGAG 393

Query 181 CTGGAGCGTGAGCGTGTAGTGTGCGGCGGTAGTCTGCTGCAGGTTTTCGAGGATGAGCTA 240  
 |||||  
 Sbjct 394 CTGGAGCGTCAGCGTGTCTCCTCGGCGGTAGTCTGCTGCAGGCTTGTGAGGATGCACTA 453

Query 241 GCCAGCGACCTCAGTGTACTCTTCGGTGTGCGCCGACCACAACCTTCACTGCGCGCATCCGG 300  
 |||  
 Sbjct 454 GCGAAAGACCTTCGTCTTTCCTCCGGTGTGCGCCGACCACCACGTACCGAGCGTTCCTCGT 513

Query 301 TCGTTGGAGGAAAAGCGGAAACATTTGGAGGGTTTGCACCTCGATGCTCAACACGACCCCG 360  
 |||||  
 Sbjct 514 TTGCTAGAGGAGAAGCAGAGATCTCTGGAGGAGTGGCACACGATGCGCAGCGCGGGACCT 573

Query 361 TTTGGTGCAGTGGAGCTGCGCCGAGCAGCGAAATCCGTGCACTGCAGGCGGCTCTCTTT 420  
 ||  
 Sbjct 574 TTGCGTGCAGTGGAGTCCCGCCGAGCAGCGACATCCGCGCACTGCAGGCTGCTCTCTTT 633

Query 421 CACGAGATGCGCGCCAGCAAGAAGAAAGCAGAAAACGGTGTGGCGAACGGCGAAGCGTGC 480  
 |||||  
 Sbjct 634 CACGAGATGCGTGCCTACAAGAC---AGCAGACAACGATGTGGCGAAAGAGGAGACGTGT 690

Query 481 ACGAAGACTTCGGACAAGTACTCCGTCTGTTTCGACATCGGCAGCACTGGAAATCGTGTCT 540  
 |||||  
 Sbjct 691 GCGAAGTCTTCGGCCAAGTCTCCGTTGTATTTGATATCGGCAGCACCGGAAATCGTGTCT 750

Query 541 CATGTCTACAAGTACAGAGTGGCCCTGCCACGCATACCGCTGCTGCGGCCGGCAGTGGAG 600  
 |||||  
 Sbjct 751 CATGTCTATAAGTATAGAGTAACACCTCTCAGGCATATTGCTGCGCGGCTCGGTTTGAG 810

Query 601 CTCAGCGACATCGACCTCGTTCGAGGAGTTGTTTGGAGCTAAATCACAAAGCCCTTAGCGAG 660  
 |||||  
 Sbjct 811 CTCAGCGACCTGGACCTCGTGGAGGAGTTGTTTGGAGCTAAATCACAAAGCTCTCAGCGAA 870

Query 661 CTCGATAATCCGGTGCAGGATGCGCCGGAAGCCTTATGGGAGCTCTTCATGAAAGCCAAG 720  
 |||||  
 Sbjct 871 CTCGAGAATCCGGTGCAGGAGGCGCCAGACGCTTACGGGTATTGTTCTGAAAGCCAAG 930

Query 721 TACTTTGTACCGGCGGAGCTGCACGCATGCACGGCAGTCGAGTTCAAGGCTACCGCGGGA 780  
 |||||  
 Sbjct 931 AACTTTGTTCCGGCGGAGCTTACGCATGCACGCCAGTTGAATTCAAGGCCACTGCGGGG 990

Query 781 CTGCGCATGCTGGGGATGGAGAAGGCCACCGAAATTCCTGACGGGATTCGCGCGCGCTAC 840  
 |||||  
 Sbjct 991 CTGCGCATGTTGGGGGCTGAGAAAGCCACCGACATTCCTGCTGCGATTCGCGCACGCTAC 1050

Query 841 CGCAACGAAACGTTCTGGTTGCGCGGCAATGCACCGGTTTCGCATCTTGATGCCTGCGAG 900  
 |  
 Sbjct 1051 CTCAACGAGACGTTCTGGTTGTGCGGAAACTCGCCAGTCCGCATTTTAGATGCCCGCGAG 1110

Query 901 GAGGGCCCAATGGCGTGGCTCACGGTAAACTACTTACTGGGGGATTCTCCAGGGGTACA 960  
 |||||  
 Sbjct 1111 GAGGGCCCGATGGCGTGGCTGACGGTAAACTACTTGTGGGGCATTTTCCAGGAGCAGC 1170

Query 961 A---AGGCAACCGCCTCGACGGTGGCCGTCATCGACCTCGGAGGCGGCTCCACGCAGATC 1017  
 |  
 Sbjct 1171 ACGAAGGCGACCCACCTCGACAGTGGCCGTCATCGACCTCGGCGGCGGCTCCACGCAGATC 1230

```

Query 1018 GTCTTCGAACCCGGCGAGAGCGGTTCCACGGGATGCGCACCGATTTGCGCTACTCGGCA
1077
Sbjct 1231 GTCTTCGAACCCGGTGAGAGCGTGTCCGCGAAATGGGCACCGACTTCCGCTATTCGGCA
1290
Query 1078 ACCTTGGGCAGCCGGTCTGTGAGTGCCTACCAACACAGCTACGAAGGCTACGGCCTGCAC
1137
Sbjct 1291 ACCTTGGGCAGCCGGTCCGGTGAGAGCGTACCAGCACAGCTACGAAGGCTACGGCCTGCAC
1350
Query 1138 GCGGCCACCAAGGAGCTGCTTTTCCACATTC AAGGCAAGAGCCAAGAGAAGCCGGGAGGC
1197
Sbjct 1351 GCGGCTACCAAGGAGCTCCTTTTCCACATTC AAGGCAAGCGCCAGGAGAACC CGGGCGGC
1410
Query 1198 GGTACC---ACCACCAGCACAGCAACGACGACCACCACGACAACACCGGCAAACAGCGGC
1254
Sbjct 1411 GCTACCCCTACCACCTGCACAGCAACCAGGACCACCACGACGGCACCCGCAAGCAGCGAT
1470
Query 1255 GACAAGGCTCTGTCTGTTTGGAAACGTTCTGGGAAACCTGGGTGCAGACGGGAGCAGCGAG
1314
Sbjct 1471 GACAAGGCTCCGTCGGTTCGGGACCTTCTGGGAAACGTTGGCTGCAGATGCCGGTGACGCG
1530
Query 1315 CGAGACGACATCGTCACCAAGAGAGCGCCCGGATGCCACCACCGCCACTGCCGGACGCG
1374
Sbjct 1531 CGAGACGACATTGCCACGAAGAGTGTGCC-----ACCGCCTCAGCGGGATGCA
1578
Query 1375 GAGGCGGTGGAGGCGTCCCCTGCTTCGCTGTTCGGCTACGAAGACCCGCTAGGGGTGAAG
1434
Sbjct 1579 GAGGCGGTGGAGGCGTCCCCTGCTTTGCTGTTCGGCTACGAAGACCCGCTAGGGGTGAGG
1638
Query 1435 AACATCAAGAAAAACAATACCGGGGAGCCGGCTATGCCCCGAACTTCCAGGCTTGCGCG
1494
Sbjct 1639 AACATCAGGCGAAACAATGCCGAGGAGCCGGTTGTGCACCCAAGCTTCCAGAGTTGCATG
1698
Query 1495 AACCTTTTCCGCGATCGGCTGCTAAAGCCAGTGGGGCTGACATGTGAGGCGCCAACTGC
1554
Sbjct 1699 AACCTTTTCCGTGATCGGTTGCTGAAACCTGTGGGGCTGACATGTGAGGCGCCAACTGC
1758
Query 1555 GGCATCGCTGGTGTGCATGCAGCCACCGCTGACCAACTTACCAGGGGAAATCTACGTGTTT
1614
Sbjct 1759 GGCATCGCCGGCGTGCATGCAGCCGTCGCTGGCTAACTTCACTGGTGAAATCTATATGTTT
1818
Query 1615 TCGTTCATCTTTGATCTGCTGGCCTTGGCGAACAGCTCCCTGGTGCCAGCGGGGGCTGCC
1674
Sbjct 1819 TCATTCATTTTTGATCTGCTAAGCTTGGCGAACAGCTCACTAGTGCCAGCGGGGGCTGCC
1878
Query 1675 GTGTCAAGGGAAAAGTTT GAGGTGAAGCTGCCGGACCTAGCGACGATTGCGGAGGGTCAC
1734

```



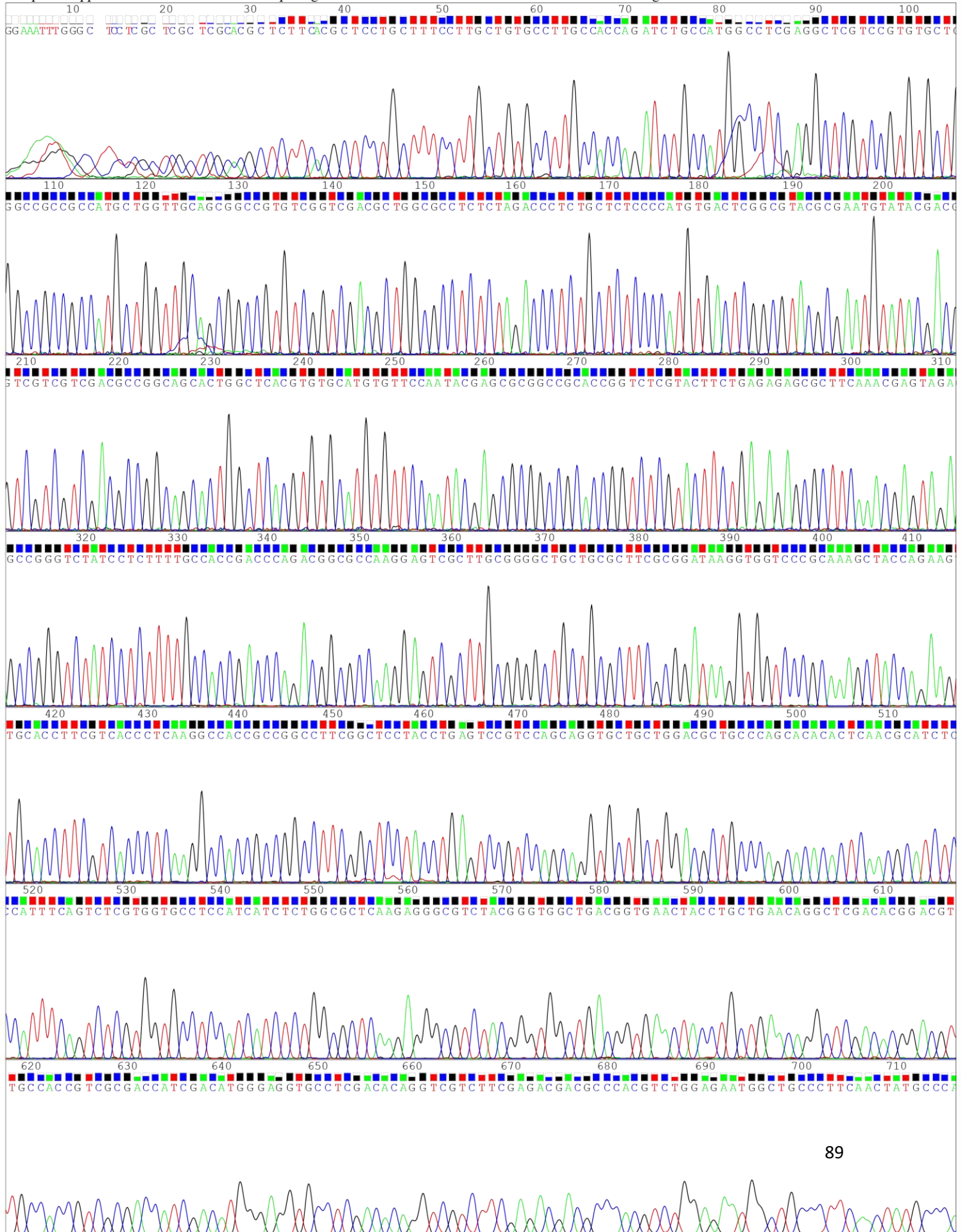


#### **10.4 – Anexo 4**

Cromatogramas das sequencias de nucleotídeos obtidas através do sequenciamento das construções das Lic-E-NTPDases 1 e 2 clonadas em pLEXXY\_IE-blecherry4. Foram utilizados os iniciadores diretos e reversos disponíveis no kit LESXY.

# Clone 6 – Iniciador Direto

File: Felipe6-F\_D05.ab1    Run Ended: May 12, 2015, 17:15:58    Signal G:526 A:218 T:277 C:388    Comment:  
Sample: Felipe6-F    Lane: 21    Base spacing 13.03    1162 bases in 15968 scans    Page 1 of 2



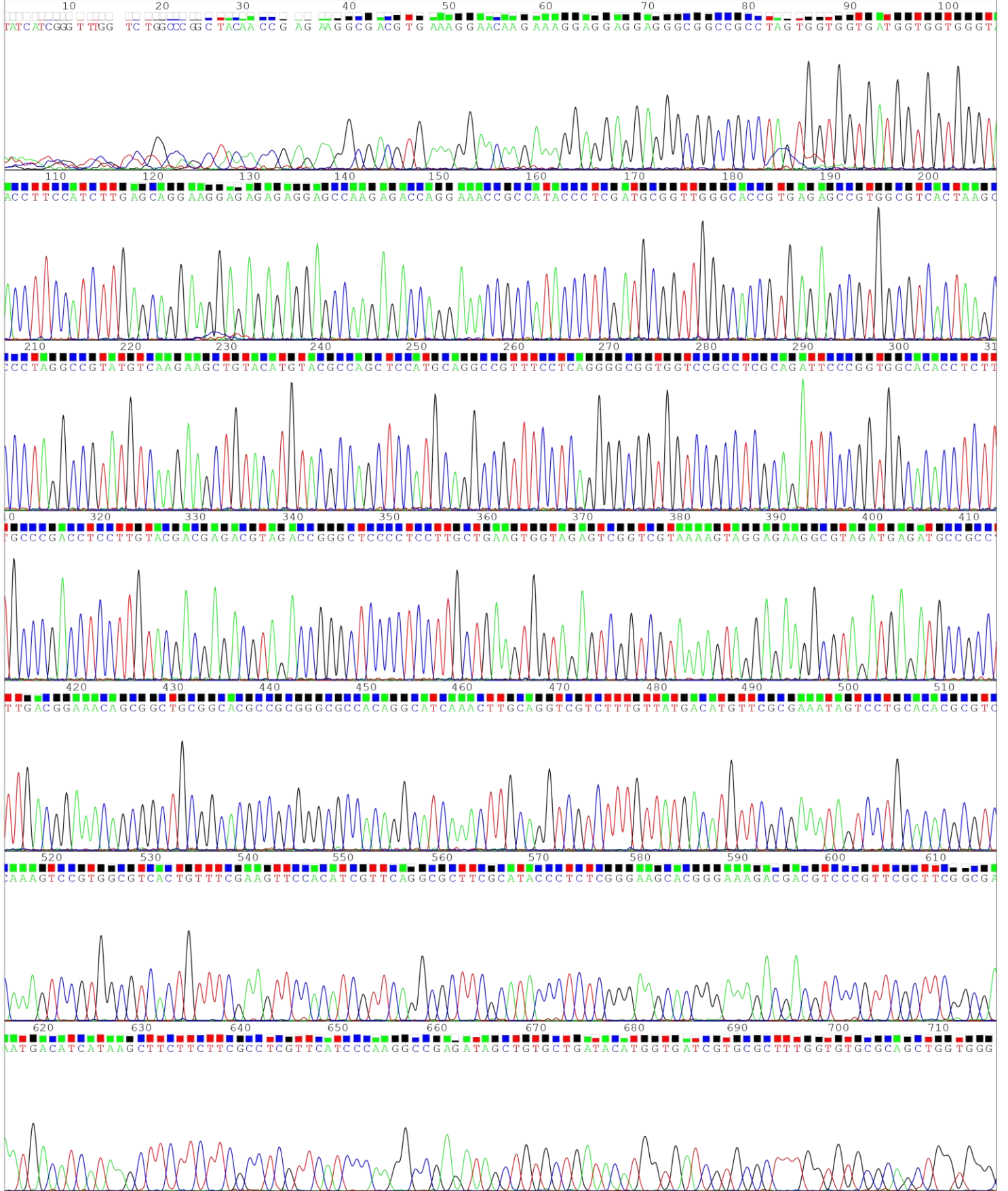
# Clone 6 – Iniciador Reverso

File: Flippe6-R\_E05.ab1  
Sample: Felipe6-R

Run Ended: May 12, 2015, 17:15:58  
Lane: 20 Base spacing 13.15

Signal G:402 A:189 T:188 C:241  
1159 bases in 16078 scans

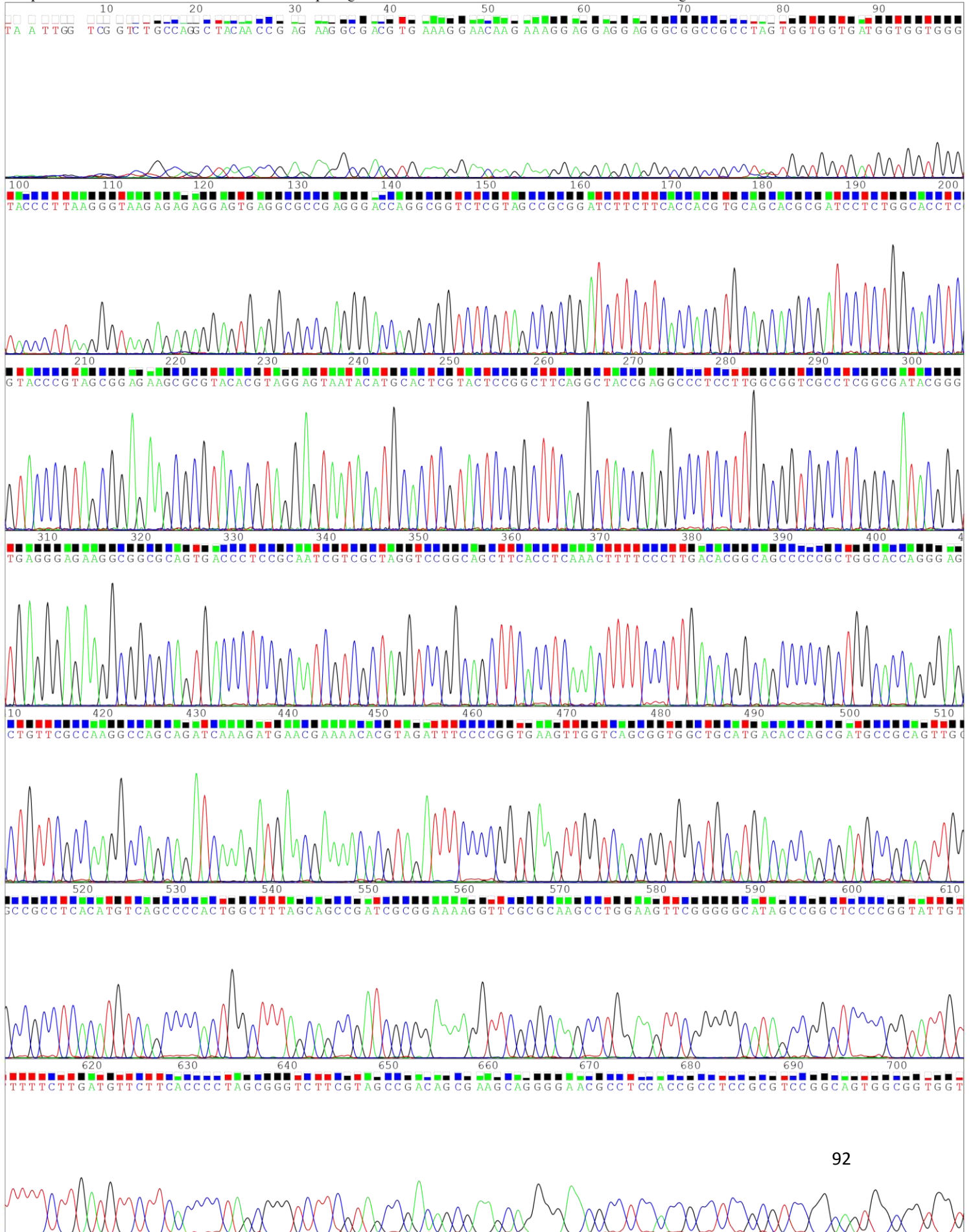
Comment:  
Page 1 of 2





# Clone 5 – Iniciador Reverso

File: Filipe-Clone5R\_F04.ab1    Run Ended: Oct 5, 2015, 13:48:18    Signal G:887 A:601 T:629 C:740    Comment:  
Sample: Matheus-Clone5R    Lane: 11    Base spacing 12.99    1131 bases in 15833 scans    Page 1 of 2



## **CAPÍTULO 2**

### **As interações entre Leishmania e macrófagos: o papel das E-NTPDases e da sinalização purinérgica**

## **The Leishmania-Macrophage Interactions: Role of E-NTPDases and Purinergic Signaling**

\*Filippe Gadiolli Pimentel<sup>1</sup>; \*Matheus Silva e Bastos<sup>1</sup>; \*Ramon de Freitas Santos<sup>1</sup>;  
Cristiane Mariotini-Moura<sup>1,2</sup>; Gustavo Costa Bressan<sup>1</sup>; Abelardo Silva-Júnior<sup>1</sup>; Márcia  
Rogéria de Almeida<sup>1</sup> and Juliana Lopes Rangel Fietto<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidade Federal de Viçosa,  
CEP 36570-900, Minas Gerais, Brazil.

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças  
Infecciosas- INBEQMeDI, Brazil.

\*These authors contributed equally to this paper.

E-mail addresses of all of the authors:

[fgadiolli@gmail.com](mailto:fgadiolli@gmail.com)

[matheusbasto@gmail.com](mailto:matheusbasto@gmail.com)

[ramondefreitas.santos@gmail.com](mailto:ramondefreitas.santos@gmail.com)

[chrismariotini@yahoo.com.br](mailto:chrismariotini@yahoo.com.br)

[raphael\\_biomed@yahoo.com.br](mailto:raphael_biomed@yahoo.com.br)

[gustavo.bressan@ufv.br](mailto:gustavo.bressan@ufv.br)

[abelardo.junior@ufv.br](mailto:abelardo.junior@ufv.br)

[marcia@ufv.br](mailto:marcia@ufv.br)

[jufietto@ufv.br](mailto:jufietto@ufv.br)

Correspondence: Juliana Lopes Rangel Fietto

E-mail: [jufietto@ufv.br](mailto:jufietto@ufv.br) and [jufietto@gmail.com](mailto:jufietto@gmail.com)

## 11 - Abstract

Leishmaniasis comprises a group of diseases caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*. The transmission occurs by the bite of phlebotomine female sand flies of the genera *Phlebotomus* and *Lutzomyia*. In the mammalian host, these parasites infect and proliferate mainly into the macrophages, avoiding the harmful effects of the innate inflammatory response. It has been reported in several works that purinergic signaling, including purine receptors P1 and P2, are dynamically modulated during both the development and activation of cells from the immune system to achieve homeostasis or combat infections as well as harmful damage. Many pathogens are able to subvert the host immune response in order to promote the success or maintenance of infection. This subversion can be related to the influence of pathogens on purinergic signaling leading to decreased levels of the pro-inflammatory molecule ATP and increased levels of the immunosuppressive molecule adenosine. This scenario can be produced as the final product of the joint activity of E-NTPDases and 5'-ecto-nucleotidases. Thus, this review will discuss the cellular and molecular events occurring during the interaction of *Leishmania* and macrophages focusing on the purinergic signaling pathways and their relationships with E-NTPDases from pathogenic species of *Leishmania*.

**Keywords:** Leishmaniasis, E-NTPDases, purinergic signaling, nucleotides, host-pathogen interaction

## 12 - Introduction

### 12.1 - Leishmaniasis, Leishmania infection and macrophage relationships.

Leishmaniasis are human diseases caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*. The three major clinical forms of the diseases have distinct clinical signs and symptoms and are comprised of the following: (i) cutaneous Leishmaniasis (CL), (ii) muco-cutaneous Leishmaniasis (ML; also known as espundia) and (iii) visceral Leishmaniasis (VL; also known as kala-azar). CL is characterized by the presence of long-term ulcerative skin lesions, which in most cases are self-healing. In CL, the patient generally presents with one or several ulcer(s) or nodule(s) on the skin. Different species of *Leishmania* can infect the macrophages in the dermis with variable clinical presentations and prognoses [1]. *Leishmania braziliensis* is responsible for most cases of ML.

VL is the most severe form in which the parasites leave the site of inoculation and proliferate in the liver, spleen and bone marrow, resulting in chronic infection, immunosuppression of the host and death if it left untreated [2]. VL is caused by the *Leishmania donovani* complex, which is *L. donovani* in East Africa and the Indian subcontinent, *Leishmania infantum* in Europe and North Africa and *Leishmania chagasi* in Latin America [3,4].

*Leishmania* parasites are well suited to initiate infection, resist the arsenal of defense molecules of innate immunity and achieve a long-term proliferative stage inside host cells. All species exhibit a pronounced tropism for macrophages, although they have the ability to infect a variety of other phagocytic and non-phagocytic mammalian cells [6,7,8,9]. Unlike most of intra-macrophage pathogens, the *Leishmania* proliferative stage dwells in mature phagolysosomes inside the host macrophages. *Leishmania's* ability to

evade the self-healing mechanisms of macrophages and their anti-parasitic functions is directly correlated with their ability to modulate several signaling pathways that regulate the defense responses in these host cells [10,11,12,13]. The outcomes of Leishmaniasis diseases are strongly dependent on the initial stages of infection and involve molecular interactions and cell signaling between macrophages and the parasite ([14,15,16] and for a complete review see [17]).

The infection of a mammalian host is initiated by the transmission of the parasite by the female sand flies from the genus *Lutzomyia* or the genus *Phlebotomus*. The bite of the sandfly induces a rapid neutrophil infiltration and substantial macrophage recruitment to the skin, regardless of the presence of parasites [7,8,20,21]. Then, the metacyclic promastigotes forms are phagocytosed by neutrophils, but they do not differentiate into amastigotes or undergo intracellular proliferation within neutrophils [7,22]. Although neutrophils are the predominant type of infected cell, at the initial stage of infection their population gradually decreases at the site of inoculation, followed by an increase in the frequency of infected macrophages [7]. In fact, neutrophils are phagocytic polymorphonuclear cells that have a very short life span and then spontaneously undergo apoptosis. The *Leishmania major* infection of polymorphonuclear neutrophils leads to a significant delay in the apoptotic cell death program, meaning the parasites do not multiply and remain as promastigote forms [23]. Additionally, the neutrophils secrete a high level of MIP-1 $\beta$  chemokine, which is known to attract macrophages to the site of infection [24,25]. When macrophages are recruited, they phagocytose apoptotic infected neutrophils and become definitive hosts for the amastigote replicative form of the parasite. *Leishmania* uses neutrophils as intermediate host cells and modulates their spontaneous apoptosis and ability to attract macrophages. These data indicated that *Leishmania* can use neutrophils as "Trojan horses" to silently enter macrophages [25].

Thus, the macrophage is an important host cell for establishing infection and the persistence of the parasite during *Leishmania* infection.

When macrophages are infected by *Leishmania* promastigotes, the parasites are recruited to a vacuolar compartment with characteristics of mature phagolysosomes, where they transform into non-motile amastigotes, which proliferate by binary cell division within the acidic and hydrolase-rich phagolysosomal compartment. The ability of these pathogens to target and replicate within the mature phagolysosomal compartment is remarkable. As macrophages respond to infection, tissue damage often occurs, contributing to the clinical manifestations of the various forms of Leishmaniasis [18,26].

The persistence of the parasite infection correlates with the parasite's ability to adapt to the hostile environment and counter the defenses of the host macrophage. Like other infectious agents, *Leishmania* species have evolved effective strategies to dodge the innate immune response during the early stages of infection, quickly modulating the signaling pathways of the host cell. Interestingly, several *Leishmania* molecules secreted or expressed on the surface of the parasite have been found to be involved in the inactivation of the key functions of the host macrophage, including the production of nitric oxide (NO), interleukin-12 (IL-12), tumoral necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and reactive oxygen species (ROS) [27]. In fact, many *Leishmania* molecules have been studied in-depth and have been described as potential virulence factors. For example, liposphoglycan (LPG), glycosylinositol phospholipids (GIPLs), proteophosphoglycans (PPGs), secreted acid phosphatases (SAPs) and cysteine protease B have been well-explored in this matter [28,29,30,31,32,33,34,35]. The GP63, a zinc-metalloprotease named glycoprotein 63 (GP63), is another critical virulence factor that has been fully explored [36,37,38,39,40]. However, the E-NTPDases (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases), while less-extensively studied, have been demonstrated and

believed to be important infectivity and virulence factors [41,42,43,44,45,46,47,48,49,50].

In the last few years, there has been accumulating evidence that the E-NTPDases can be potential virulence factors due to the relationship between ecto-nucleotidase activity and the ability of *Leishmania* to generate injury in mice. Moreover, these enzymes have the potential to regulate the concentrations of tri- and diphosphate nucleosides at the interaction of the microenvironment/pathogen, and by-products of nucleotide degradation, such as adenosine, can lead to indirect control of the immune response via purinergic signaling [51,52,53,54].

Therefore, this review will focus mainly on the description of some cellular and molecular events occurring during the pivotal multifaceted interaction of *Leishmania* and the macrophage. In particular, we will discuss the role of E-NTPDases and purinergic signaling pathways in the context of the modulation of regulatory mechanisms that support the inactivation of macrophage signaling pathways and their functions, allowing the *Leishmania* to dodge the harmful effects of the innate inflammatory response.

## **12.2 - Biochemical and Biological Roles of Ecto-nucleotidases and the E-NTPDases of *Leishmania*.**

Extracellular nucleotides have been described as messengers in many kinds of cells (muscular, neuronal, and immune). In the immune system, they participate in the mediation of pro-inflammatory responses, including lymphocyte proliferation, the production of reactive oxygen species (ROS), and the secretion of cytokines as well as chemokines [55].

In the extracellular environment, nucleotides (e.g., ATP, UTP, ADP, and NAD), nucleosides and their derivatives are released in a controlled manner by different cell

types to provide the initial responses of purinergic signaling [56]. The final components of regulatory purinergic signaling comprise the ecto-nucleotidases, and those hydrolyze extracellular nucleotides to generate other nucleotides and nucleosides (e.g., hydrolysis of ATP to ADP and ADP to AMP by E-NTPDases and hydrolysis of AMP to adenosine by 5'-ecto-nucleotidase, see Figure 1A). In this context, ecto-nucleotidases can turn off the signaling through the decrease in the concentration of a substrate that activates the purinergic receptor, or they can turn on the signaling if the product of their activity would be an activator of purinergic signaling [57,58]. Among the important enzymes of this family are the diphosphohydrolases from ecto-nucleoside triphosphate. The diphosphohydrolase family (E-NTPDases) [59] can be found on the cell surface, on the membranes of some organelles, dissolved in the cytosol or even secreted [60]. This family of proteins shares five conserved domains called "apyrase conserved regions" (ACRs), which are essential for their catalytic activity [57,61,62]. Briefly, E-NTPDases hydrolyze ATP to ADP and ADP to AMP, which can be hydrolyzed to adenosine by 5'-ecto-nucleotidase [63]. Eight different E-NTPDase genes encode members of the E-NTPDase protein family [64]. Four of the E-NTPDases are typical cell surface-located enzymes with an extracellularly facing catalytic site (E-NTPDase 1, 2, 3, and 8). E-NTPDases 5 and 6 exhibit intracellular localization and undergo secretion after heterologous expression. E-NTPDases 4 and 7 are entirely intracellularly located and face the lumen of cytoplasmic organelles [64]. The E-NTPDases have several roles in eukaryotic organisms [65,66,67,68,69,70]. Although rare in bacteria, *Legionella pneumophila* secrete E-NTPDases that act as virulence factors [71].

Many pathogens are able to subvert the host immune response by the production of adenosine that is the end product of the joint action of E-NTPDase and 5'-ecto-nucleotidase. This nucleoside modulates cell function via membrane receptors coupled to

G proteins (A1, A2A, A2B, A3) [72]. It is well appreciated that adenosine receptor expression is dynamically altered during both development and activation on the surfaces of macrophages and dendritic cells (DCs). The differential expression of adenosine receptors at various stages of inflammation is important for fine-tuning the responsiveness of adenosine receptors to maximize their ability to alter cell function in a way that generally leads to the restoration of homeostasis [73]. A summary of the general view of ecto-nucleotidases, ecto-nucleosides and mammalian immune system homeostasis control is shown in Figure 1. Additionally, E-NTPDases had been found in several protozoan parasites including the following: *Toxoplasma gondii* [74], *Trichomonas vaginalis* [75], *Trypanosoma cruzi* [42], *Leishmania amazonensis* [76], *Leishmania braziliensis* [77] and other organisms [48]. In Trypanosomatids, these enzymes are important components of the pathway of the salvation of purines [42] because these parasites are unable to perform de novo synthesis of purines [78]. In *Leishmania*, literature data suggest that E-NTPDases also participate in the establishment of infection [43,46] and in the development of clinical signs [44]. In these organisms, the following two E-NTPDases were identified: E-NTPDase-1 and E-NTPDase-2. The isoform called as E-NTPDase-1 (approximately 70 kDa) is also known as guanosine diphosphatase and is more similar to E-NTPDase-1 from *T. cruzi* that was described for the first time by our research group [42]. Unfortunately, the literature on this topic is not uniform and other research groups have named these proteins differently, e.g., E-NTPDase-2 (approximately 40 kDa) is also called as ATP-diphosphohydrolase or nucleoside diphosphatase [50]. In order to stimulate a uniformity in the parasite E-NTPDase nomenclature, we have performed phylogenetic and bioinformatic analyses and proposed the following uniform nomenclature: TpNTPDase-1 and TpNTPDase-2 (Tp =

trypanosomatids NTPDases; isoform 1 is approximately 70 kDa and isoform 2 is 40 kDa) [48].

There are many studies concerning ecto-nucleotidases and E-NTPDases in different species of *Leishmania*, and a general concept is that the higher the activity/expression of ecto-nucleotidases, in particular E-NTPDases, the higher the infection and virulence of the *Leishmania* strain or species. Below we will present the state of progress in this field and more deeply discuss the data involving macrophages.

The first group to study ecto-nucleotidases on the surface of *Leishmania* was the Meyer-Fernandes research group, who showed for the first time the presence of Mg-dependent ecto-ATPases in live promastigotes of *Leishmania tropica* [79]. Then, the same group demonstrated the presence of an Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence [80]. They showed for the first time that virulent *Leishmania amazonensis* presented higher ecto-ATPase activity than the avirulent promastigotes. In 2006, Pinheiro and co-workers demonstrated that the surface E-NTPDase from *L. amazonensis* is a protein from the CD39 family and that this enzyme may play a role in the purine salvage pathway [76]. Furthermore, they showed higher expression and activity in amastigote than in promastigote forms and that adenosine down-regulated the expression of this enzyme. Additionally, they showed that adenosine and anti-E-NTPDase antibodies decreased the adhesion of promastigotes to mouse peritoneal macrophages [76].

There is clear evidence of the presence of E-NTPDases on the *Leishmania* surface, and the known main roles of nucleotides in the immune system stimulated other researchers to investigate E-NTPDases in *Leishmania* too. In 2004, Maioli and co-workers showed that *L. amazonensis* had a higher AMPase activity than *L. braziliensis* and that these data had a positive correlation with mouse immunosuppression. They observed lower levels

of IFN- $\gamma$  and TNF- $\beta$  in lymph node cells caused by *L. amazonensis* and hypothesized that this event may be through adenosine, a known immunomodulator molecule produced by the conjunct action of E-NTPDase and 5'-ecto-nucleotidase (5'-NT or CD73) observed in live and intact parasites [43]. Then, in 2008 Marques-da-Silva studied the influence of extracellular nucleotides and adenosine on *Leishmania* infection in a murine model susceptible to infection by *L. amazonensis* but resistant to infections by *L. braziliensis* and *L. major*. This work described that the more virulent parasite (*L. amazonensis*) hydrolyzed higher amounts of ATP, ADP and AMP and that this result correlated with higher expression of E-NTPDase-2 on the *L. amazonensis* membrane [46]. Furthermore they have shown that the presence of adenosine or higher ecto-AMPase activity by 5'-NT on the parasite led to an increase in lesion size, parasitism and a delay in lesion healing. On the other hand, inhibition of a specific adenosine receptor (A2B) resulted in a decrease in lesion size. These data suggested that higher ecto-ATPase conjugated with higher ecto-AMPase activity on the *Leishmania* surface could convert the pro-inflammatory ATP molecule to the immunomodulatory adenosine molecule that may influence the establishment of *Leishmania* infection [46].

De Souza and co-workers investigated the relationship between ecto-nucleotidase activities and *L. amazonensis* infection more deeply. They have shown that higher ecto-nucleotidase activity in parasites from short-term culture positively correlates with higher lesions in mice models and higher infection rates in macrophages [45]. On the other hand, lower ecto-nucleotidase activity in parasites from long-term cultures led to the development of smaller lesions and higher levels of IFN- $\gamma$  production in lymph node cells from infected mice than the short-term culture parasites. In addition, infection with the long-term parasites expressed higher amounts of CXCL10 mRNA, which might activate macrophage cells to kill the parasites. This paper reinforced the evidence that the enzymes

involved in the metabolism of extracellular nucleotides positively influence the adhesion to target cells and modulate the host cell chemokine production [45]. Recently, Gomes et al. demonstrated the role of E-NTPDase2 from *L. amazonensis* in macrophage infection. This paper shows that in *Leishmania amazonensis*, the pathogenic agent of diffuse Leishmaniasis, the high activity of E-NTPDase-2 at the surface of the parasites, increased the survival rate in LPS/IFN- $\gamma$ -activated cells [49]. On the other hand, the inhibition of surface E-NTPDase2 led to a lower survival rate and higher macrophage activation. The inhibition of this enzyme activity resulted in decreased parasite survival in activated J774 macrophages, which was associated with increased production of NO and inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-12). The authors also demonstrated that the ecto-nucleotidase activity in *L. amazonensis* is also related to the inhibition of the inflammatory profile of macrophages. Therefore, the expression of E-NTPDase at the parasite surface plays an important role in the modulation and infection of macrophages [49].

Another group of researchers demonstrated that *L. amazonensis* resistant to vinblastine (a cell division inhibitor) showed an increase in the Mg<sup>2+</sup>-dependent ecto-ATPase activity and an increase in the severity of disease in infected mice [81].

Based on the importance of E-NTPDases in *L. amazonensis* infection and on the evidence of the presence of the same two orthologous E-NTPDase1 and 2 in *L. infantum*, a study published by our group in 2013 investigated the use of recombinant E-NTPDase2 from *L. infantum* (Lic-E-NTPDase2) as an antigen in the diagnosis of canine visceral Leishmaniasis (CVL) by an ELISA assay. In this work, anti-E-NTPDase2 antibodies were detected in 100% of the dogs with CVL from an endemic region of Brazil, regardless of the stage of the disease (asymptomatic, oligosymptomatic or polysymptomatic) [50]. This work has shown the expression of E-NTPDase2 on this parasite and highlighted its antigenicity. Next, our group studied the ecto-nucleotidase activity of recombinant Lic-

E-NTPDase2, its expression on promastigotes and its possible roles in macrophage infection. We demonstrated that this enzyme is a genuine nucleotidase from the CD39 family, and its hydrolytic capability to use tri- and diphosphate nucleosides (ATP, ADP, GTP, GDP, UTP and UDP but not AMP) depends on divalent cations ( $Mg^{2+}$  or  $Ca^{2+}$ ) and on the use of known partial inhibitors from the CD39 family. The nucleotidase activity of this recombinant protein was similar to that of live promastigotes. In addition, we showed the expression of E-NTPDases on the surfaces of these cells. The role of Lic-E-NTPDase2 during *Leishmania infantum chagasi* adhesion and infection of macrophages was also investigated, and the results suggest that this protein participates as a facilitator of adhesion and infection. These roles were indicated because when we used the recombinant protein as a competitor or the anti-E-NTPDase2 antibody in adhesion and infection assays, we observed significant decreases in the adhesion and macrophage infection indices. However, the proliferation of the parasite inside macrophages was not affected. These results suggested the existence of a possible binding site (like an unknown receptor) for the Lic-E-NTPDase2 in macrophages that could participate in facilitating adhesion and infection [48]. These data are in accordance with previous results also observed in *Trypanosoma cruzi* [47].

In 2011, Maia et. al. demonstrated the occurrence of another conserved domain, which differs from the characteristic conserved domains (ACRs) of the ATP diphosphohydrolase family, as a functional region in ATP diphosphohydrolase isoforms of *Schistosoma mansoni* and *L. (V.) braziliensis*. In addition, there was associated antigenicity of this domain in Schistosomiasis and Leishmaniasis. The r-Domain B shares an identity with the conserved domain r78–117 within potato apyrase and has demonstrated immunostimulatory properties by activating humoral immune responses in healthy BALB/c mice as well as increasing the production of IgG2a and IgG1 subtypes.

Along with the other results demonstrated, the authors suggested that for the human immune system, the conserved domain B (with high similarity to the domain B of potato apyrase) within either *S. mansoni* SmATPDase2 (r156–195) or *L. braziliensis* NDPase (r83–122) is rich in B-cell epitopes [82]. In another work, this same group reported an antigenic and catalytically active E-NTPDase1 isoform of approximately 50 kDa from *L. infantum* promastigotes. In the tests performed, the E-NTPDase activity was not affected by inhibitors of adenylate kinase and ATPases, and an antigenic conserved domain (r82–121) rich in B cell epitopes was identified [83]. As can be seen, *L. amazonensis* was the main investigated species in this field. All of the published papers agree that when the ecto-nucleotidase (ATPDase, ADPDase and AMPase) is higher, the infection and virulence are higher too. In addition, the roles of E-NTPDase as a facilitator of adhesion and infection of macrophages were indicated based on when the nucleotidase activity of E-NTPDase seems to be inactive. In this manner, we believe that E-NTPDases could bind to specific receptors on target host cells (like macrophages) and directly influence their adhesion or modulate the host purinergic signaling inhibiting the ATP and ADP signalizations and promoting the adenosine signaling. In this last role, the result of purinergic signaling may be dependent on the global ecto-nucleotidase capability of E-NTPDases and 5'-NT from the parasite and may be influenced by the host purinergic system as well (see Figure 1).

In this context, in the next section we will discuss the purinergic signaling in the context of *Leishmania* infection.

### **12.3 - Purinergic signaling in the immune system in the context of Leishmania infection and macrophages**

Purinergic signaling is present in many organisms as an important communication mechanism between the cells and the extracellular medium or cell to cell. Although we do not know the purine receptors involved in this signaling in all organisms, including in bacteria and protozoa, there are many studies concerning the purinergic signaling in mammals. The known purine receptors are cell membrane-anchored proteins that recognize purines and pyrimidines, which bind to the receptor triggering a series of reactions that can change cell behavior. These purine receptors are divided into two types, the P1 and the P2 receptors [87]. The P1-type receptors are divided into A1, A2a, A2b and A3, all of which are activated by adenosine. These receptors are serpentine type receptors coupled to G protein (GPCR) in the cytosolic portion acting in the activation or inhibition of adenylyl cyclase [87,88]. The P2-type receptors are subdivided into the following two major groups: P2X and P2Y. The P2X channel-type receptors (P2X<sub>1-7</sub>) are activated by ATP and allow the flux of cations across the membrane as a non-selective ion channel. They are activated by different ATP concentrations depending on the subtype. The P2Y receptors (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> and P2Y<sub>11-14</sub>) are GPCR [87,88,89,90]. The P2Y receptors may be activated by ATP, ADP, UTP, UDP, ITP and nucleotides bound to sugars [88].

The P1 and P2 receptors are expressed in several types of immune cells, such as neutrophils, monocytes, macrophages, lymphocytes, natural "killer" cells and dendritic cells. However, it is important to note that the variability of the population and expression of receptors in each cell type is crucial to determine the physiological response for each stimulus [87,88,94,97,98,99,100,101,102,103,104].

Previous studies demonstrated the effect of activation of these receptors in immune cells and their importance in the modulation of the response through the control of cytokine

release. For example, it was demonstrated that the P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>12</sub> receptors as well as the P1A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub> and A<sub>3</sub> receptors are important in the mechanism of macrophage chemotaxis induced by a C5a gradient that is dependent on ATP signaling [95]. In this work, the addition of potato apyrase (an E-NTPDase with high ATPase and ADPase activities) led to a decrease in chemotaxis because the potato apyrase removed extracellular nucleotides released after the stimulation [95]. In addition, the authors observed a decrease in cytokine release [95]. A similar result was observed when the authors used a cocktail of purinergic receptor inhibitors including MRS-2179 (P2Y<sub>1</sub>), AR-C69931MX (P2Y<sub>12</sub>), NF449 (P2X<sub>1</sub> and P2X<sub>4</sub>) and the non-selective inhibitor for the P1 receptor 8-(p-sulphophenyl) theophylline in macrophages with deletion for P2Y<sub>2</sub>. Interesting, P2Y<sub>12</sub> and P1 inhibitors are enough to disorient a macrophage P2Y<sub>2</sub>-deleted cell in a chemotactic gradient [95]. In another study using human neutrophils, it was shown that the polarized release of ATP led to the activation of P1A<sub>3</sub> and P2Y<sub>2</sub> receptors. These effects are related to the amplification of the signal that controls the cell orientation. In this study, authors showed that neutrophil chemotaxis changed when extracellular nucleotides were hydrolyzed by apyrase. Another effect observed was the reduction in the formation of superoxide [105]. Furthermore, activation or inhibition of P2 receptors on monocytes can cause effects in other cells, such as changes in neutrophil migration. In this context, it was shown that macrophages stimulated by lipopolysaccharides (LPS) were capable of releasing IL-8 that stimulates the migration of neutrophils. In addition, the secretion of IL-8 is dependent on cell stimulation by LPS, which in its turn leads to nucleotide release activating P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>6</sub> receptors. Moreover, a decrease in IL-8 release was shown when P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>6</sub> receptors were inhibited or knocked down. Similar results were obtained when potato apyrase was added during stimulation with LPS [94,106].

In another study using mouse macrophages, it has been shown that the activation of the P2X<sub>7</sub> receptor is regulated by E-NTPDase-1 on the cell surface. In experiments for the induction of apoptosis by extracellular ATP, it was found that normal cells have a much lower mortality rate than the E-NTPDase-1 gene knocked out cells. This suggests that E-NTPDase-1 acts as a regulator of P2X<sub>7</sub> activation and blocks sudden apoptosis [107]. Taken together, those data indicate that the purine receptors play important roles in immune system cells and that ecto-nucleotides and ecto-nucleotidases are closely related with purinergic signaling (a summary of the data is presented in Figure 1).

Thus, it is important to emphasize that E-NTPDases (synonym apyrase) can act in the regulation of purinergic signaling and that this activity is related with self-purinergic signaling control. This control could be by an ecto-nucleotidase from the same organism (e.g., E-NTPDase1 from the CD39 protein family) or by non-self-purinergic signaling control if the ecto-nucleotidase is from a distinct organism. Thus, we can imagine that the expression/activity of E-NTPDase on the surface of parasites or secreted by them can influence the host purinergic signaling, simulating the regulatory effect of the host cell enzymes but in this case favoring infection. In fact, several studies support this mechanism. For example there are many papers describing that the activation of P2X<sub>7</sub> is required for the activation of cells from the host immune system and elimination of infection. P2X<sub>7</sub> activation is one important regulatory mechanism to start specific immune response against intracellular pathogens [102,103,108,109,110]. This receptor also acts in the control of apoptosis in monocytes and macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*, and this is an important pathway through which cells can eliminate intracellular infection as well. In this manner, it was demonstrated that the P2X<sub>7</sub> expression is increased when monocytes are infected by *M. tuberculosis* and that apoptosis induced by ATP is also increased. In addition, the apoptosis induced by ATP

decreased when the P2X<sub>7</sub> receptor was inhibited in infected cells [102]. Similar results were observed in cardiac mast cells infected by *T. cruzi*. In this study, infected cells showed increased expression of P2X<sub>7</sub>, and the parasite regulated the activation of this receptor. However, the specific mechanism of this regulation was not clear [111]. Studies with *T. gondii* showed that the P2X<sub>7</sub> receptor was also important for the elimination of infection [112]. This paper has shown that infected macrophages were capable of eliminating the parasite when they were stimulated with ATP. In Schistosomiasis, a chronic inflammatory disease caused by the extracellular parasite *S. mansoni*, peritoneal macrophages from infected mice had less sensitivity to ATP than cells from uninfected animals. Despite that *S. mansoni* infection did not increase the global expression of P2X<sub>7</sub>, the authors observed a significant decrease in the P2X<sub>7</sub> population on the membrane surfaces of cells from infected mice [113]. In human erythrocytes infected by *Plasmodium falciparum*, another work showed evidence that P2Y<sub>1</sub> participates in cellular permeabilization. In this manner, infected cells were more sensitive to permeabilization induced by ATP than uninfected cells, and P2Y<sub>1</sub> deficient cells showed lower levels of permeabilization than wild-type cells [92].

As noted for the pathogens described above, there are many papers that studied purinergic signaling in *Leishmania* infection. Most of these works studied infection in *L. amazonensis*, the causative agent of diffuse Leishmaniasis that is known to lead to non-ulcerative metastatic lesions related to an immunomodulatory action of the parasite in relation to the host [109,114,115,116,117]. The literature has shown increased expression of P2X<sub>7</sub>, P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>4</sub> receptors in infected macrophages in comparison to uninfected cells. In addition, the activation of these receptors was important for the elimination of the parasite, and infected cells were more sensitive to apoptosis induced by UTP or ATP [109,116]. Interesting data concerning the P2X<sub>7</sub> receptor showed that macrophages

infected with *L. amazonensis* and uninfected macrophages have altered selectivity for ion flux [116]. One recent work more deeply elucidated the mechanism of action of the P2X<sub>7</sub> receptor in the elimination of *L. amazonensis*. They observed that P2X<sub>7</sub> activation is necessary for the formation and release of leukotriene B<sub>4</sub> that in turn binds to the leukotriene B<sub>4</sub> receptor and assists in parasite elimination pathways. When the P2X<sub>7</sub> receptor was blocked, it was observed that ATP did not elicit the expected response in infected macrophages, and when the leukotriene B<sub>4</sub> receptor was blocked, a reduction in the effect of ATP on the infected cell was observed because the leukotriene B<sub>4</sub> released could not bind to its receptor [114]. We can conclude that P2X<sub>7</sub> is very important for the activation of immune cells, mainly in macrophages, and the elimination of parasites, including *Leishmania*, but this receptor is not the only one involved in infection.

It has already been demonstrated that P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>4</sub> can also participate in *L. amazonensis* elimination [109,116]. In fact, parasites can modulate the activation of purinergic receptors, including macrophage receptors, but it is still necessary to understand more details about how the parasite modulates these receptors, and it is necessary to expand the studies to other purinergic receptors.

The P2X<sub>7</sub> receptor is the most studied receptor concerning its relationship with *Leishmania* infection, but we still need more details to better elucidate the relationship between purinergic signaling and *Leishmania* infection including the following details: the specific receptors involved in infections by different *Leishmania* species; and the commonly activated receptors. It is also important to understand the signaling cascade involved and the biological outcomes. We believe that many receptors and pathways could be activated at the same time, and this can make research in this field difficult. The expansion of knowledge in these fields will certainly contribute molecular details that can

be applied in the future development of better and new drugs to treat Leishmaniasis or other types of intervention to control these diseases.

The figure below proposes a hypothetical signaling pathway that occurs during the interaction of Leishmania and macrophages.

### **13 - Conclusion and future perspectives**

Currently, there are 12 million people infected with Leishmania and every year there are 2 million new cases reported. However, there are not effective vaccines, and the parasites are increasing their resistance to the few drugs available. The Leishmaniasis are prevalent in 98 countries in Asia, Africa, Central and South America and some European countries, with at least 20 pathogenic species of Leishmania. Additionally, most drugs have several side effects increasing the difficulty of treatment. In general, the variation in drug sensitivity and the specific way that each species interacts with the host often translates into limitations in the drug choice.

The advancement in understanding the immune responses directed by the host towards the infection and how the parasites can interfere with these mechanisms will assist in efforts to minimize the symptoms of this disease. Similarly, the expansion of the knowledge of the functions of macrophages and Leishmania survival strategies will aid in making accurate decisions and increased efforts to develop drugs and vaccines.

Several studies cited here demonstrate the importance of the activation of purine receptors in host cells in order to have an effective response against the parasite. P2X<sub>7</sub> is the receptor that we have the most details about until now, but more research is needed to better illustrate what receptors are involved and the specific role of each receptor [102,107,108,109,110,112,113,114,118,119,120,121,122]. As for the parasites, there have also been several studies demonstrating the importance of ecto-nucleotidases for the

virulence mechanism. There is a direct relationship between the ability to hydrolyze nucleotides and the ability to sustain infection [41,44,45,46,49,76,80,123,124,125,126]. It has also been shown recently that the E-NTPDase of parasites can act as an adhesion protein during the early stages of infection [47,48,127]. Inhibiting Leishmania molecules that actively modulate the macrophage signaling pathways is essential to prevent the intracellular survival of Leishmania. Thus, the demonstrated waterways are a good field to search for the development of new drugs.

### **Conflict of interest statement**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **Acknowledgments**

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

## 14 - References

1. Arevalo J, Ramirez L, Adui V, Zimic M, Tulliano G, et al. (2007) Influence of *Leishmania* (*Viannia*) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Infect Dis* 195: 1846-1851.
2. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, et al. (2007) Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 5: 873-882.
3. Lukes J, Mauricio IL, Schonian G, Dujardin JC, Soteriadou K, et al. (2007) Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 9375-9380.
4. Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA (2000) The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 16: 188-189.
5. Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J (2004) Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 57: 1-88.
6. Hsiao CH, Ueno N, Shao JQ, Schroeder KR, Moore KC, et al. (2011) The effects of macrophage source on the mechanism of phagocytosis and intracellular survival of *Leishmania*. *Microbes Infect* 13: 1033-1044.
7. Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, et al. (2008) In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321: 970-974.
8. Peters NC, Sacks DL (2009) The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol* 11: 1290-1296.
9. Ng LG, Hsu A, Mandell MA, Roediger B, Hoeller C, et al. (2008) Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. *PLoS Pathog* 4: e1000222.

10. Lima-Junior DS, Costa DL, Carregaro V, Cunha LD, Silva AL, et al. (2013) Inflammasome-derived IL-1 $\beta$  production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. *Nat Med* 19: 909-915.
11. Liu D, Uzonna JE (2012) The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol* 2: 83.
12. Lapara NJ, 3rd, Kelly BL (2010) Suppression of LPS-induced inflammatory responses in macrophages infected with *Leishmania*. *J Inflamm (Lond)* 7: 8.
13. Rogers M, Kropf P, Choi BS, Dillon R, Podinovskaia M, et al. (2009) Proteophosphoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. *PLoS Pathog* 5: e1000555.
14. Sehgal G, Zhang K, Todd RF, 3rd, Boxer LA, Petty HR (1993) Lectin-like inhibition of immune complex receptor-mediated stimulation of neutrophils. Effects on cytosolic calcium release and superoxide production. *J Immunol* 150: 4571-4580.
15. Linehan SA, Martinez-Pomares L, Gordon S (2000) Mannose receptor and scavenger receptor: two macrophage pattern recognition receptors with diverse functions in tissue homeostasis and host defense. *Adv Exp Med Biol* 479: 1-14.
16. Ben-Othman R, Flannery AR, Miguel DC, Ward DM, Kaplan J, et al. (2014) *Leishmania*-mediated inhibition of iron export promotes parasite replication in macrophages. *PLoS Pathog* 10: e1003901.
17. Podinovskaia M, Descoteaux A (2015) *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiol* 10: 111-129.
18. Bates PA (2007) Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* 37: 1097-1106.

19. Rogers ME, Bates PA (2007) *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS Pathog* 3: e91.
20. Ng LG, Qin JS, Roediger B, Wang Y, Jain R, et al. (2011) Visualizing the neutrophil response to sterile tissue injury in mouse dermis reveals a three-phase cascade of events. *J Invest Dermatol* 131: 2058-2068.
21. McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, et al. (2010) Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* 330: 362-366.
22. Laufs H, Muller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N, et al. (2002) Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun* 70: 826-835.
23. Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, et al. (2002) Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol* 169: 898-905.
24. Solbach W, Laskay T (2000) The host response to *Leishmania* infection. *Adv Immunol* 74: 275-317.
25. van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, et al. (2004) Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* 173: 6521-6525.
26. Antoine JC, Prina E, Lang T, Courret N (1998) The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol* 6: 392-401.
27. Olivier M, Gregory DJ, Forget G (2005) Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev* 18: 293-305.

28. Ilg T (2000) Proteophosphoglycans of *Leishmania*. *Parasitol Today* 16: 489-497.
29. Blackwell JM (1985) Role of macrophage complement and lectin-like receptors in binding *Leishmania* parasites to host macrophages. *Immunol Lett* 11: 227-232.
30. Blackwell JM, Ezekowitz RA, Roberts MB, Channon JY, Sim RB, et al. (1985) Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. *J Exp Med* 162: 324-331.
31. Descoteaux A, Matlashewski G (1989) c-fos and tumor necrosis factor gene expression in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Mol Cell Biol* 9: 5223-5227.
32. Lodge R, Descoteaux A (2005) Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clin Immunol* 114: 256-265.
33. Spath GF, Epstein L, Leader B, Singer SM, Avila HA, et al. (2000) Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9258-9263.
34. Remaley AT, Glew RH, Kuhns DB, Basford RE, Waggoner AS, et al. (1985) *Leishmania donovani*: surface membrane acid phosphatase blocks neutrophil oxidative metabolite production. *Exp Parasitol* 60: 331-341.
35. Mottram JC, Coombs GH, Alexander J (2004) Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Curr Opin Microbiol* 7: 375-381.
36. Alvarez de Celis H, Gomez CP, Descoteaux A, Duplay P (2015) Dok proteins are recruited to the phagosome and degraded in a GP63-dependent manner during *Leishmania major* infection. *Microbes Infect* 17: 285-294.

37. Hassani K, Shio MT, Martel C, Faubert D, Olivier M (2014) Absence of metalloprotease GP63 alters the protein content of Leishmania exosomes. *PLoS One* 9: e95007.
38. McGwire BS, Chang KP, Engman DM (2003) Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan Leishmania is enhanced by surface metalloprotease gp63. *Infect Immun* 71: 1008-1010.
39. Schneider P, Rosat JP, Bouvier J, Louis J, Bordier C (1992) Leishmania major: differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages. *Exp Parasitol* 75: 196-206.
40. Yao C, Donelson JE, Wilson ME (2003) The major surface protease (MSP or GP63) of Leishmania sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol* 132: 1-16.
41. Santos RF, Possa MA, Bastos MS, Guedes PM, Almeida MR, et al. (2009) Influence of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase Activity on Trypanosoma cruzi Infectivity and Virulence. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e387.
42. Fietto JL, DeMarco R, Nascimento IP, Castro IM, Carvalho TM, et al. (2004) Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of Trypanosoma cruzi. *Biochem Biophys Res Commun* 316: 454-460.
43. Maioli TU, Takane E, Arantes RM, Fietto JL, Afonso LC (2004) Immune response induced by New World Leishmania species in C57BL/6 mice. *Parasitol Res* 94: 207-212.
44. Leite PM, Gomes RS, Figueiredo AB, Serafim TD, Tafuri WL, et al. (2012) Ecto-nucleotidase activities of promastigotes from Leishmania (Viannia) braziliensis relates to parasite infectivity and disease clinical outcome. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1850.

45. de Souza MC, de Assis EA, Gomes RS, Marques da Silva Ede A, Melo MN, et al. (2010) The influence of ecto-nucleotidases on *Leishmania amazonensis* infection and immune response in C57B/6 mice. *Acta Trop* 115: 262-269.
46. de Almeida Marques-da-Silva E, de Oliveira JC, Figueiredo AB, de Souza Lima Junior D, Carneiro CM, et al. (2008) Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. *Microbes Infect* 10: 850-857.
47. Mariotini-Moura C, Bastos MS, de Castro FF, Trindade ML, de Souza Vasconcellos R, et al. (2014) *Trypanosoma cruzi* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion. *Acta Trop* 130C: 140-147.
48. Vasconcellos Rde S, Mariotini-Moura C, Gomes RS, Serafim TD, Firmino Rde C, et al. (2014) *Leishmania infantum* ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is an apyrase involved in macrophage infection and expressed in infected dogs. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e3309.
49. Gomes RS, de Carvalho LC, de Souza Vasconcellos R, Fietto JL, Afonso LC (2015) E-NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) of *Leishmania amazonensis* inhibits macrophage activation. *Microbes Infect* 17: 295-303.
50. de Souza RF, Dos Santos YL, de Souza Vasconcellos R, Borges-Pereira L, Caldas IS, et al. (2013) Recombinant *Leishmania (Leishmania) infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase NTPDase-2 as a new antigen in canine visceral leishmaniasis diagnosis. *Acta Trop* 125: 60-66.
51. Kumar V (2013) Adenosine as an endogenous immunoregulator in cancer pathogenesis: where to go? *Purinergic Signal* 9: 145-165.

52. Kumar V, Sharma A (2009) Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *Eur J Pharmacol* 616: 7-15.
53. Mei L, Du W, Gao W, Mei QB (2010) Purinergic signaling: a novel mechanism in immune surveillance. *Acta Pharmacol Sin* 31: 1149-1153.
54. Fuentes E, Palomo I (2015) Extracellular ATP metabolism on vascular endothelial cells: A pathway with pro-thrombotic and anti-thrombotic molecules. *Vascul Pharmacol*.
55. Di Virgilio F, Boeynaems JM, Robson SC (2009) Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. *Curr Opin Pharmacol* 9: 507-513.
56. Luthje J (1989) Origin, metabolism and function of extracellular adenine nucleotides in the blood. *Klin Wochenschr* 67: 317-327.
57. Vasconcelos EG, Ferreira ST, Carvalho TM, Souza W, Kettlun AM, et al. (1996) Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. Immunological cross-reactivities with potato apyrase and *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. *J Biol Chem* 271: 22139-22145.
58. Beldi G, Wu Y, Sun X, Imai M, Enjyoji K, et al. (2008) Regulated catalysis of extracellular nucleotides by vascular CD39/ENTPD1 is required for liver regeneration. *Gastroenterology* 135: 1751-1760.
59. Kukulski F, Levesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, et al. (2005) Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal* 1: 193-204.
60. Knowles AF (2011) The GDA1\_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. *Purinergic Signal* 7: 21-45.

61. Handa M, Guidotti G (1996) Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun* 218: 916-923.
62. Schulte am Esch J, 2nd, Sevigny J, Kaczmarek E, Siegel JB, Imai M, et al. (1999) Structural elements and limited proteolysis of CD39 influence ATP diphosphohydrolase activity. *Biochemistry* 38: 2248-2258.
63. Yegutkin GG (2008) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783: 673-694.
64. Robson SC, Sevigny J, Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2: 409-430.
65. Sevigny J, Sundberg C, Braun N, Guckelberger O, Csizmadia E, et al. (2002) Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. *Blood* 99: 2801-2809.
66. Goepfert C, Imai M, Brouard S, Csizmadia E, Kaczmarek E, et al. (2000) CD39 modulates endothelial cell activation and apoptosis. *Mol Med* 6: 591-603.
67. Imai M, Goepfert C, Kaczmarek E, Robson SC (2000) CD39 modulates IL-1 release from activated endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 270: 272-278.
68. Imai M, Takigami K, Guckelberger O, Lin Y, Sevigny J, et al. (2000) CD39/vascular ATP diphosphohydrolase modulates xenograft survival. *Transplant Proc* 32: 969.
69. Papanikolaou A, Papafotika A, Murphy C, Papamarcaki T, Tsolas O, et al. (2005) Cholesterol-dependent lipid assemblies regulate the activity of the ectonucleotidase CD39. *J Biol Chem* 280: 26406-26414.

70. Robson SC, Kaczmarek E, Siegel JB, Candinas D, Koziak K, et al. (1997) Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation. *J Exp Med* 185: 153-163.
71. Sansom FM (2012) The role of the NTPDase enzyme family in parasites: what do we know, and where to from here? *Parasitology* 139: 963-980.
72. Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53: 527-552.
73. Hasko G, Pacher P (2012) Regulation of macrophage function by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 865-869.
74. Bermudes D, Peck KR, Afifi MA, Beckers CJ, Joiner KA (1994) Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 269: 29252-29260.
75. de Jesus JB, de Sa Pinheiro AA, Lopes AH, Meyer-Fernandes JR (2002) An ectonucleotide ATP-diphosphohydrolase activity in *Trichomonas vaginalis* stimulated by galactose and its possible role in virulence. *Z Naturforsch C* 57: 890-896.
76. Pinheiro CM, Martins-Duarte ES, Ferraro RB, Fonseca de Souza AL, Gomes MT, et al. (2006) *Leishmania amazonensis*: Biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. *Exp Parasitol* 114: 16-25.
77. Rezende-Soares FA, Carvalho-Campos C, Marques MJ, Porcino GN, Giarola NL, et al. (2010) Cytochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes and identification of an antigenic and catalytically active isoform. *Parasitology* 137: 773-783.

78. Marr JJ, Berens RL, Nelson DJ (1978) Purine metabolism in *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis*. *Biochim Biophys Acta* 544: 360-371.
79. Meyer-Fernandes JR, Dutra PM, Rodrigues CO, Saad-Nehme J, Lopes AH (1997) Mg-dependent ecto-ATPase activity in *Leishmania tropica*. *Arch Biochem Biophys* 341: 40-46.
80. Berredo-Pinho M, Peres-Sampaio CE, Chrispim PP, Belmont-Firpo R, Lemos AP, et al. (2001) A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. *Arch Biochem Biophys* 391: 16-24.
81. Giarola NL, Silveira TS, Inacio JD, Vieira LP, Almeida-Amaral EE, et al. (2014) *Leishmania amazonensis*: Increase in ecto-ATPase activity and parasite burden of vinblastine-resistant protozoa. *Exp Parasitol* 146: 25-33.
82. Maia AC, Detoni ML, Porcino GN, Soares TV, do Nascimento Gusmao MA, et al. (2011) Occurrence of a conserved domain in ATP diphosphohydrolases from pathogenic organisms associated to antigenicity in human parasitic diseases. *Dev Comp Immunol* 35: 1059-1067.
83. Maia AC, Porcino GN, Detoni Mde L, Emidio NB, Marconato DG, et al. (2013) An antigenic domain within a catalytically active *Leishmania infantum* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is a target of inhibitory antibodies. *Parasitol Int* 62: 44-52.
84. Burnstock G (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24: 509-581.
85. Ribeiro JA (1979) Purinergic modulation of transmitter release. *J Theor Biol* 80: 259-270.
86. Burnstock G (1980) Purinergic modulation of cholinergic transmission. *Gen Pharmacol* 11: 15-18.

87. Burnstock G (2007) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64: 1471-1483.
88. Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC (2006) Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 112: 358-404.
89. Burnstock G (2006) Purinergic signalling. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: S172-181.
90. Verkhratsky A, Burnstock G (2014) Biology of purinergic signalling: its ancient evolutionary roots, its omnipresence and its multiple functional significance. *Bioessays* 36: 697-705.
91. Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takawa Y, Shimizu T (1997) A G-protein-coupled receptor for leukotriene B<sub>4</sub> that mediates chemotaxis. *Nature* 387: 620-624.
92. Li Q, Olesky M, Palmer RK, Harden TK, Nicholas RA (1998) Evidence that the p2y<sub>3</sub> receptor is the avian homologue of the mammalian P2Y<sub>6</sub> receptor. *Mol Pharmacol* 54: 541-546.
93. Kukulski F, Ben Yebdri F, Lefebvre J, Warny M, Tessier PA, et al. (2007) Extracellular nucleotides mediate LPS-induced neutrophil migration in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol* 81: 1269-1275.
94. Ben Yebdri F, Kukulski F, Tremblay A, Sevigny J (2009) Concomitant activation of P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>6</sub> receptors on monocytes is required for TLR1/2-induced neutrophil migration by regulating IL-8 secretion. *Eur J Immunol* 39: 2885-2894.
95. Kronlage M, Song J, Sorokin L, Isfort K, Schwerdtle T, et al. (2010) Autocrine purinergic receptor signaling is essential for macrophage chemotaxis. *Sci Signal* 3: ra55.

96. Jacob F, Perez Novo C, Bachert C, Van Crombruggen K (2013) Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. *Purinergic Signal* 9: 285-306.
97. Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, et al. (2003) Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y14 receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 24: 52-55.
98. Idzko M, Panther E, Bremer HC, Sorichter S, Luttmann W, et al. (2003) Stimulation of P2 purinergic receptors induces the release of eosinophil cationic protein and interleukin-8 from human eosinophils. *Br J Pharmacol* 138: 1244-1250.
99. Yeung D, Kharidia R, Brown SC, Gorecki DC (2004) Enhanced expression of the P2X4 receptor in Duchenne muscular dystrophy correlates with macrophage invasion. *Neurobiol Dis* 15: 212-220.
100. Kaufmann A, Musset B, Limberg SH, Renigunta V, Sus R, et al. (2005) "Host tissue damage" signal ATP promotes non-directional migration and negatively regulates toll-like receptor signaling in human monocytes. *J Biol Chem* 280: 32459-32467.
101. Wirkner K, Stanchev D, Koles L, Klebingat M, Dihazi H, et al. (2005) Regulation of human recombinant P2X3 receptors by ecto-protein kinase C. *J Neurosci* 25: 7734-7742.
102. Placido R, Auricchio G, Falzoni S, Battistini L, Colizzi V, et al. (2006) P2X(7) purinergic receptors and extracellular ATP mediate apoptosis of human monocytes/macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* reducing the intracellular bacterial viability. *Cell Immunol* 244: 10-18.

103. Coutinho-Silva R, Monteiro da Cruz C, Persechini PM, Ojcius DM (2007) The role of P2 receptors in controlling infections by intracellular pathogens. *Purinergic Signal* 3: 83-90.
104. Franceschini A, Hullugundi SK, van den Maagdenberg AM, Nistri A, Fabbretti E (2013) Effects of LPS on P2X3 receptors of trigeminal sensory neurons and macrophages from mice expressing the R192Q *Cacna1a* gene mutation of familial hemiplegic migraine-1. *Purinergic Signal* 9: 7-13.
105. Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, et al. (2006) ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* 314: 1792-1795.
106. Kukulski F, Ben Yebdri F, Lecka J, Kauffenstein G, Levesque SA, et al. (2009) Extracellular ATP and P2 receptors are required for IL-8 to induce neutrophil migration. *Cytokine* 46: 166-170.
107. Levesque SA, Kukulski F, Enjoji K, Robson SC, Sevigny J (2010) NTPDase1 governs P2X7-dependent functions in murine macrophages. *Eur J Immunol* 40: 1473-1485.
108. Pelegrin P, Barroso-Gutierrez C, Surprenant A (2008) P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1beta in mouse macrophage. *J Immunol* 180: 7147-7157.
109. Chaves SP, Torres-Santos EC, Marques C, Figliuolo VR, Persechini PM, et al. (2009) Modulation of P2X(7) purinergic receptor in macrophages by *Leishmania amazonensis* and its role in parasite elimination. *Microbes Infect* 11: 842-849.
110. Wewers MD, Sarkar A (2009) P2X(7) receptor and macrophage function. *Purinergic Signal* 5: 189-195.

111. Meuser-Batista M, Correa JR, Carvalho VF, de Carvalho Britto CF, Moreira OC, et al. (2011) Mast cell function and death in *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 179: 1894-1904.
112. Correa G, Marques da Silva C, de Abreu Moreira-Souza AC, Vommaro RC, Coutinho-Silva R (2010) Activation of the P2X(7) receptor triggers the elimination of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from infected macrophages. *Microbes Infect* 12: 497-504.
113. Oliveira SD, Nanini HF, Savio LE, Waghbi MC, Silva CL, et al. (2014) Macrophage P2X7 receptor function is reduced during schistosomiasis: putative role of TGF- beta1. *Mediators Inflamm* 2014: 134974.
114. Chaves MM, Marques-da-Silva C, Monteiro AP, Canetti C, Coutinho-Silva R (2014) Leukotriene B4 modulates P2X7 receptor-mediated *Leishmania amazonensis* elimination in murine macrophages. *J Immunol* 192: 4765-4773.
115. Marques-da-Silva C, Burnstock G, Ojcius DM, Coutinho-Silva R (2011) Purinergic receptor agonists modulate phagocytosis and clearance of apoptotic cells in macrophages. *Immunobiology* 216: 1-11.
116. Marques-da-Silva C, Chaves MM, Chaves SP, Figliuolo VR, Meyer-Fernandes JR, et al. (2011) Infection with *Leishmania amazonensis* upregulates purinergic receptor expression and induces host-cell susceptibility to UTP-mediated apoptosis. *Cell Microbiol* 13: 1410-1428.
117. Marques-da-Silva C, Chaves MM, Rodrigues JC, Corte-Real S, Coutinho-Silva R, et al. (2011) Differential modulation of ATP-induced P2X7-associated permeabilities to cations and anions of macrophages by infection with *Leishmania amazonensis*. *PLoS ONE* 6: e25356.

118. Mokrousov I, Sapozhnikova N, Narvskaya O (2008) Mycobacterium tuberculosis co-existence with humans: making an imprint on the macrophage P2X(7) receptor gene? *J Med Microbiol* 57: 581-584.
119. Sanz JM, Chiozzi P, Di Virgilio F (1998) Tenidap enhances P2Z/P2X7 receptor signalling in macrophages. *Eur J Pharmacol* 355: 235-244.
120. Cascabulho CM, Menna-Barreto RF, Coutinho-Silva R, Persechini PM, Henriques-Pons A (2008) P2X7 modulatory web in Trypanosoma cruzi infection. *Parasitol Res* 103: 829-838.
121. Jamieson SE, Peixoto-Rangel AL, Hargrave AC, Roubaix LA, Mui EJ, et al. (2010) Evidence for associations between the purinergic receptor P2X(7) (P2RX7) and toxoplasmosis. *Genes Immun* 11: 374-383.
122. Miller CM, Zakrzewski AM, Ikin RJ, Boulter NR, Katrib M, et al. (2011) Dysregulation of the inflammatory response to the parasite, Toxoplasma gondii, in P2X7 receptor-deficient mice. *Int J Parasitol* 41: 301-308.
123. Bisaggio DF, Peres-Sampaio CE, Meyer-Fernandes JR, Souto-Padron T (2003) Ecto-ATPase activity on the surface of Trypanosoma cruzi and its possible role in the parasite-host cell interaction. *Parasitol Res* 91: 273-282.
124. Meyer-Fernandes JR, Saad-Nehme J, Peres-Sampaio CE, Belmont-Firpo R, Bisaggio DF, et al. (2004) A Mg-dependent ecto-ATPase is increased in the infective stages of Trypanosoma cruzi. *Parasitol Res* 93: 41-50.
125. Paletta-Silva R, Vieira DP, Vieira-Bernardo R, Majerowicz D, Gondim KC, et al. (2011) Leishmania amazonensis: characterization of an ecto-3'-nucleotidase activity and its possible role in virulence. *Exp Parasitol* 129: 277-283.

126. Asai T, Miura S, Sibley LD, Okabayashi H, Takeuchi T (1995) Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 270: 11391-11397.
127. Manque PA, Woehlbier U, Lara AM, Tenjo F, Alves JM, et al. (2012) Identification and characterization of a novel calcium-activated apyrase from *Cryptosporidium* parasites and its potential role in pathogenesis. *PLoS ONE* 7: e31030.

## 15 - Files

**Table 1:** Overview of the biological roles of E-NTPDases and ecto-nucleotidases from *Leishmania*.

**Table 2:** Overview of the influence of *Leishmania* infection on the purinergic system in the context of the immune system.

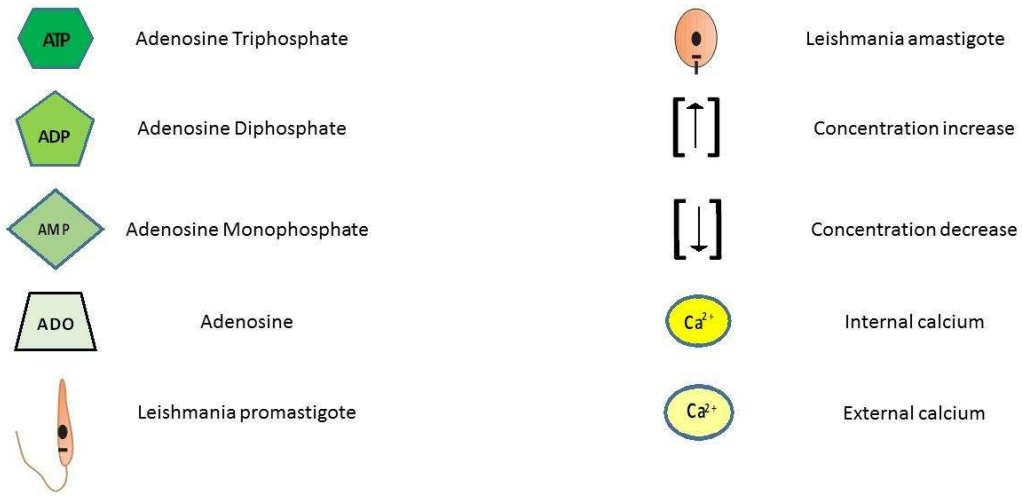
**Figure 1: Summary overview of purinergic signaling in the context of the immune system during homeostasis, dangerous stimuli or in the face of *Leishmania***

**infection.** 1A) Summary representation of the purinergic signaling under homeostasis conditions. During homeostasis self-ectonucleotidases (e.g., ENTPDases and 5'-NT) maintain lower concentrations of purinergic signaling mediators (e.g., ATP, ADP, AMP and ADO) in order to maintain the ecto-nucleotide dependent homeostasis of the innate immune system. 1B) Summary of known changes in the purinergic signaling pathway through nonspecific dangerous stimuli (e.g., infection, inflammation, and necrosis).

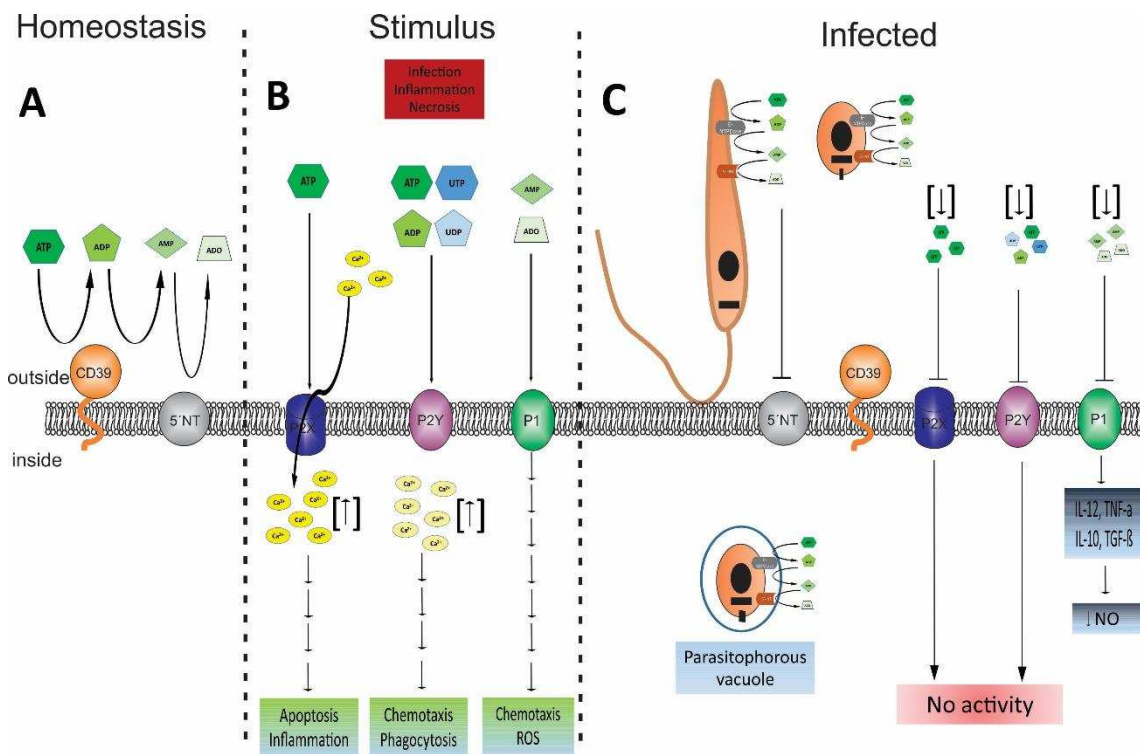
After a dangerous stimuli, the concentration of purinergic signaling mediators increases leading to the activation of purinergic receptors, which could culminate with increased levels of inflammation, apoptosis, chemotaxis, phagocytosis and ROS response. 1C) Summary of known influences of *Leishmania* infection on the purinergic signaling.

During *Leishmania* infection, the action of ectonucleotidases from the parasite (e.g., ENTPDases and 5'NT) can subvert the host immune system through the modulation of purinergic signaling, leading to the inhibition of P2 activation and inducing P1 activation by ADO. Additionally, E-NTPDases from *Leishmania* can act as pro-adhesion molecules to facilitate the infection of host cells (e.g., macrophages).

**Figure 1**



**LEGENDS**



**Table 1. Overview of the biological roles of E-NTPDases and ecto-nucleotidases from Leishmania**

Biological observation	Specie	Reference
Ecto-ATPase Mg <sup>++</sup> dependent involved in adenosine acquisition and virulence	<i>L. amazonensis</i>	Berredo-Pinho, 2001
E-NTPDase is expressed at the surface of the plasma membrane, flagellum, and several organelles	<i>L. amazonensis</i> ; <i>L. braziliensis</i>	<i>L. Coimbra</i> , 2002; Rezende-Soares et. al., 2010; Vasconcellos et. al., 2014
Presence of Ecto-ATPase, ADPase and 5'-nucleotidase in three Leishmania species and relation with immunosuppression in lymph node cells.	<i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. major</i>	<i>L. Maioli</i> 2004
E-NTPDase participates in adhesion to macrophages and the purine salvage pathway. The ecto-ATPase activity is corresponding to the CD39 family.	<i>L. amazonensis</i>	Pinheiro, 2006
Higher E-NTPDase 2 and AMPase activity in <i>L. amazonensis</i> compared to <i>L. braziliensis</i> and its relationship with lesions and virulence	<i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i>	<i>L. Marques-da-Silva</i> et. al., 2008
Ecto-nucleotidase activity is associated with lesion development and parasite multiplication	<i>L. amazonensis</i> ; <i>L. braziliensis</i>	<i>L. De Souza</i> , 2010; Leite, 2012
Ecto-nucleotidase activity is associated with infectivity and lesions in mice	<i>L. amazonensis</i> ; <i>L. infantum</i>	<i>L. De Souza</i> , 2010; Vasconcellos et. al., 2014
Ecto-nucleotidase activity is associated with virulence	<i>L. amazonensis</i>	Paletta-Silva, 2011
High ecto-nucleotidase activity inhibits NO production by activated macrophages	<i>L. braziliensis</i>	Leite, 2012
E-NTPDase is associated with disease progression in mice	<i>L. amazonensis</i>	Detoni et. al., 2013
E-NTPDase induces specific immune response in naturally infected dogs	<i>L. infantum</i>	de Souza et. al., 2013; Maia et. al., 2013
E-NTPDase is expressed in amastigotes in naturally infected dogs	<i>L. infantum</i>	Vasconcellos et. al., 2014
E-NTPDase activity inhibits macrophage activation	<i>L. amazonensis</i>	Gomes et. al., 2014
E-NTPDase is associated with adhesion and infectivity in macrophages	<i>L. infantum</i>	Vasconcellos et. al., 2014

**Table 2. Overview of the influence of Leishmania infection on the purinergic system in the context of the immune system (Purine receptors in parasite infections)**

Host cells	Parasite	Purine receptor	Mainly biological effects	Reference
Erythrocytes	<i>P. falciparum</i>	P2Y <sub>1</sub>	Can participate in the permeability of the infected cell.	Li, 1998
Monocytes	<i>M. tuberculosis</i>	P2X <sub>7</sub>	mRNA increased	Placido, 2006
Macrophage	<i>M. tuberculosis</i>	P2X <sub>7</sub>	mRNA increased	Placido, 2006
Macrophage	<i>L. amazonensis</i>	P2X <sub>7</sub>	mRNA increased, receptor is functional	Chaves, 2009
Macrophage	<i>T. gondii</i>	P2X <sub>7</sub>	P2X <sub>7</sub> activation may help in the elimination of infection	Correa, 2010
Macrophage	<i>L. amazonensis</i>	P2X <sub>7</sub>	Changed the receptor selectivity	Marques-da-Silva, 2011
Macrophage	<i>L. amazonensis</i>	P2Y <sub>2</sub> and P2Y <sub>4</sub>	mRNA increased and receptor is functional	Marques-da-Silva, 2011
Cardiac mast cells	<i>T. cruzi</i>	P2X <sub>7</sub>	mRNA increased	Meuser-Batista, 2011
Peritoneal mast cells	<i>T. cruzi</i>	P2X <sub>7</sub>	Didn't change mRNA level	Meuser-Batista, 2011
Macrophage	<i>S. mansoni</i>	P2X <sub>7</sub>	Decreased population of P2X <sub>7</sub> in membrane surface. No change in mRNA level.	Oliveira, 2014