

BRUNO VINICIUS SANTOS VALIATE

Estudo dos polimorfismos no gene da NTPDase 2 da cepa ET
de *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Agrícola, para obtenção do título de *Magister
Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

V172e
2012

Valiate, Bruno Vinicius Santos, 1986-
Estudo dos polimorfismos no gene da NTPDase 2 da cepa
ET de *Leishmania (Viannia) braziliensis* / Bruno Vinicius
Santos Valiate. – Viçosa, MG, 2012.
viii, 55f. : il. ; (algumas color.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 40-48.

1. NTPDase 2. 2. *Leishmania braziliensis*. 3. Polimorfismo
(Genética). I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 572.79

BRUNO VINICIUS SANTOS VALIATE

Estudo dos polimorfismos no gene da NTPDase 2 da cepa ET
de *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Agrícola, para obtenção do título de *Magister
Scientiae*

APROVADA: 31 de outubro de 2012.

Sergio Oliveira de Paula

Gustavo Costa Bressan

Juliana Lopes Rangel Fietto
(Orientadora)

Os sonhos não envelhecem ...

AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar este primeiro agradecimento por último para que fosse lembrado por mais tempo, mas não deixá-lo em primeiro lugar, me incomoda (com razão). Então quero agradecer ao meu Bom e Trino Deus, que me conduziu todo esse tempo e, por mais que eu não tenha merecido, cuidou de cada detalhe;

à meus pais por todo apoio de todas as formas ... seja afetivo ou financeiro (depois que a bolsa acaba, a coisa se complica ...);

à minha irmã Bárbara, pela agradável, importante e constante presença seja virtual, pessoal ou eletromagneticamente;

aos familiares, que sempre perguntam quando vou parar de estudar e começar a trabalhar (não perguntam por mal ...), mas sempre me acolhem apesar do cabelo e barba;

à minha orientadora Juliana (Ju), por toda a disponibilidade, paciência, preocupação, conselhos, tolerância e bondade;

ao Ministério Universidades Renovadas, a RCC de Viçosa, a Pequena Via e a todos os membros, especialmente os do GOU Sagrado Coração de Jesus, que tanto me ajudaram a crescer (pessoal, fraternal, acadêmica e espiritualmente) nessa cidade, desde o primeiro dia que aqui pisei e por toda alegria a mim proporcionada;

aos amigos de república pelas inúmeras noites em claro, pelas diversões, ensinamentos, reflexões, comidas estranhas, hábitos estranhos, vocabulários estranhos e tudo mais: Renan, Marcos (*in memorian* – casou, coitado!), Lucas, Marcus Mané, Cristiano Baiano V..., Vitrola e Caio;

aos amigos da bioquímica (do morro principalmente), sempre incentivando, ajudando, ensinando, suportando, puxando a orelha e proporcionando momentos de alegria e descontração ... Douglas, Larissa, Sil, Pato (e Claudinha), Thiaguim, Hugo (e Yhasmin), Rafael, Flávia, Dani's (Mendes e Arruda), Robertinha, Xiboca, Robertinho, Edgar, Tevito, Figueira, Marcolino;

aos amigos do LIMA, especialmente Ramon, Matheus, Yaro, Myrian, Mellina, Filippe, Chirs, Rapha, Thiago, Ana's (Cláudia e Paula), Claudinha, Géssica, Sthefany, Izadora, Paulinha, Josi, Ronny, Larissa, Lethícia, Felipe, ao Sr. Valdir e a todos os outros, por todo ensinamento, descontração no ambiente de trabalho e ajuda;

aos amigos Délio, Angélica, Luana, Nathália Thais, Sergim, Roni e Maísa e outros não menos importantes, pela presença amiga, pelos conselhos, pela companhia, paciência, pelos lanches, hospedagem e acima de tudo pelos abraços;

à Karen, companheira musical, com cuja parceria pude estreitar nos bailes da vida. Se a bioquímica não der certo, já tenho uma certa experiência em outros ramos ... ;

aos professores da UFV que contribuíram com minha formação seja pessoal ou profissional, especialmente Luciano, Zé, João Paulo, Gustavo, Márcia Rogéria, Eduardo Marques, Leandro Licursi e Sérgio de Paula;

ao secretário da pós, Dudu (Eduardo), pela competência, paciência, amizade, ajuda e por cair em alguns trotes;

aos amigos da noite, que são muitos, com quem muito aprendi sobre a vida. Àqueles cujo nome nunca soube, mas com quem sempre conversava como se fossem grandes amigos;

à CAPES e a UFV pelo apoio financeiro;

enfim, a todos que contribuíram de alguma forma seja para a realização deste trabalho, seja pela ajuda na manutenção do autor deste em diversos âmbitos, em Viçosa,

A todos, meu muito obrigado. Que Deus abençoe.

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract	viii
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	4
2.1 Leishmania e Leishmaniose	4
2.2 E-NTPDases	7
2.3 Polimorfismos de base única - SNP`s	12
2.4 NTPDases de Leishmania e SNPs	15
3. Objetivos	16
3.1 Objetivo Geral	16
3.2 Objetivos Específicos	16
3.2.1 Estratégia 1 - Identificação e quantificação das possíveis isoformas de E-NTPDase-2 codificadas no genoma do isolado ET	16
3.2.2 Estratégia 2 - Seleção clonal do parasito com posterior análise molecular	16
4. Material e Métodos	17
4.1 Estratégia 1- Identificação e quantificação das possíveis isoformas de E-NTPDase-2 codificadas no genoma da cepa ET	17
4.1.1 Isolamento do DNA genômico	17
4.1.2 Isolamento do gene da NTPDase-2 por PCR	17
4.1.3 Purificação da PCR, ligação e transformação	18
4.1.4 Isolamento de colônias	18
4.1.5 Extração do DNA plasmidial e sequenciamento	18
4.1.6 Verificação dos diferentes SNPs no gene da NTPDase-2 e análise da abundância de genes polimórficos	20
4.2 Estratégia 2- Seleção clonal do parasito com posterior análise molecular	20
4.2.1 Cultivo de <i>Leishmania braziliensis</i> das cepas ET	20

4.2.2 Isolamento dos clones por diluição limitante e congelamento	20
4.2.3 Coloração pelo método do Giemsa	22
4.2.3 Curva de crescimento dos clones	22
4.2.4 Medida da atividade ecto-nucleotidásica “ <i>in vivo</i> ”	22
4.2.5 Isolamento do DNA genômico, isolamento do gene da NTPDase-2 por PCR, purificação da PCR, ligação e transformação em <i>E. coli</i> TOP 10, isolamento de colônias, extração do DNA plasmidial e sequenciamento.	23
5. Resultados e Discussão	28
5.1 Estratégia 1- Identificação e quantificação das possíveis isoformas de E-NTPDases-2 codificadas no genoma do isolado ET	28
5.1.1 Isolamento do DNA genômico	24
5.1.2 Isolamento do gene da NTPDase-2 por PCR e sua purificação	24
5.1.5 Extração do DNA plasmidial e confirmação da ligação por digestão	25
5.1.6 Verificação dos diferentes SNPs no gene da NTPDase-2 e análise da abundância de genes polimórficos	27
5.2 Estratégia 2- Seleção clonal do parasito com posterior análise molecular	28
5.2.1 Isolamento de clones do isolado ET de <i>Leishmania braziliensis</i>	28
5.2.2 Curva de crescimento dos clones	30
5.2.3 Medida da atividade ecto-nucleotidásica	31
5.2.4 Isolamento do DNA genômico, isolamento do gene da NTPDase-2 por PCR, purificação da PCR, ligação e transformação em <i>E. coli</i> TOP 10, isolamento de colônias, extração do DNA plasmidial e sequenciamento	34
6. Conclusão e Perspectivas	39
7. Bibliografia	40
8. Anexos	49

RESUMO

VALIATE, Bruno Vinicius Santos. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2012. **Estudo dos polimorfismos no gene da NTPDase 2 da cepa ET de Leishmania (Viannia) braziliensis.** Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto. Coorientadores: Eduardo de Almeida Marques da Silva e Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

As Leishmanioses são doenças negligenciadas de países subtropicais. Causada por protozoário do gênero *Leishmania*, que são transmitidos por flebotomíneos. As Leishmanioses consistem basicamente de duas formas, cutânea e visceral. Na superfície dos parasitos deste gênero há proteínas denominadas ecto-nucleotidases (apirases). Apirases são enzimas que hidrolisam nucleosídeos tri e di-fosfatados. Em *Leishmania braziliensis* há dois genes de apirase mapeados, NTPDase-1 e 2. Há diversos trabalhos que relacionam a atividade destas enzimas com processos como virulência, infecção, captação de nutrientes e adesão celular. Dados não publicados de RNA seq revelaram que na sequência mensageira das NTPDases existem polimorfismos de base única (SNPs). SNPs podem influenciar a função de um gene através de mudança de uma base de um códon, podendo gerar uma mudança de aminoácido. Este trabalho objetivou a análise dos SNPs da NTPDase-2 da cepa ET de *L. b.* Na primeira parte do trabalho o DNA genômico foi extraído para que pudesse ser usado como molde para isolamento do gene da NTPDase-2 por PCR. O gene isolado foi ligado no vetor pJET para posterior sequenciamento. Na segunda parte, foram isolados clones dos parasitos cultivados através de diluição limitante. Após o isolamento de 5 clones, foram feitos os mesmos procedimentos da primeira parte para que a NTPDase-2 de cada clone pudesse ser sequenciada. Com os clones foi feita uma curva de crescimento e medida da atividade ecto-nucleotidásica. O sequenciamento mostrou que há 2 SNPs que não mudam o códon em todas as colônias isoladas para sequenciamento, tanto na primeira quanto na segunda parte. Dos 5 clones, dois tiveram um crescimento menor que os demais. Na comparação das atividades nucleotidásicas foi observado que os clones que mais cresceram tiveram maior atividade, confirmando resultados de outros trabalhos que relacionam proliferação dos parasitos com atividade ecto-nucleotidásica. Entretanto um dos clones apresentou alta atividade sem que tenha se observado alta proliferação. Os resultados confirmaram parcialmente esta relação e estudos posteriores visam completar e melhor explicar os resultados observados.

ABSTRACT

VALIATE, Bruno Vinicius Santos. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2012. **Polimorphisms' study of on NTPDase-2 gene of ET strain from *Leishmania (Viannia) braziliensis***. Adviser: Juliana Lopes Rangel Fietto. Co-advisers: Eduardo de Almeida Marques da Silva and Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

Leishmaniasis are negligenciate diseases of sub-tropical countries. They are caused by protozoa that belong to *Leishmania* genus and are trasmitted by sand flies. Leishmaniasis mainly exists at cutaneous and visceral forms. At the *Leishmania*'s surface there are proteins named ecto-triphosphate diphosphohydrolase (apyrases). Apyrases are enzymes that hydrolyze tri and di-phosfate nucleosides. *Leishmania braziliensis* has two mapped apyrase genes in its genome, NTPDase-1 and NTPDase-2. There are several papers that correlate the enzymatic activity with some processes like virulence, infection, nutrients capitation, and cellular adhesion. Non published data showed that there are single nucleotides polymorphisms (SNPs) in the messenger sequence of the NTPDase. SNPs might influence gene function by changing a codon base and its encoding amino acid. The present work proposed an analysis of SNPs from NTPDase-2 of ET strain of *L.b.* At the first part of the work, the genomic DNA was extracted to be used as a mold to the isolation of the NTPDase-2 gene by PCR. At the second part, clones of cultivated parasites were isolated through the limited dilution. After the isolation of five clones, the same procedure of the first part was made with the aim to sequence the NTPDase-2 gene of each isolate clone. A growth curve and measure of ecto-nucleotidase activity with the clones was made. The sequencing showed that in all the isolated colonies (in both at the first as at the second part) there are just 2 SNPs that do not change the codon. Two of five clones had a smaller growth. In the activity, the clones with the biggest growth had the biggest activity, it confirmed other results relating parasite's proliferation and the ecto-nucleotidase activity. One of the clones, D12, had a high activity but did not grow so much. With this results, we can't confirm the total relation but there are many mechanisms involving the cell growth and it may be involved with the difference between the activity and the clone D12 growth.

1. Introdução

As leishmanioses são antropozoonoses consideradas um grande problema de saúde pública. Representam um complexo de doenças com amplo espectro clínico e diversidade epidemiológica (Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana- Ministério da Saúde, 2007). A Organização Mundial de Saúde (WHO) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de contrair leishmaniose, com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano. São causadas por infecção com protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas por fêmeas infectadas de flebotômíneos dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*. O curso da doença é determinado por alguns fatores, como agressividade e o tropismo de cada espécie e a condição do sistema imune (revisado por Neuber, 2008) e pode ser dividida basicamente em duas formas clínicas: tegumentar e visceral (Herwaldt, 1999).

As leishmanioses acometem os países sub-desenvolvidos e em desenvolvimento de clima tropical e sub-tropical. Constam na lista das doenças negligenciadas, sendo endêmicas em todas as regiões do Brasil, com exceção da região sul (Ministério da Saúde, 2012).

Por muitos anos, o impacto das leishmanioses na saúde pública tem sido subestimado, principalmente devido à falta de consciência do seu alto impacto sobre a saúde. Ao longo dos últimos 10 anos, regiões endêmicas foram se espalhando e tem havido um forte aumento no número de casos registrados. Como a notificação é obrigatória em apenas 32 dos 88 países afetados pelas leishmanioses, um número substancial de casos não é registrado. Estima-se que, anualmente no mundo ocorram 2 milhões de novos casos (1,5 milhões para a forma cutânea e 500 000 para visceral), embora apenas cerca de 600 000 sejam oficialmente reportados e mais de 50 000 pessoas são levadas ao óbito. Esse número é somente ultrapassado, para doenças parasitárias, pela malária. Um fato que agrava a situação é a emergente co-infecção com o vírus HIV. A estimativa é de que aproximadamente 12 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo atualmente (WHO, 2012).

Na superfície dos parasitos causadores das leishmanioses há proteínas que se apresentam como potentes alvos para a elaboração de vacinas, quimioterápicos e outras formas de combate à infecção. Dentre essas proteínas, destacamos as Ecto-Nucleotídeo Trifosfato Difosfohidrolases, comumente chamadas de E-NTPDase ou

apirases. Estas ecto-nucleotidases são enzimas pertencentes à família do CD39e atuam hidrolisando nucleosídeos tri e di-fosfatados do meio extra-celular, influenciando assim na captação de purinas e na sinalização purinérgica(Sansom, 2008).

A participação das ecto-nucleotidases na infectividade e virulência de parasitos é fortalecida por vários trabalhos da literatura (Asay e cols., 1995; Nakaar e cols., 1998; Berredo-Pinho e cols., 2001; De Jesus e cols., 2002; Barros e cols., 2000; Maioli e cols. 2004; Marques-da-Silva e cols., 2008; Santos e cols, 2009). Estas enzimas se mostram hoje como potenciais alvos para o desenvolvimento de novas abordagens racionais para a quimioterapia e imunoterapia (Sanson, 2008).

Em *Leishmaniae* em *Trypanosoma cruzi* já foi mostrado que a maior capacidade ecto-nucleotidásica parece estar envolvida com a virulência (Fietto e cols, 2004; Maioli e cols 2004; Marques-da-Silva e cols., 2009; Santos e cols, 2009).

No presente trabalho, foi utilizada uma cepa de *Leishmania (V.) braziliensis* proveniente do banco de isolados do Laboratório de Pesquisas Clínicas do Instituto de Pesquisas René Rachou – Fiocruz, que apresenta descrição completa das características clínicas dos pacientes de onde foram isolados. Dados internos do nosso grupo de pesquisa e de equipes colaboradoras forneceram informações que inspiraram a realização deste trabalho.

Em modelo murino foi observada considerável diferença da virulência entre a cepa ET e uma outra cepa, denominada NSL (Leite e cols, 2012). Ensaio de atividade ecto-nucleotidásica são utilizados como marcadores de virulência e infectividade (Bisaggio D. F. e cols., 2003; Asay e cols., 1995; Nakaar e cols., 1998; Berredo-Pinho e cols., 2001; De Jesus e cols., 2002; Tasca, T. e cols., 2005; Barros e cols., 2000; Marques-da-Silva e cols., 2008; Santos e cols, 2009). Com base neste ensaio de atividade enzimática, utilizando-se estas duas cepas, foi verificado que a cepa NSL possui maior atividade ecto-ATPDásica que a cepa ET (Leite e cols, 2012). Isso pode ter influência sobre a infecção devido ao fato de nucleotídeos extra-celulares estarem relacionados com a modulação do sistema imune (Coutinho-Silva, 2007; Bours e cols, 2006). Em outro trabalho, em análises de RNA-seq, dados de transcriptoma revelaram a presença de polimorfismos de base única (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs) nas sequências das NTPDases, que poderiam explicar, pelo menos parcialmente, as diferenças de atividade ecto-ATPDásica entre as cepas (dados não publicados). O RNA-Seq é a ferramenta mais poderosa na identificação de SNPs, mas possui limitações e permitiu apenas saber da existência dos SNPs, mas não sua localização e

caracterização. Essa variabilidade poderia ser responsável por gerar diferentes isoformas de E-NTPDases em sub-populações das cepas, levando a diferenças na atividade ecto-ATPDásica, na virulência e infectividade. Em decorrência desta informação, fez-se necessária a realização deste trabalho para verificar se esses SNPs exercem alguma influência sobre a atividade ecto-nucleotidásica na cepa ET e qual a correlação das diferentes possíveis E-NTPDases com os dados biológicos da cepa. Estudos posteriores e idênticos a esse serão realizados a fim de comparação entre as cepas ET e NSL.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 *Leishmania e Leishmaniose*

As leishmanioses são um grupo clinicamente heterogêneo de doenças cujos agentes etiológicos são espécies do gênero *Leishmania*. São consideradas, em primeira instância, zoonoses que podem acometer o homem, quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito, transformando-se em antropozoonose (Desjeux, 1996).

Os hospedeiros vertebrados são infectados quando formas promastigotas metacíclicas (forma infectante) são inoculadas, pelas fêmeas dos insetos vetores (flebotomíneos), durante o repasto sanguíneo. Após a interiorização nos macrófagos, o parasito sofre transformação para a forma amastigota, intracelular obrigatória, capaz de desenvolver-se e multiplicar-se no meio ácido encontrado no vacúolo parasitóforo (Neves, D. P., 2002).

Existem vinte espécies de *Leishmania* que são patogênicas ao ser humano (WHO) e, dependendo da espécie em questão e do hospedeiro, as leishmanioses podem ser classificadas em duas formas clínicas principais: visceral e tegumentar (cutânea), sendo que essa última possui variações (cutânea, mucocutânea e cutânea difusa).

A forma mais grave é a visceral, afetando os linfonodos, baço, fígado e medula óssea. Se não tratada, é fatal. O início desta forma pode ser confundido com a cutânea (Neuber, 2008). Dados da Organização Mundial de Saúde mostram que mais de 90% dos casos da forma visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão. No Brasil, a forma visceral inicialmente tinha um caráter eminentemente rural e, mais recentemente, vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte, este fator parece estreitamente relacionado com a presença dos cães domésticos como reservatórios dos parasitos. Segundo o Ministério da Saúde, em 19 anos de notificação (1984-2002), os casos de leishmaniose visceral somaram 48.455 casos, sendo que aproximadamente 66% deles ocorreram nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí.

A distribuição geográfica da leishmaniose visceral no Brasil mostra claramente que focos de áreas de casos autóctones estão espalhados por quase todo o território nacional (Ministério da Saúde, www.saude.gov.br). A realidade epidemiológica deve ser ainda mais problemática, pois nem todos os casos da doença são notificados.

A leishmaniose tegumentar é um problema de saúde pública e social em vários países em desenvolvimento. As espécies de *Leishmania* que são causadoras da forma cutânea estão difundidas em 88 países no Novo Mundo (Américas) e Velho Mundo (Europa, Ásia e África). Mais de 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru. No continente americano há registro de casos desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai (Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana- Ministério da Saúde, 2007). Segundo a Organização Mundial de Saúde o número de casos de leishmaniose cutânea vem crescendo no Brasil nos últimos anos. Fato este relacionado ao desenvolvimento econômico e a mudanças de hábitos e ambientais que expõem mais a população aos vetores da doença. Em países do Novo Mundo a leishmaniose tende a ser mais severa e a cura espontânea é rara. De forma semelhante, sintomas mais severos são características comuns e têm sido observados em infecções por *L. major* no Afeganistão. Lesões vistas em leishmaniose cutânea no Novo Mundo podem variar largamente, chegando, em casos severos, a serem confundidas com neoplasias. (Fischer, M. 2002). No Velho Mundo, as espécies responsáveis pela leishmaniose cutânea são principalmente *L. major* e *L. tropica*. *L. infantum* e *L. donovani* também podem causar a doença, mas são observadas menos frequentemente em áreas Mediterrâneas (González, U., 2009).

L. braziliensis foi a primeira espécie de *Leishmania* descrita e incriminada como agente etiológico da leishmaniose tegumentar americana. É a mais importante epidemiologicamente, não só no Brasil, mas em toda a América Latina (Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana- Ministério da Saúde, 2007). A infecção por *L. braziliensis* pode sofrer tropismo, por razões não conhecidas, para as mucosas, o que caracteriza a forma mucocutânea (Neuber, H. 2008). Em pacientes sem causas conhecidas de imunodeficiência, a leishmaniose cutânea pode evoluir para uma ausência de resposta celular específica (anergia) para antígenos de *Leishmania*, que caracteriza a rara leishmaniose cutânea difusa. Esta forma afeta apenas a pele, mas com lesões generalizadas (Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana- Ministério da Saúde, 2007).

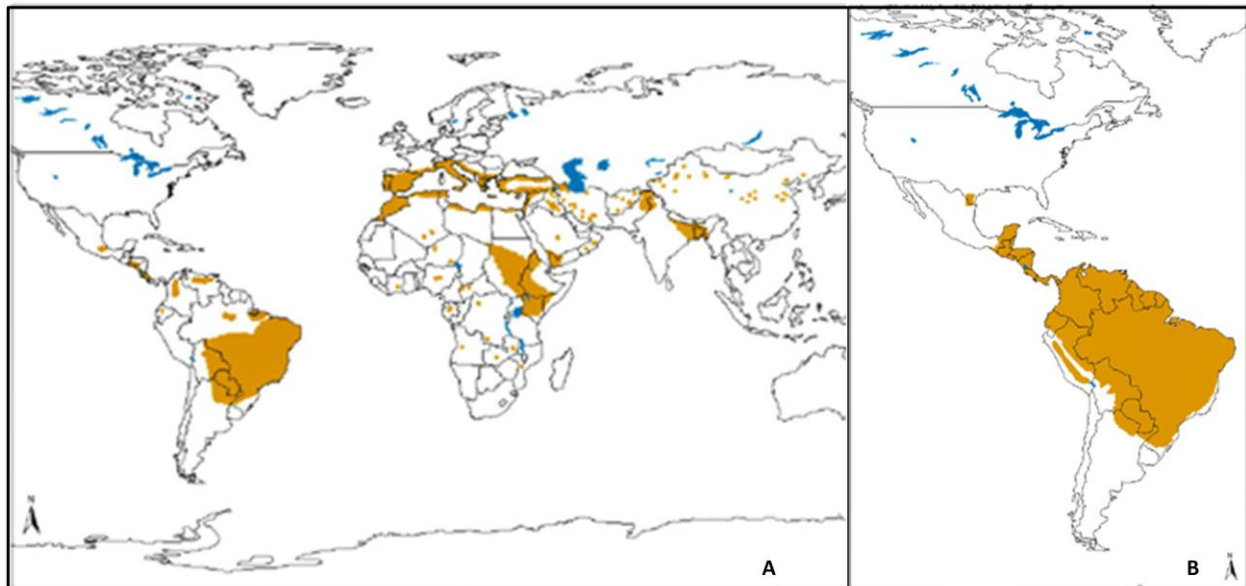


Figura1 – Distribuição geográfica das leishmanioses. A) Leishmaniose visceral em todo o mundo; B) Leishmaniose cutânea e mucocutânea no Novo Mundo (WHO, 2012).

Estima-se que 3 a 5% dos casos de leishmaniose cutânea evoluem e culminam em lesão mucosa. Clinicamente, a leishmaniose mucocutânea se caracteriza por lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores. Geralmente surge após a cura clínica da forma cutânea, com início silencioso e com pouca sintomatologia. Na maioria dos casos, resulta de leishmaniose cutânea de evolução crônica e curada sem tratamento ou com tratamento inadequado (manual de vigilância, 2007). A característica saliente de espécies que causam a leishmaniose mucocutânea é que elas causam metástase para os tecidos mucosos da boca e do trato respiratório superior por disseminação linfática ou hematogênica (WHO, 2012). *L. braziliensis* é a principal espécie primária envolvida com a leishmaniose mucocutânea no novo mundo, embora *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* podem também estar envolvidas. No velho mundo, *L. major* é a principal (Reithinger, R. e cols., 2007). A frequência da forma mucocutânea varia com base na localização geográfica. No Brasil, a incidência pode variar de 0,4% a 2,7% e nos países andinos a incidência média é de 7,1% (Goto, H., 2012).

O aumento na ocorrência de leishmaniose é associado às mudanças climáticas em algumas localidades (Ready P. D., 2008). No mundo, existem mais que 12 milhões de pessoas infectadas e cada ano aparecem mais de 2 milhões de novos casos e este número tende a crescer (Report of the Fifth Consultative Meeting on *Leishmania*/HIV Coinfection, WHO, 2007). Para o tratamento da leishmaniose, é comum a utilização de

algumas drogas, porém têm-se notificações de efeitos colaterais importantes e do desenvolvimento de resistência pelo parasito. Deste modo, há necessidade de uso de uma segunda linha de drogas, o que geralmente gera maior toxicidade (WHO, 2012).

Tratamentos sistêmicos são, geralmente, concedidos àqueles cuja enfermidade apresente lesões grandes, múltiplas ou disseminada e àqueles que têm lesões simples envolvendo áreas cosmeticamente sensíveis ou articulações, ou com a presença de linfangite nodular (González, U. 2009). No tratamento da leishmaniose cutânea tem-se utilizado compostos pentavalentes de antimônio, como antimoniato de N-metilglucamina. Outras drogas têm sido empregadas, entre as quais se destacam a pentamidina, anfotericina B, paromomicina e o miltefosine. A pentamidina, além de ser relativamente eficaz na terapia da leishmaniose, é eficaz no tratamento de casos incipientes de tripanossomíase gambiense ou rodesiana (Doua, F. 1996). No tratamento da leishmaniose visceral a pentamidina foi usada com sucesso, em séries de 12 a 15 doses. A segunda série, administrada após intervalo de 1 a 2 semanas, pode ser necessária em áreas onde se sabe que a infecção responde de modo insatisfatório ao tratamento. A substância é particularmente útil em casos que não responderam aos antimoniais ou para pacientes com a forma visceral que sejam hipersensíveis ao antimônio. A alta toxicidade desta droga também é fator limitante para o uso. Hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas, nefrotoxicidade e, até mesmo, morte repentina foram descritas (Balaña-Fouce, R. e cols., 1998; Singh e cols, 2012).

Uma alternativa que vem sendo estudada é a obtenção de vacinas tanto para cães quanto para humanos (Agallou, M. e cols, 2012 e Okwor, I. e cols, 2012) No entanto, ainda não há nenhuma vacina considerada eficaz disponível, apesar dos consideráveis esforços de muitos laboratórios (Kedzierski, L. 2009).

2.2 E-NTPDases

Nucleotídeos extracelulares atuam como sinalizadores de perigo e estão envolvidos no reconhecimento e no controle de patógenos intracelulares. Atuam como moduladores do sistema imune e estão envolvidos em vários efeitos biológicos em diferentes células, tecidos e órgãos (Dombrowski e cols., 1998 e Francesco Di Virgilio, 2005). O ATP está envolvido em efeitos citostáticos e citotóxicos em vários tumores,

além de ser necessário para a secreção de algumas citocinas (Bours e cols, 2006). O ADP extracelular estimula a agregação plaquetária, mas sobre os linfócitos, não mostrou efeito (Langston e cols., 2003). Sabe-se que a adenosina extracelular pode ser transportada para o citoplasma e incorporada em vias de recuperação de purinas, importantes vias presentes em parasitos (Carter, N. S. e cols, 2008).

Nas últimas duas décadas tem-se observado uma grande expansão no campo da sinalização via nucleotídeos extracelulares. Estudos de clonagem molecular de receptores e análises farmacológicas e fisiológicas mostraram que praticamente todas as células de vertebrados apresentam, em sua superfície, receptores para ATP (Abbracchio e Burnstock 1998; Fischer 1999). Não só o ATP é tido como nucleotídeo sinalizador, outros também desempenham essa função, por exemplo o UTP, UDP e ADP. Os produtos de hidrólise desses nucleotídeos, os nucleosídeos e os fosfatos livres, podem ser reciclados e reutilizados pelas células ao redor, bem como atuar em outras vias de sinalização (Pastor-Anglada et al. 1998 e Dombrowski e cols., 1998).

Enzimas que hidrolisam nucleotídeos estariam, dessa forma, participando ativamente do processo de sinalização, pois modulam a concentração dos nucleotídeos extracelulares (Di Virgilio, 2005). Existe um grupo de enzimas que são responsáveis por essas hidrólises, são as ecto-nucleotidases. As ecto-nucleotidases atualmente conhecidas incluem membros das famílias E-NPP (ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase), que possui ampla especificidade para substratos e atividade fosfodiesterásica alcalina e nucleotídeo pirofosfatásica, fosfatase alcalina, que liberam fosfatos inorgânicos de uma variedade de compostos orgânicos, ecto-5'-nucleotidase, que degradam nucleosídeos-5'-monofosfatados em seus respectivos nucleosídeos e fosfato inorgânico, e E-NTPDase (ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase), que será melhor descrita (Zimmermann, 2000).

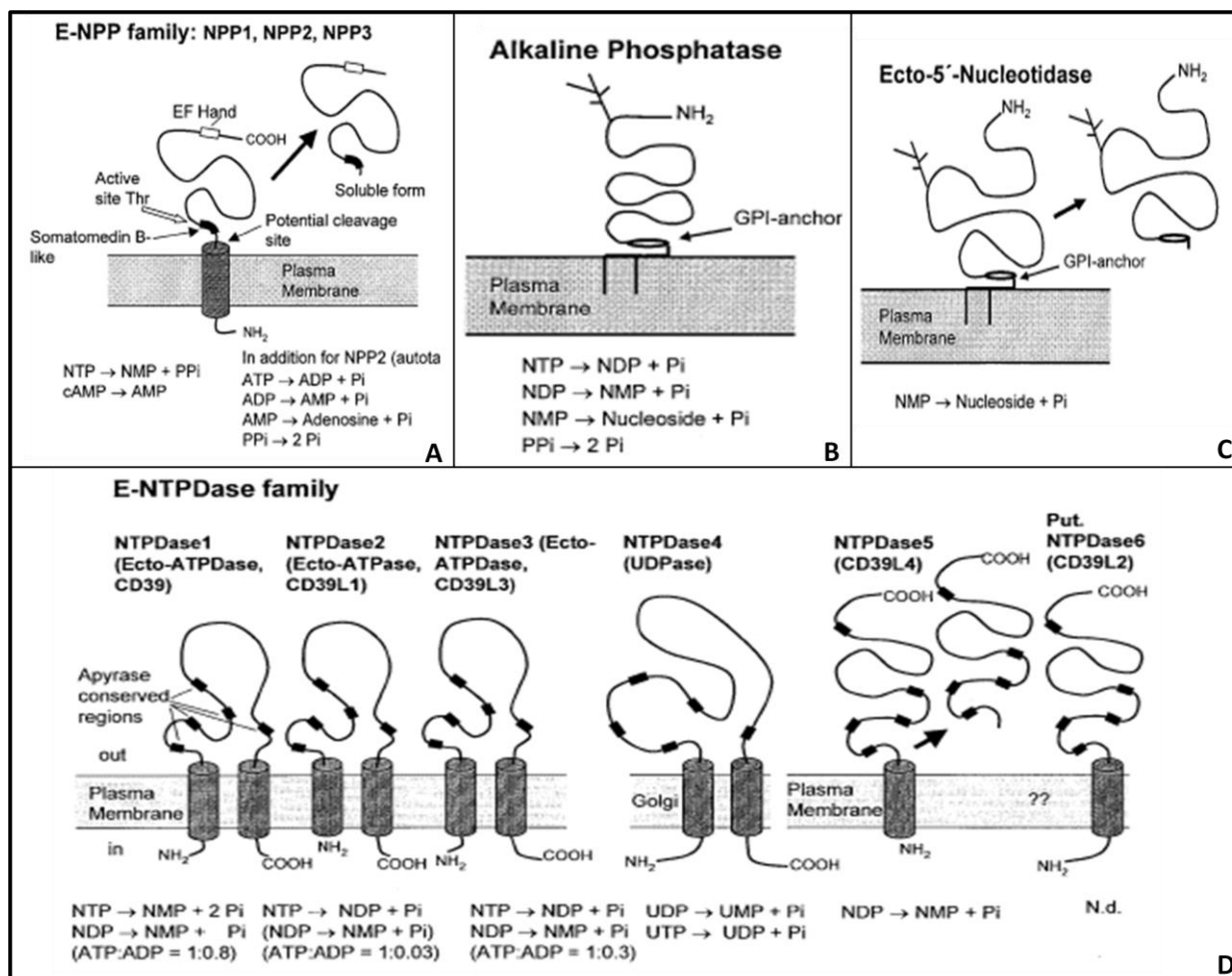


Figura2–Predição das topografias de membrana e propriedades catalíticas das famílias de ecto-nucleotidas. A) Família E-NPP. Podem ocorrer na forma de dímeros ou na forma solúvel, por meio de clivagem proteolítica; B) Família Fosfatase alcalina; C) Família 5'-ecto-nucleotidase. Ocorre como dímero, mas pode ser liberada da membrana por uma fosfolipase endógena GPI-específica. D) Família E-NTPDase. As enzimas podem ocorrer como homomultímeros. A NTPDase 5 ocorre como uma proteína solúvel (a seta indica). Uma possível NTPDase 6 possui somente a estrutura primária conhecida (Zimmermann, 2000).

As E-NTPDases, também chamadas de ecto-apirases, fazem parte da família CD39. Oito diferentes genes ENTPD codificam membros da família das NTPDases, em mamíferos. Estas enzimas são responsáveis por hidrolisar, em proporções variáveis, os nucleosídeos 5'-trifosfato e nucleosídeos 5'-difosfato, levando ao produto monofosfatado. Considerando as NTPDases de mamíferos, quatro NTPDases (1, 2, 3 e 8) são típicas enzimas localizadas em superfícies celulares com o sítio catalítico voltado para a face extracelular. As isoformas NTPDases 5 e 6 são expostas no lado intracelular e/ou podem ser secretadas ou expostas na face extracelular. As NTPDases 4 e 7 são inteiramente localizadas no meio intracelular, voltadas para lúmen de organelas citoplasmáticas (Robson, S. C. e cols, 2006).

A engenharia genética, a identificação molecular, análises mutacionais e a geração de anticorpos subtipo-específicos dos diferentes subtipos de NTPDase levaram a um considerável conhecimento quanto a estrutura e função desta família de enzimas,

e têm definido também funções fisiológicas e fisiopatológicas das NTPDases em uma considerável variedade de tecidos (Robson, S. C. e cols, 2006).

Esta família de genes não está presente apenas em vertebrados, mas também em invertebrados, plantas, leveduras, protozoários e, descoberto mais recentemente, em *Legionella pneumophila*, um organismo procarioto responsável maior por uma forma aguda de pneumonia. (Handa e Guidotti, 1996; Vasconcelos e cols., 1996; Smith e cols., 1999; Zimmermann & Braun, 1996; Fietta e cols., 2004; Lemos e cols., 2002, Sansom e cols., 2007).

Uma característica compartilhada por todos os membros dessa família é a presença de cinco domínios altamente conservados, denominados ACRs - Apyrase Conserved Regions (Handa e Guidotti 1996), que possuem grande relevância para a atividade catalítica, fato confirmado por Smith e Kirley (1999) que induziram uma mutação sítio-dirigida de resíduos conservados de aminoácidos nas ACRs I e IV e observaram que a atividade nucleotidásica tornou-se bastante comprometida. A atividade nucleotidásica destas enzimas é dependente da presença de cátions divalentes, sendo Ca^{+2} e Mg^{+2} os mais comuns (Christoforidis e cols., 1995; Berrêdo-Pinho e cols., 2001), embora alguns autores sugiram que alterações na atividade NTPDásica podem ser promovidas por zinco e cádmio (Senger, 2006).

Uma vez que os nucleotídeos extracelulares não possuem a capacidade de atravessar membranas celulares, se faz necessária a presença de proteínas que se ligam a estas moléculas, como os purinoreceptores e as ecto-nucleotidases (Dombrowski e cols., 2000). Uma grande família de receptores ancorados à membrana medeia a sinalização celular por ATP e adenosina. Estes receptores são caracterizados de acordo com os efeitos farmacológicos de antagonistas e agonistas dos receptores de nucleosídeos e nucleotídeos (Bours e cols., 2006). Estes são nomeados receptores purinérgicos e determinam uma variedade de efeitos induzidos por esses nucleotídeos extracelulares. Foram definidas duas grandes famílias de purinoreceptores, nomeadas como receptores P1 e P2 (Ralevic & Burnstock, 1998). A concentração extracelular dos nucleotídeos e a resposta celular destas moléculas são reguladas pela ação dos receptores purinérgicos e das enzimas que atuam em seu metabolismo e encontram-se presentes na membrana das células ou secretadas em formas solúveis, como descrito anteriormente.

Vários trabalhos recentes têm sugerido uma correlação entre a capacidade de hidrólise de ATP extracelular por parasitos (*T. cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *L. amazonensis*, *Tricomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* e *Cryptosporidium parvum*) e processos como virulência, sobrevivência intracelular, adesão celular, infectividade e aquisição de purinas (Bisaggio D. F. e cols., 2003; Asay e cols., 1995; Nakaar e cols., 1998; Berredo-Pinho e cols., 2001; De Jesus e cols., 2002; Barros e cols., 2000; Marques-da-Silva e cols., 2008; Santos e cols, 2009, Manque e cols, 2012).

Maioli e cols, em 2004, estudando a infecção experimental de camundongos C57BL/6 com *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, ambas causadoras de leishmaniose tegumentar em humanos, verificou que os camundongos eram capazes de controlar a infecção por *L. braziliensis*, mas não por *L. amazonensis*. Observou-se também que as células de *L. amazonensis* eram capazes de hidrolisar uma maior quantidade de ectonucleotídeos de adenina do que as células de *L. braziliensis*. Esta diferença poderia então levar ao aumento da produção de adenosina que por exercer um efeito anti-inflamatório poderia explicar a imunossupressão apresentada na infecção por *L. amazonensis*. Esta foi a primeira evidência da participação de ectonucleotidases de um parasito no controle da resposta imunológica do hospedeiro. Resultado semelhante foi encontrado por Marques-da-Silva em 2008, onde observou-se que promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* possuem maior atividade nucleotídica para ATP, ADP e AMP, comparado às espécies *L. major* e *L. braziliensis* e que a produção maior de adenosina pela espécie mais virulenta parece ser a explicação para a inibição da resposta imune e o não controle da infecção usando como modelo a infecção em camundongos C57BL/6.

Outra relação importante entre NTPDases e o metabolismo dos parasitos é a não possibilidade de parasitos da família *Trypanosomatidae*, a qual pertence o gênero *Leishmania*, sintetizar nucleotídeos pela via de novo (Hammond e Gutteridge, 1984). Isso faz com que eles necessitem capturar as purinas para a via de salvação (Hammond e Gutteridge, 1984), utilizando-se, provavelmente, das NTPDases, 5'-nucleotidases e de transportadores de nucleotídeos/nucleosídeos para internalizá-las.

Diante de tais evidências, torna-se clara a participação e importância das apirases nos variados processos que permitem e facilitam a infecção e manutenção de parasitos no hospedeiro, um resumo destes processos está mostrado na figura 1, onde a hidrólise do ATP e ADP e a posterior geração de adenosina agem sinergicamente como supressores da resposta imune.

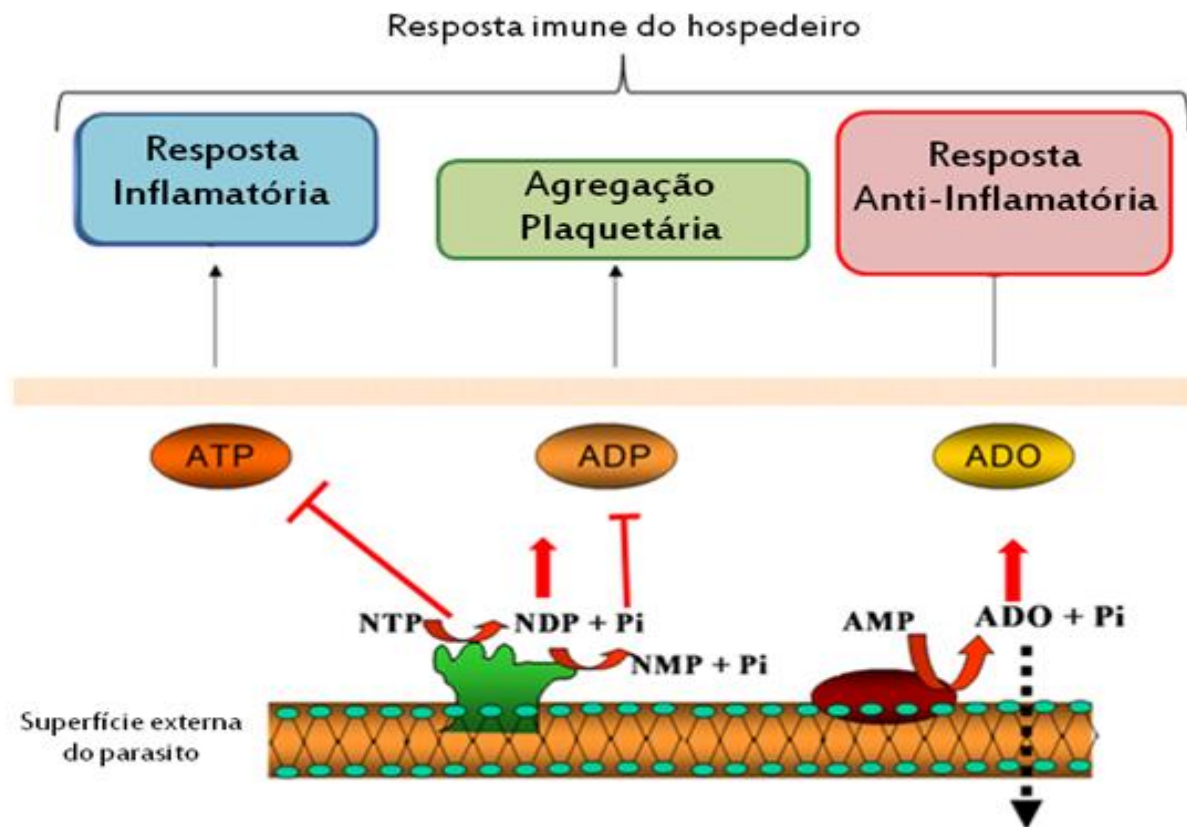


Figura 3. Modelo esquemático da ação das ecto-nucleotidasas na modulação da resposta a nucleotídeos extracelulares no hospedeiro. As NTPDases (verde) e a 5'-nucleotidase (vermelho) da superfície do parasito modulam a concentração de nucleotídeos e seus derivados no micro-ambiente de interação parasito-célula hospedeira influenciando as respostas dependentes de ATP, ADP e adenosina. Setas vermelhas indicam aumento da produção com conseqüente ativação da sinalização e linhas com barras vermelhas indicam inibição da resposta por degradação do sinalizador. A seta tracejada indica a captação de purinas. (Adaptação de uma figura produzida por Juliana Lopes Rangel Fietto)

2.3 Polimorfismos de base única - SNP's

Em 1990, o projeto genoma humano foi lançado na América. O objetivo do projeto foi identificar e caracterizar todos os 30.000 genes no DNA humano, determinando a seqüência química de três bilhões de pares de bases no genoma humano (Harley e Narod, 2009). Quando o projeto foi concluído, foi confirmado que quaisquer dois indivíduos são mais de 99% idênticos na sua seqüência de DNA. Porém, existe muita variação entre os indivíduos. Polimorfismos de base única (Single nucleotide Polymorphism - SNP) estão entre as fontes mais comuns de variação no genoma humano. Classes alternativas de polimorfismo no DNA incluem os

microsatélites, variantes de números de cópias (CNVs), inserção/exclusão e mutações (Orr e Chanock, 2008).

Os SNPs são alterações genéticas de um único par de bases no DNA genômico de populações em que o alelo menos freqüente tem uma abundância de 1% ou mais (Risch N.J., 2000). Em outras palavras, são variantes de DNA, em que, em algum momento durante a evolução, um único nucleotídeo em uma posição fixa no genoma foi substituído por outro nucleotídeo. Ocorre um SNP aproximadamente uma vez a cada 1200 pares de bases (Carlson e cols, 2003). É o tipo de polimorfismo mais abundante, aproximadamente 90% dos polimorfismos existentes são SNPs (Collins e cols, 1997).

Os SNPs são muito utilizados como marcadores moleculares de predisposição do indivíduo a certos tipos de doenças, dentre elas o câncer, ou ainda como alvos terapêuticos no desenvolvimento de novas drogas (Vignal, A., 2002).

A maioria dos SNPs (75%) ocorre na região não codificante do genoma humano. Dos 25% que ocorrem nas regiões que codificam genes, 50% geram códons não sinônimos, ou seja, que resultam em um aminoácido alterado, os 50% restantes geram códons sinônimos, resultando em uma alteração de nucleotídeos, mas por causa da degeneração do código genético, estas não têm efeito sobre a seqüência de aminoácidos (Cargill e cols, 1999; Halushka e cols, 1999). Dessa forma, se a mutação pontual gerar a alteração de uma base que mantém o códon sinônimo, os SNPs são denominados silenciosos, pois não alteram a composição de aminoácidos da proteína resultante. Variantes não sinônimas podem alterar a função do gene devido a mudança na seqüência de um gene, que resulta num aminoácido diferente. A teoria de que SNPs silenciosas nada alteram no produto final está sendo desfeita. Em alguns casos, os SNPs sinônimos podem também alterar a função do gene caso ocorram em regiões promotoras ou nos limites íntron-éxon, que constituem sítios para ligação de enzimas, afetando assim, o splicing do RNA e o produto final (Harley e Narod, 2009). De acordo com Kimchi-Sarfatey e cols, 2007, os SNPs silenciosos podem afetar o dobramento das proteínas *in vivo* e conseqüentemente afetar sua função. Isso porque os polimorfismos geram alterações na freqüência para códons raros, podendo assim retardar o tráfego do ribossomo pelo mRNA nas regiões correspondentes. Experimentos de mutagênese de códons sinônimos em determinados genes também apóiam a hipótese de que uma cinética de tradução alterada do mRNA pode afetar a conformação final da proteína.

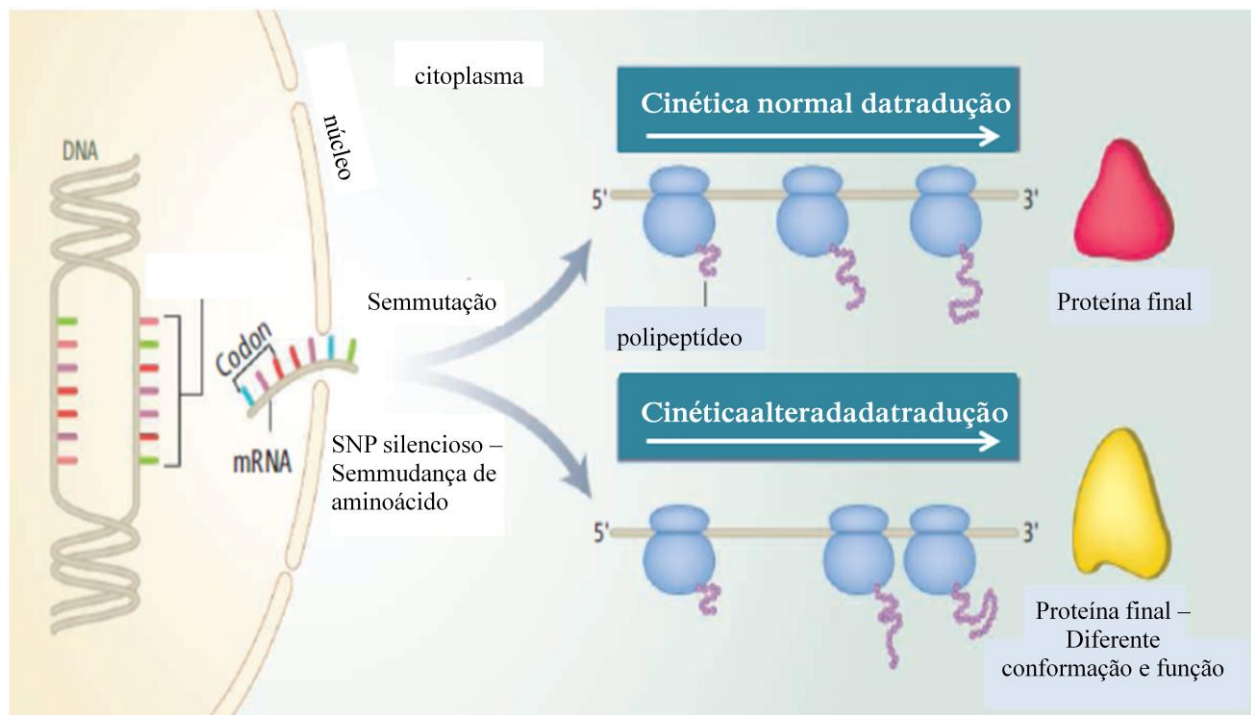


Figura4–Cinética da tradução e dobramento proteico. Uma cinética não afetada gera uma proteína dobrada corretamente, com sua atividade e função normal. Uma cinética de tradução anormal, fazendo com que o ribossomo se mova de forma mais rápida ou mais lenta pelo RNAm, pode produzir uma proteína final com conformação diferente (Adaptado de Komar, 2007).

Estima-se que existam de 50000 a 250000 SNPs que possuem algum efeito biológico em um ou mais dos cerca de 30000 genes humanos (Risch N.J., 2000).

SNPs em regiões codificantes e regiões regulatórias são mais susceptíveis de afetar a função do gene (Collins e cols, 1997.; Chakravarti, 1998). Em 2011, Kripke e cols investigaram a influência de SNPs na região promotora de uma enzima da via de síntese da melatonina a partir da serotonina e observaram uma relação, ainda que não tão forte, mas significativa, com a depressão. Mutações pontuais do tipo SNPs podem alterar uma proteína de modo a ativá-la ou suprimi-la. Seu efeito no produto do gene pode ser positivo (benéfico) (Pulchinelli. A. Jr., 2011) ou negativo (Kripke. D.F., 2011). No caso de uma enzima, a presença do SNP pode aumentar ou diminuir sua atividade, influenciando toda a fisiologia com a qual a enzima esteja envolvida (Esaki e cols, 2012; Dahgam e cols, 2012).

2.4 NTPDases de *Leishmania* e SNPs

Existem mapeados dois genes de E-NTPDases de *L. braziliensis*, NTPDase-1 e NTPDase-2 com 2076 e 1278 pares de base, respectivamente. Devido a intempéries no decurso das atividades laboratoriais, no presente trabalho apenas a isoforma menor foi analisada, embora desdobramentos desse trabalho incluam a análise também da isoforma maior.

Resultados preliminares não publicados (Talles Eduardo Ferreira Maciel e Ramon de Freitas Santos) oriundos da técnica do RNA-seq, revelaram a presença de SNPs nas sequências mensageiras de ambos os genes. Acredita-se que estes SNPs possam ter alguma influência sobre a atividade destas enzimas e, conseqüentemente, exercer influência em processos em que a enzima está envolvida, como descrito no tópico 2.2. O intuito desse trabalho é justamente verificar se há e quais são os SNPs presentes na região codificante do gene da NTPDase-2 e analisar possíveis influências.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Analisar os SNPs no gene da E-NTPDase-2 de *Leishmania braziliensis* e verificar possíveis correlações com a atividade ecto-ATPDásica e com a biologia da cepa ET.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Estratégia 1 - Identificação e quantificação das possíveis isoformas de E-NTPDase-2 codificadas no genoma do isolado ET

- isolar a região codificante do gene E-NTPDase-2 por PCR em DNA genômico da cepa ET;

- clonar os produtos de PCR em plasmídeo de amplificação;

- sequenciar completamente os genes de colônias isoladas a fim de avaliar toda a diversidade de E-NTPDase-2 e sua abundância;

- verificar se existe abundância diferencial entre as isoformas possíveis nos isolados para verificar se há predominâncias específicas de clones e se isto pode se correlacionar com o comportamento biológico diferencial de isolados clonais da cepa ET;

3.2.2 Estratégia 2 - Seleção clonal do parasito com posterior análise molecular

- isolar clones de parasitos vindos de cultura da cepa ET por diluição limitante;

- caracterizar os clones em relação a atividade ATPDásica in vivo;

- isolar, por PCR, e analisar molecularmente o gene da E-NTPDase-2 dos clones;

- estocar o banco de clones de isolados de ET para futuros trabalhos.

4. Material e Métodos

4.1 Estratégia 1- Identificação e quantificação das possíveis isoformas de E-NTPDase-2 codificadas no genoma da cepa ET

4.1.1 Isolamento do DNA genômico

Um total de aproximadamente 5×10^7 parasitos, cultivados a 25°C em meio Grace's (Sigma) [suplementado com soro fetal bovino inativado (10%), L-glutamina (2mM) e penicilina (20µg/mL), pH 6,5, filtrado em filtro de 0,22µm] – todas as vezes que o meio Grace's completo for citado, será com a mesma constituição – foram contados em câmara de Neubauer, utilizando formalina a 4% para fixação do parasito, e recolhidos por centrifugação a 1400g por 10 minutos para extração do DNA genômico, utilizando o kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System da Promega. O DNA foi eluído em 20µL de água milli-Q autoclavada e estocado a - 20°C. O procedimento foi realizado para a cepa ET de *L. braziliensis*.

4.1.2 Isolamento do gene da NTPDase-2 por PCR

O DNA genômico obtido foi utilizado para isolamento do gene da NTPDase-2 utilizando-se primers previamente desenhados, cujas sequências se encontram na tabela abaixo. A polimerase utilizada foi a *Pfu* polimerase de alta fidelidade segundo manual do fabricante, Fermentas. O programa usado e a constituição da reação (volume total de 50µL) possuem as seguintes configurações:

Programa PCR

Programa PCR	
Temperatura - °C	Tempo (min)
94 °C	5
94 °C	0,5
60 °C	0,5
72 °C	1,5
72 °C	5
4 °C	∞ - hold

Constituição da reação de PCR	
Componente	Volume
Tampão <i>Pfu</i> + MgSO ₄	5 µL
Primer Forward [10 pmol/ µL]	2 µL
Primer Reverse [10 pmol/ µL]	2 µL
Template	1 µL
dNTPs [10 mM]	1 µL
<i>Pfu</i> polymerase []	0,5 µL
Água	38,5 µL

O DNA foi analisado em gel de agarose 1%. Após a eletroforese o gel foi corado em solução contendo brometo de etídeo por 10 minutos, visualizado em luz ultravioleta e fotografado.

Sequência dos primers*			
Reverse	5'	TATAAGCTTTCCATCTTGAGCACGAAG	3'
Forward	5'	GCTAGCATGCGACCGTACTCCTCAGTGC	3'

*o desenho dos primers foi baseado na sequência do banco de dados, cuja origem é *L. braziliensis* clone M2904 (MHOM/BR/75M2904). Espera-se, com esses primers, amplificar a região codificante do gene, que possui 1278 pares de bases.

4.1.3 Purificação da PCR, ligação e transformação

O produto da PCR, obtido no passo anterior, foi purificado a partir do gel de agarose 1% utilizando o kit PureLink™ Quick Gel Extraction Kit segundo o manual do fabricante e eluído com 25 µL de água milli-Q autoclavada. Para confirmação do procedimento, uma alíquota de 3 µL foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1%. Após a eletroforese o gel foi corado em solução contendo brometo de etídeo por 10 minutos, visualizado em luz ultravioleta e fotografado. O amplicon purificado foi utilizado para ligação (na razão inserto/vetor de 3:1) no vetor pJET, segundo o manual CloneJET™ PCR Cloning Kit da Fermentas. Após a ligação do gene no vetor, a cepa TOP10 de *E. coli* (tornada competente por meio de CaCl₂, segundo Sambrook e cols, 1989.) foi utilizada para transformação química por choque térmico.

4.1.4 Isolamento de colônias

Após a transformação, as células foram crescidas em 750 µL meio LB e após 40 minutos de incubação a 37 °C e a 180 rpm foram plaqueadas em LB-sólido contendo ampicilina na concentração de 0,1 mg/mL, a fim de se obter colônias transformantes isoladas.

4.1.5 Extração do DNA plasmidial e sequenciamento

As colônias isoladas foram crescidas em 3 mL de meio LB contendo ampicilina na concentração de 0,1 mg/mL por 16 horas a 37 °C e a 180 rpm. O volume crescido foi centrifugado a 12000 g e em seguida foi extraído o DNA plasmidial contendo o gene da

NTPDase, utilizando o método fenol-clorofórmio, segundo Sambrook e cols, 1989, sendo que o DNA plasmidial foi eluído em 20µL de água milli-Q autoclavada. Para confirmação da clonagem, foram realizados ensaios de digestão por 2 horas a 37°C utilizando a enzima *Bgl*II e tampão O, ambos da Fermentas. A reação de ligação possuía a seguinte composição, num total de 20 µL:

Componente	Volume
Água nuclease-free	16 µL
Tampão O 10X	2 µL
<i>Bgl</i> II	1 µL
Plasmídeo	1µL

A enzima *Bgl*II cliva o vetor pJET em sítios antes e depois do sítio de inserção do produto de PCR, conforme a figura abaixo. Dessa forma não foi necessária a utilização de uma segunda enzima. Tanto as amostras da extração de DNA plasmidial quanto os produtos das reações de digestão foram analisados em gel de agarose 1%. Após a eletroforese o gel foi corado em solução contendo brometo de etídeo por 10 minutos, visualizado em luz ultravioleta e fotografado.

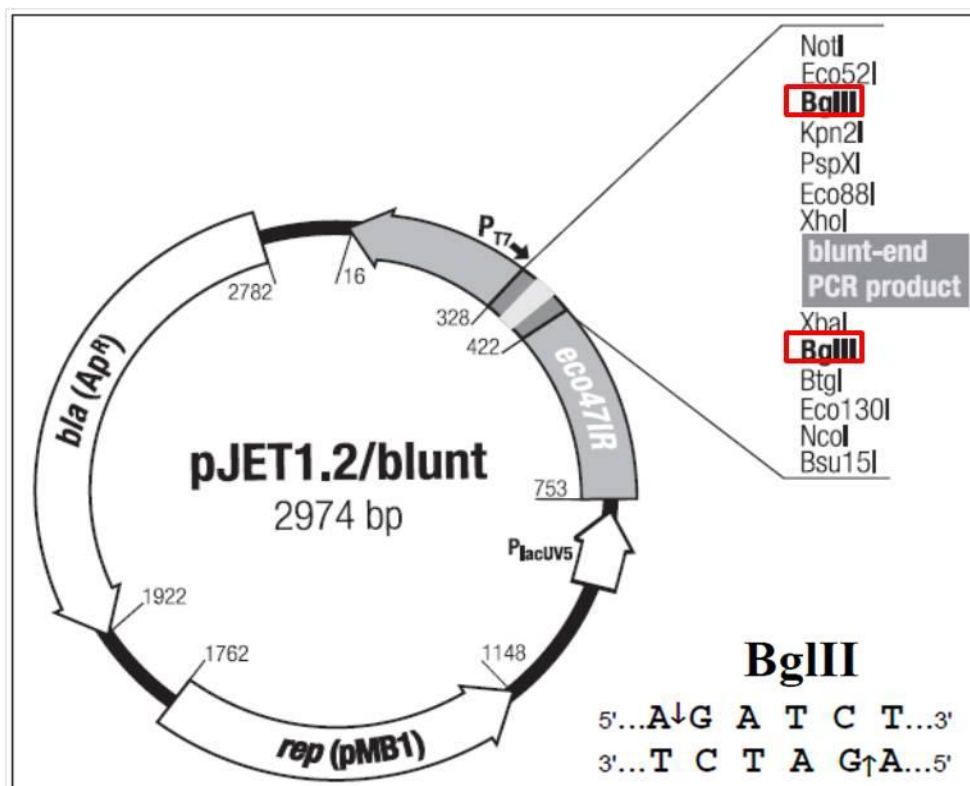


Figura 5 – Mapa do vetor pJET1.2/blunt e o sítio de clivagem da *Bgl*II, mostrando que a enzima cliva em ambos os lados do sítio de inserção do produto de PCR (Manual do pJET1.2/blunt vector e da *Bgl*II, ambos da Fermentas).

4.1.6 Verificação dos diferentes SNPs no gene da NTPDase-2 e análise da abundância de genes polimórficos

O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Sequenciamento de DNA, no subsolo do BIOAGRO, utilizando o aparelho Megabace 1000, seguindo a metodologia de Sanger. As sequências completas do gene da NTPDase-2 da cepa ET, foram analisadas para a verificação dos polimorfismos moleculares, utilizando os programas Sequencher 4.1.4 e MEGA 5.05. No Sequencher 4.1.4 as sequências foram editadas, sendo analisados os cromatogramas e estes conferidos com a sequência dada a fim de se obter, dentro do possível, as sequências consenso corretas. No programa MEGA 5.05, as sequências consenso foram alinhadas utilizando como referência a sequência da NTPDase-2 do banco de dados, para que pudesse ser observada a presença de SNPs. Com os genes polimórficos sequenciados, foi analisada a abundância das SNPs e a frequência destes nos genes. Após a obtenção das sequências consenso das colônias, esta foi traduzida para que se pudesse observar a sequência de aminoácidos e notar se houve alguma alteração nesta, este procedimento foi realizado utilizando-se o programa MEGA 5.05.

4.2 Estratégia 2- Seleção clonal do parasito com posterior análise molecular

4.2.1 Cultivo de *Leishmania braziliensis* das cepas ET

Os parasitos na oitava passagem foram descongelados e cultivados em meio Grace's completo a 25 °C por sete dias. Após esse tempo fez-se um repique com 1×10^5 células em 10 mL de Grace's.

4.2.2 Isolamento dos clones por diluição limitante e congelamento

Após cinco dias, sendo observado um bom crescimento da cultura após o repique, as células foram contadas em câmara de Neubauer, utilizando formalina a 4% para fixação do parasito, e uma alíquota contendo aproximadamente 20000 células foi colocada no poço A1, de uma placa de 96 poços. Foram feitas diluições de 2X ao longo

da coluna A e após toda a coluna estar preenchida, as diluições foram realizadas no restante da placa conforme a figura 7, onde o número representa a quantidade aproximada de células por poço. Todas as diluições foram feitas com meio Grace's estéril, restando um volume final de 100 μ L.

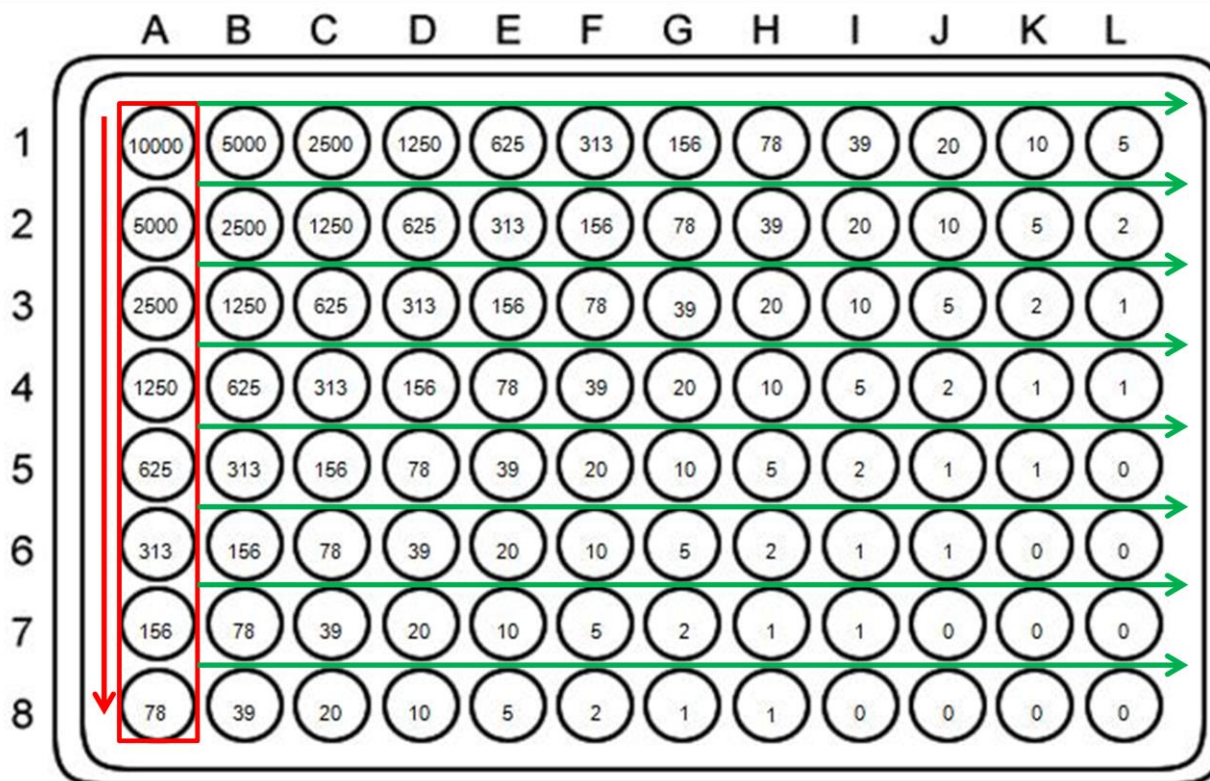


Figura 6 – Diluição limitante. Os números nos poços correspondem à quantidade de células por poço. A seta vermelha indica a primeira diluição, na coluna A. As setas verdes indicam a diluição seguinte, a partir da primeira coluna.

Todo o volume dos poços contendo teoricamente uma ou zero célula foi transferido para uma placa de 21 poços contendo 1 mL de Grace's e incubado a 25°C por 10 dias. Após esse tempo, dos poços onde foi observado o crescimento de clones, foi retido todo o volume e transferido para uma placa de 6 poços, com cada um contendo 7 mL. Após a observação de um bom crescimento, 5×10^6 células foram contadas em câmara de Neubauer e foram estocadas em nitrogênio líquido para serem usados nos experimentos posteriores. Para o congelamento foi utilizado o meio de congelamento [DMSO 15%, soro fetal bovino inativado 20% em meio Grace's base (meio Grace's dissolvido em água, segundo o manual do fabricante, pH 6,5). Sendo tudo filtrado em filtro de 0,22 μ m]. O congelamento foi realizado em 4 etapas: 1) 1 hora na geladeira; 2) 24h no freezer - 20°C; 3) 24h no freezer -80°C; 4) nitrogênio líquido.

4.2.3 Coloração pelo método do Giemsa

O esfregaço de parasitos foi fixado com álcool metílico P.A., em seguida foi adicionada a solução de Giemsa (1 mL de Giemsa, 1 mL de álcool metílico, 0,1 mL de Na₂CO₃ 0,5%, qsp. 20 ml de água destilada) e após 20 minutos as lâminas foram lavadas em água destilada e incubadas a temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos, até secarem. Depois foram observadas no microscópio sob aumento de 100X.

4.2.3 Curva de crescimento dos clones

Foi realizado um repique com um total de 1×10^5 células em triplicata para que fosse feita uma curva de crescimento de cada clone. Por nove dias, diariamente as células foram contadas em câmara de Neubauer.

4.2.4 Medida da atividade ecto-nucleotidásica “*in vivo*”

Os clones estocados foram descongelados e expandidos em meio Grace`s. Após 7 dias foi feito um repique para que a atividade ecto-nucleotidásica fosse ser mensurada nos parasitos vivos na fase exponencial (quinto dia após o repique). A atividade foi mensurada através da quantidade de fosfato inorgânico liberado. Os parasitos foram lavados três vezes com salina e suspensos, na concentração de $1,3 \times 10^7$, em tampão de atividade (116 mM de NaCl, 5.4 mM de KCl, 5.6 mM de glicose, tampão Hepes-Tris 50 mM, pH 7.2 e 5 mM de MgCl₂). Foi então preparada a reação com 25 µL do tampão de atividade 5X, 20 µL da suspensão de parasitos ($2,6 \times 10^5$ parasitos/poço) e 55 µL de água. A placa foi incubada a 37°C e a reação foi disparada com a adição de 25 µL de ATP ou ADP a 25 mM, e permaneceu incubada por 20 minutos. Após esse tempo a reação foi parada com a adição de 125 µL de HCl 0,2 M. Para os brancos, foi feito o mesmo procedimento, com a diferença que o substrato foi adicionado após a reação ser parada. A placa foi então centrifugada a 1300 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Um volume de 30 µL do sobrenadante foi transferido para outra placa e foi adicionado 150 µL do tampão de atividade e 40 µL do reagente colorimétrico verde de malaquita (verde de malaquita 0,2% e molibdato de amônio 10%,

na proporção de 3:1, ambos solubilizados em HCl 4%,) (Tausky e cols, 1953). A placa foi encubada por 10 minutos a temperatura ambiente e então foi feita a leitura das absorvâncias dos testes, brancos e curva padrão, sob comprimento de onda de 650 nm. O experimento foi realizado três vezes, em triplicata para os clones e duplicata para os brancos, em placas de 96 poços. A curva padrão foi feita utilizando concentrações conhecidas de fosfato.

4.2.5 Isolamento do DNA genômico, isolamento do gene da NTPDase-2 por PCR, purificação da PCR, ligação e transformação em *E. coli* TOP 10, isolamento de colônias, extração do DNA plasmidial e sequenciamento.

Esses passos foram realizados de forma semelhantes aos passos 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4 e 3.1.5, sendo que a diferença básica é que nessa estratégia 2 cada passo foi feito pra cada clone. As seqüências polimórficas foram comparadas com os dados obtidos na estratégia 1 e com os perfis de atividade enzimática dos clones a fim de verificar a existência de correlações positivas ou negativas em ambos.

5. Resultados e Discussão

5.1 Estratégia 1- Identificação e quantificação das possíveis isoformas de E-NTPDases-2 codificadas no genoma do isolado ET

5.1.1 Isolamento do DNA genômico

O DNA genômico (DNAg) da cepa ET de *L. braziliensis* foi isolado por meio de kit. A figura 8 revela uma banda única com um arraste gerado pela degradação de parte do DNAg. A banda foi visualizada acima da maior banda do marcador, de 10000 kb, evidenciando assim que o DNA isolado é genômico.

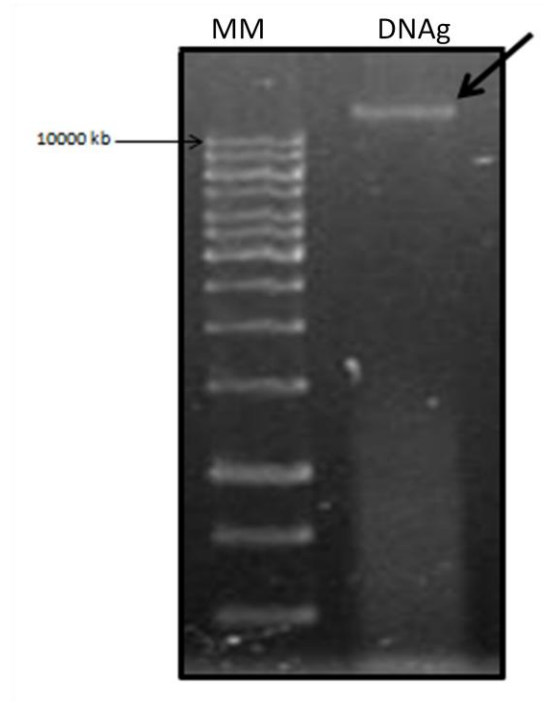


Figura7 - DNA genômico do isolado ET. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A seta maior indica a banda referente ao DNAg do isolado ET. MM indica o marcador molecular, cuja maior banda possui 10000 kb, conforme mostrado.

5.1.2 Isolamento do gene da NTPDase-2 por PCR e sua purificação

O DNAg isolado no passo anterior foi utilizado como molde para amplificar a região codificante do gene da NTPDase-2. O amplicon obtido foi purificado a partir do gel

de agarose 1% utilizando kit. Como pode ser visto na figura 9, foi possível a obtenção do amplicon. Observa-se que ele possui entre 1000 e 1500 pares de bases, confirmando a purificação da região codificante do gene da NTPDase-2 que possui 1278 pares de bases.

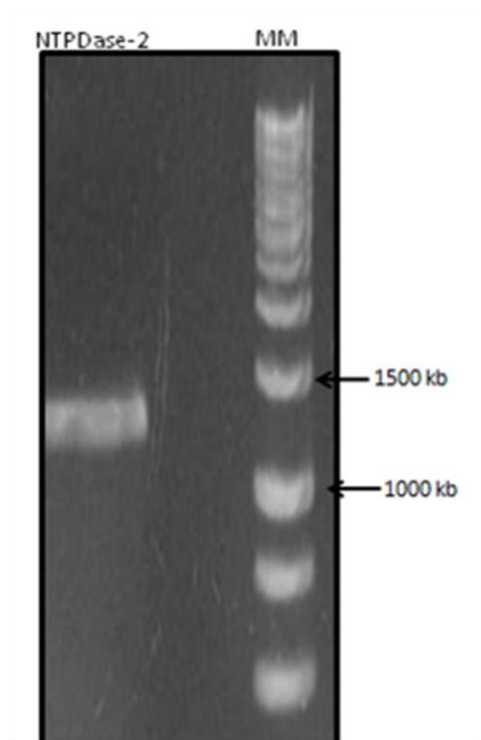


Figura 8 – Amplificação da região codificante da NTPDase-2. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. À esquerda observa-se a banda referente ao amplicon situada entre as bandas de 1000 e 1500 kb (indicadas na figura) do marcador molecular.

5.1.5 Extração do DNA plasmidial e confirmação da ligação por digestão

O amplicon obtido no passo anterior foi utilizado para ligação no vetor pJET a fim de que fossem transformados em *E. coli* TOP10 competentes. Após a transformação, foi feito plaqueamento para que das colônias isoladas fosse extraído o DNA plasmidial para confirmar a ligação e posteriormente ser utilizado para sequenciamento. Na figura 10 observam-se os diferentes padrões de bandas, sugerindo a existência de colônias diferentes em relação ao vetor clonado, podendo não haver vetor com inserto em algumas. A inserção ou não do amplicon no vetor foi confirmada por meio de digestão utilizando a enzima *Bgl*II, que cliva o vetor em sítios localizados anterior e posteriormente ao sítio de clonagem. A figura 11 confirma os diferentes padrões de banda visualizados na figura 10. Não foi confirmada a ligação em todas as colônias isoladas. Devido a falha no sistema de seleção do pJET, que expressa uma enzima letal

quando fechado sem inserto (Manual CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Scientific), nem todas as colônias isoladas possuíam o inserto, sendo que das 68 isoladas, apenas foram positivas as colônias 16, 21, 22, 43, 49, 52, 54, 55, 57, 59, 60, 64 e 65.

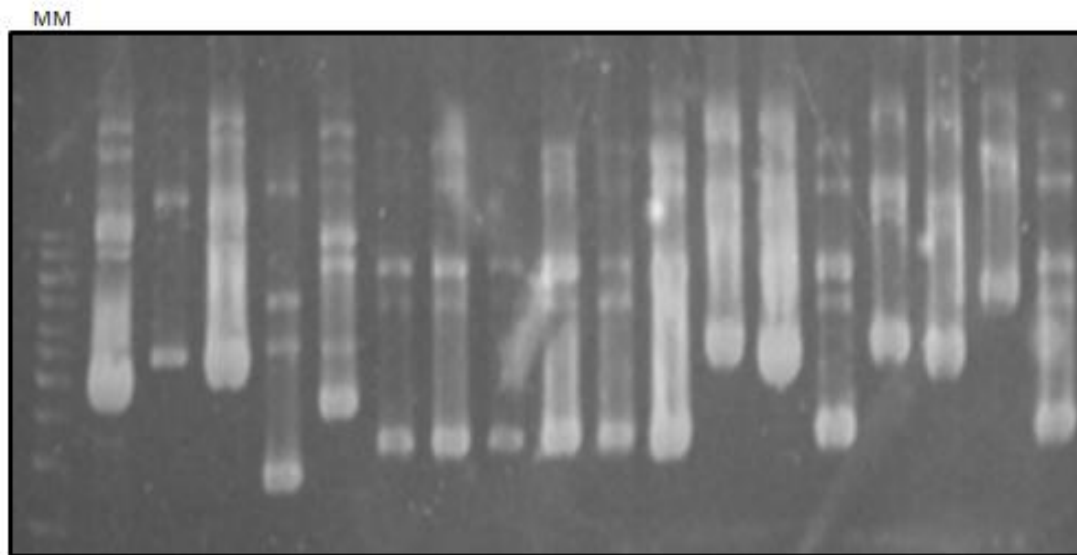


Figura 9 – Extração do DNA plasmidial das colônias isoladas. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Diferentes padrões de bandas sugerem que as colônias sejam diferentes em relação aos insertos clonados. O Marcador molecular está localizado a esquerda, sendo identificado sobre a figura, MM.

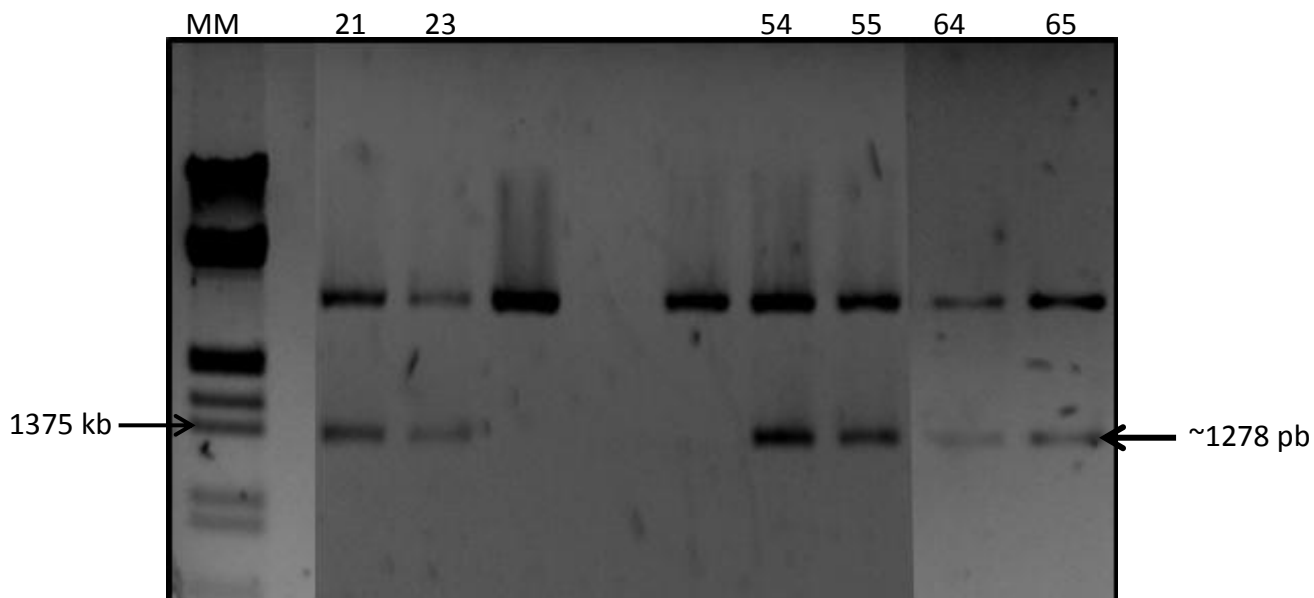


Figura10 – Confirmação da ligação por digestão. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Digestão do DNA plasmidial revela bandas com tamanho aproximado do inserto (1278), certificando o sucesso da ligação em algumas colônias. Na figura estão indicados o marcador e sua banda correspondente a 1375 pares de bases e a parte digerida contendo o amplicon purificado mostrado na figura 8. As bandas superiores são referentes ao plasmídeo clivado e sem o inserto. MM corresponde ao marcador molecular e os números são referentes às colônias de onde foram extraídos os DNA plasmidiais para a digestão.

5.1.6 Verificação dos diferentes SNPs no gene da NTPDase-2 e análise da abundância de genes polimórficos

Os plasmídeos das colônias confirmadas como positivas para a clonagem da NTPDase-2 foram sequenciados pelo método de Sanger. No programa Sequencher 4.1.4 as sequências foram inspecionadas manualmente e editadas (para retirada de regiões de vetor, confirmação das bases) e as sequências consenso obtidas foram alinhadas no MEGA 5.05 por meio do programa ClustalW. Em ambos os procedimentos, tanto edição quando alinhamento, foi utilizada como referência a sequência contida no banco de dados [*Leishmania braziliensis* clone M2904 (MHOM/BR/75M2904) – no alinhamento denominada “Lb bd”]. O resultado completo do alinhamento está apresentado no anexo 1, onde os pontos representam bases idênticas às da referência, e os traços, bases não obtidas pelo sequenciamento.

Como se pode observar no alinhamento das sequências consenso, não foi possível obter por completa as sequências de todas as colônias. De forma geral, a região 3’ necessita ser ressequenciada para que a sequência possa ser inteiramente obtida e posteriormente analisada. De forma semelhante, a região 5’ da colônia E_21. Foram encontrados, em todas as sequências obtidas, apenas dois SNPs. Na posição 861, a base G foi trocada pela base A e na posição 879, a base A foi trocada por uma base G, como observado na figura 12 abaixo.

Lb_bd	AGGCATACGGAACACCTGAATGGTGTGGAACCTCGAAACGGCGATTCCACGGACTTCGACGTTTGTGTAATCTTTTCGAGAGCACGTC	[900]
E_16A.....G.....	[900]
E_21A.....G.....	[900]
E_22A.....G.....	[900]
E_43A.....G.....	[900]
E_49A.....G.....	[900]
E_52A.....G.....	[900]
E_54A.....G.....	[900]
E_59A.....G.....	[900]
E_60A.....G.....	[900]
E_64A.....G.....	[900]
E_65A.....G.....	[900]

Figura 12 – Região do alinhamento entre as sequências consenso onde se encontram os SNPs comuns a todas as colônias sequenciadas. Os pontos representam bases idênticas às da sequência referência (*Leishmania braziliensis* clone M2904 (MHOM/BR/75M2904) – no alinhamento denominada “Lb bd”). Dados obtidos por meio do alinhamento utilizando o programa ClustalW e o programa MEGA 5.05.

Essas sequências de nucleotídeos foram posteriormente traduzidas, também no programa MEGA 5.05, para verificar se os SNPs encontrados geram alguma alteração

na sequência de aminoácidos. O resultado completo desta análise pode ser observado no anexo 2.

Como mostrado no alinhamento das sequências de aminoácidos, os dois SNPs encontrados e comuns a todas as sequências mostrados na figura 12, não geram alterações na sequência aminoacídica, sendo então classificados como SNPs silenciosos. Como o código genético é degenerado, um aminoácido pode ser codificado por mais de um códon, sendo eles chamados nesse caso de códons sinônimos, que é o caso encontrado nesta análise. Tanto o códon ACG quanto o AC**A** codificam uma tirosina, e tanto códon ATA quanto o códon AT**G** codificam uma valina (os SNPs estão em negrito).

5.2 Estratégia 2- Seleção clonal do parasito com posterior análise molecular

5.2.1 Isolamento de clones do isoladoET de *Leishmania braziliensis*

Os parasitos foram cultivados em meio Grace's acrescido de 10% de SFB e foi observado um bom crescimento cinco dias após o repique para que pudesse ser feita a diluição limitante, onde foram obtidos 5 clones, nomeados de acordo com o poço onde cresceram, sendo eles: D12, F9, G8, G9 e G11.

Depois de expandidos e criopreservados, foi feita uma coloração por Giemsa, para que cada clone pudesse ser observado sob a objetiva de 100X (figura 13) na tentativa de se identificar alguma diferença na morfologia geral dos clones. Essa diferença não foi possível ser claramente detectada porque dentro de uma mesma população clonal há indivíduos com morfologias diferentes. Entretanto o clone G9 possui indivíduos que aparentam ser um pouco mais volumosos que os demais clones. Para que tal análise obtenha melhor resultado, seria necessário fazer uma microscopia eletrônica observando-se parasitos com morfologias semelhantes de cada clone.

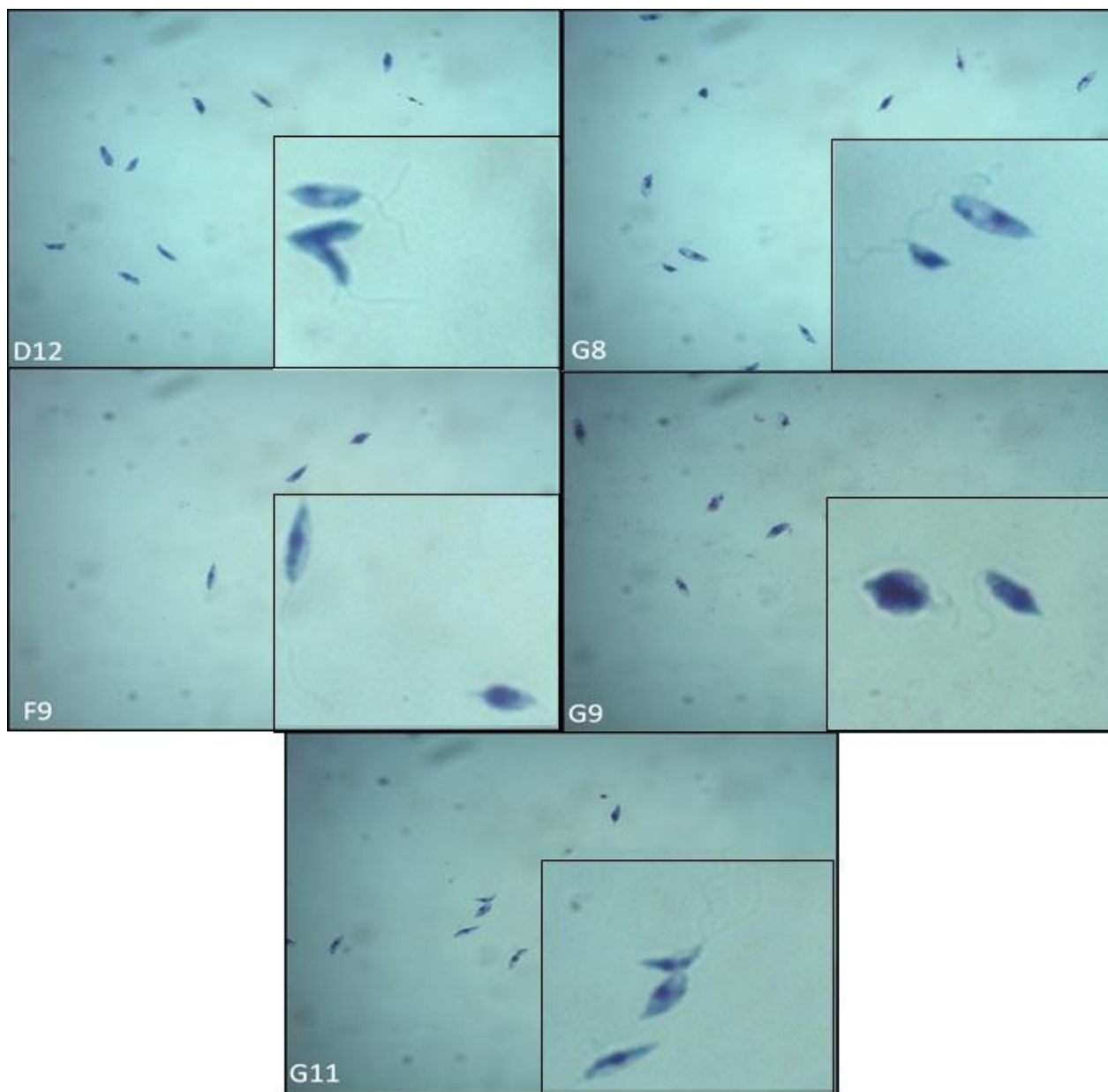


Figura113 – Clone isolados da cepa ETcultivado em meio Grace's acrescido de 10% de SFB. Visualizado sob aumento de 100x em microscópio invertido. Dentro da imagem de cada clone mostra-se um aumento maior afim de comparação entre os clones.

5.2.2 Curva de crescimento dos clones

Os clones foram crescidos (em triplicata) durante nove dias e a cada dia foi monitorada a quantidade de parasitos para que se pudesse fazer uma curva de crescimento de cada a fim de se fazer comparações. Foi observado um crescimento diferenciado entre os diferentes clones. Os clones D12 e F9 obtiveram um crescimento menor que os demais, conforme mostrado na curva de crescimento do gráfico 1.

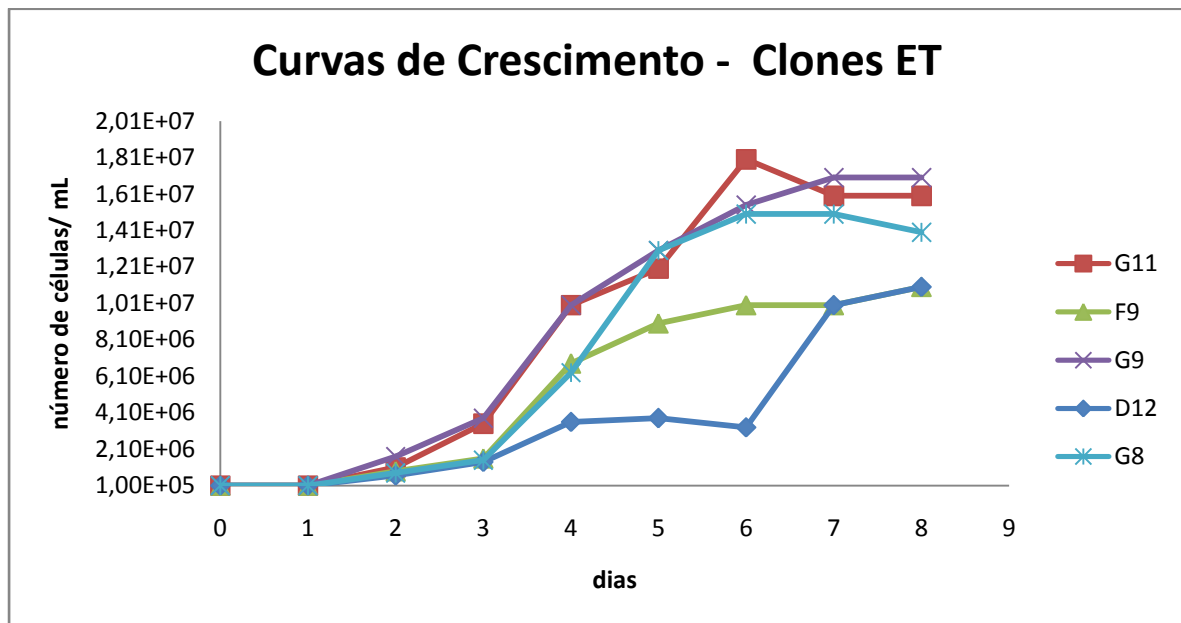


Gráfico 1 –Curva de crescimento dos clones isolados. O experimento foi conduzido em triplicata por nove dias e a cada dia os parasitos foram contados, fixados com solução de formalina 4%. Nota-se a diferença entre o crescimento dos clones D12 e F9 e os demais.

Os diferentes perfis de crescimento podem ser explicados pela atividade ectonucleotidásica que é necessária para que os parasitos possam internalizar metabólitos para fins nutricionais e energéticos por não possuírem a via de síntese de novo (Hammond e Gutteridge, 1984).

5.2.3 Medida da atividade ecto-nucleotídica

Diversos trabalhos correlacionam a atividade ecto-nucleotídica com infectividade, processos de virulência, aquisição de purinas e crescimento de parasitos (Bisaggio e cols., 2003; Berredo-Pinho e cols., 2001; Barros e cols., 2000; Marques-da-Silva e cols., 2008; Santos e cols; Ennes-Vidal e cols, 2011; Porcino e cols,2012). Por estes motivos, a determinação da atividade ecto-ATP e ADPásica se fez necessária. No quinto dia após o repique foi realizado o ensaio de atividade conforme descrito na metodologia, tendo representado no gráfico 2 abaixo o resultado.

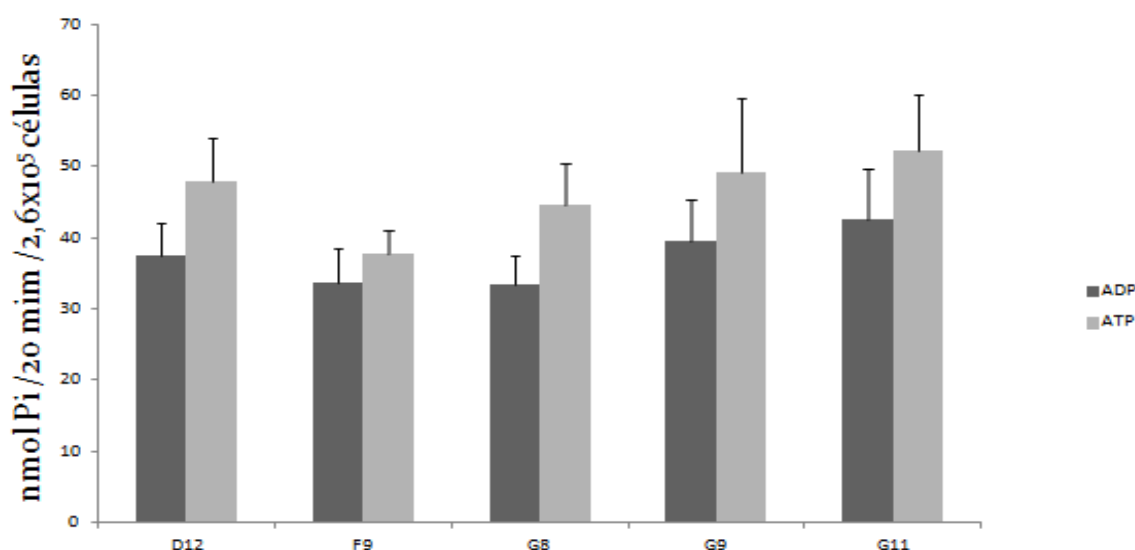


Gráfico 2 – Atividade ecto-nucleotídica (ATP e ADPásica) dos clones isolados da cepa ET cultivados em meio Grace's acrescido de 10% de SFB, por cinco dias após o repique, estando assim na fase exponencial. O experimento foi realizado duas vezes, sendo que em cada vez foi feito em triplicata com $2,6 \times 10^5$ parasitos.. Sobre cada barra de atividade está representado o erro padrão.

Os clones apresentaram atividades diferentes. Por meio do test t de Student ($P < 0,05$) foi possível verificar se há diferença significativa entre as atividades ATP e ADPásica. A tabela 1 resume os resultados obtidos nessa análise e a tabela 2 mostra a razão de hidrólise ATP/ADP que é relacionada com a infectividade do parasito. Em parasitos (*T. cruzi*) menos infectivos, foi observada uma razão próxima de 1. Em parasitos mais infectivos, a taxa chegou a ser de 2 (Fietto e cols, 2004).

ATIVIDADE ATPásica		ATIVIDADE ADPásica	
Relação de clones	Diferença Significativa (Test t de Student)	Relação de clones	Diferença Significativa (Test t de Student)
D12-F9	Sim	D12-F9	Não
D12-G8	Não	D12-G8	Não
D12-G9	Não	D12-G9	Não
D12-G11	Não	D12-G11	Sim
F9-G8	Sim	F9-G8	Não
F9-G9	Sim	F9-G9	Sim
F9-G11	Sim	F9-G11	Sim
G8-G9	Não	G8-G9	Sim
G8-G11	Sim	G8-G11	Sim
G9-G11	Não	G9-G11	Não

Tabela1– Resultado do teste t de Student ($P < 0,05$) visando mostrar se há diferença significativa entre as atividades ATP e ADPásica entre os clones.

Clones	Razão de hidrólise ATP/ADP
D12	1.285
F9	1.120
G8	1.334
G9	1.248
G11	1.226

Tabela 2 – Razão de hidrólise ATP/ADP para cada clone.

Existem trabalhos que relacionam a atividade ecto-nucleotidásica com o crescimento celular. Lemmens e cols em 1996 mostraram que tratamento com nucleosídeos tri, di e monofosfatados em cultura de células endoteliais apresentou um efeito proliferativo positivo, observando-se também maior expressão de ecto-enzimas que possuem nucleotídeos como substrato. Bernardes e cols, 2010, observaram uma redução da proliferação celular utilizando um inibidor de ecto-ATPase em culturas de *T. cruzi*.

Há também estudos desse cunho em espécies de *Leishmania*. Utilizando CrATP, um composto que inibe enzimas que utilizam o complexo MgATP como substrato (lembrando que NTPDases são Mg-dependentes - Christoforidis e cols., 1995; Berrêdo-Pinho e cols., 2001), tanto a atividade ecto-nucleotidásica quanto o crescimento celular foram afetados em *L. amazonensis* (Ennes-Vidal e cols, 2011).

Utilizando anticorpos policlonais contra dois domínios antigênicos e conservados da NTPDase-1, obteve-se uma redução de 79% e 43% nas atividades ecto-ATP e ADPásicas (referentes a NTPDase-1), respectivamente, utilizando formas promastigotas de *L. braziliensis*. Uma redução de 33% foi observada no crescimento desses parasitos quando tratados com os anticorpos policlonais (Porcino, G. N., 2012).

Tendo como base esses dados, era esperado, após a verificação de diferenças no crescimento dos clones, uma maior atividade ecto-nucleotidásica dos clones que mais cresceram. Essa constatação, no entanto, não pôde ser completamente comprovada. Os clones G11 e G9, que apresentaram um crescimento maior que os demais (gráfico 1), obtiveram uma maior atividade com diferença significativa (principalmente o clone G11), mas o clone D12, que mostrou um crescimento menor que os demais, obteve uma atividade maior que o clone F9, com cujo crescimento se assemelha. Esse fato não põe em dúvida a relação entre a atividade ecto-nucleotidásica e a proliferação celular, uma vez que este é um processo complexo que possui muitos mecanismos e fatores que influenciam (Alberts, 2002), onde um deles é a atividade ecto-nucleotidásica.

5.2.4 Isolamento do DNA genômico, isolamento do gene da NTPDase-2 por PCR, purificação da PCR, ligação e transformação em *E. coli* TOP 10, isolamento de colônias, extração do DNA plasmidial e sequenciamento

Com o intuito de se observar SNPs presentes na região codificante do gene da NTPDase-2 de cada clone do isolado ET, todo o procedimento realizado na estratégia 1 foi feito de modo similar nesta estratégia 2.

O primeiro passo, portanto, é a extração do DNAg de cada clone utilizando kit. Na figura 19 notam-se bandas acima da maior banda do marcador, confirmando a extração do DNAg. O DNAg foi utilizado como molde para o isolamento do amplicon relativo a região codificante (1278 pb) do gene da NTPDase-2. O amplicon obtido foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% e posteriormente purificado por meio de kit. Essa purificação é primordial para o passo seguinte, que exige um elevado nível de pureza para que não ocorram clonagens indesejadas. A figura 20 mostra o resultado da purificação. Na primeira canaleta, contendo o marcador, estão mostradas as bandas de 1000 e de 1500 pares de base. A banda que aparece entre estas revela a purificação do amplicon oriundo da reação de PCR.

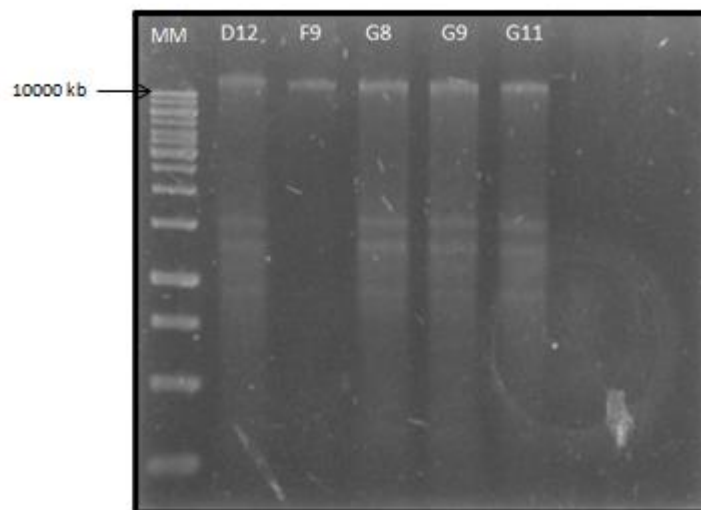


Figura12 – Exxtração do DNA genômico dos clones. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A seta indica a maior banda do marcador (MM), que possui 10000 kb. A ordem dos clones, por canaleta, é mostrada na figura, sendo ela: D12, F9, G8, G9 e G11. A presença das bandas acima da banda de 10000 kb evidencia que o DNA obtido é genômico.

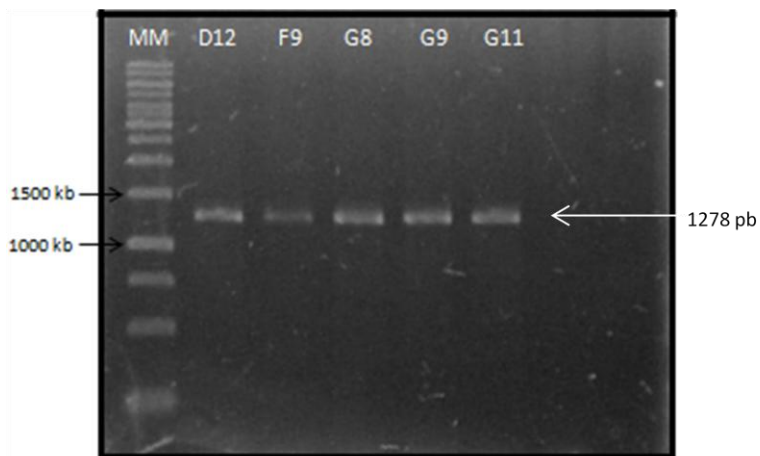


Figura13 – Purificação do amplicon referente à região codificante do gene da NTPDase 2 dos clones isolados por PCR. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. As setas pretas indicam as banda do marcador molecular (MM) de 1000 e de 1500 kb. As bandas referente ao amplicon purificado de cada clone é visualizada nesta sequência: D12, F9, G8, G9 e G11. A confirmação da purificação se dá devido a localização das bandas, sendo que o tamanho do amplicon é de 1278 pb (seta branca).

Os amplicons obtidos e purificados de cada clone (passos anteriores) foram utilizados para clonagem no vetor pJET para que, após a ligação, o vetor fosse transformado em *E. coli* TOP10 competentes. Após a transformação, foi feito plaqueamento com o intuito de isolar colônias para que delas fosse extraído o DNA plasmidial para confirmar a ligação e posteriormente ser utilizado para sequenciamento. Foram isoladas para cada clone, três colônias. Observam-se, na figura 21, bandas com diferentes padrões, caracterizando o DNA plasmidial e confirmando sua purificação. Por meio de digestão utilizando a enzima *Bgl*II, foi confirmado se o amplicon foi ligado ou não ao vetor pJET. A ligação apresentou baixo nível de rendimento, pois foi confirmada a ligação em apenas uma das três colônias isoladas para cada clone. A figura 22 mostra o inserto digerido nas colônias isoladas para cada clone.

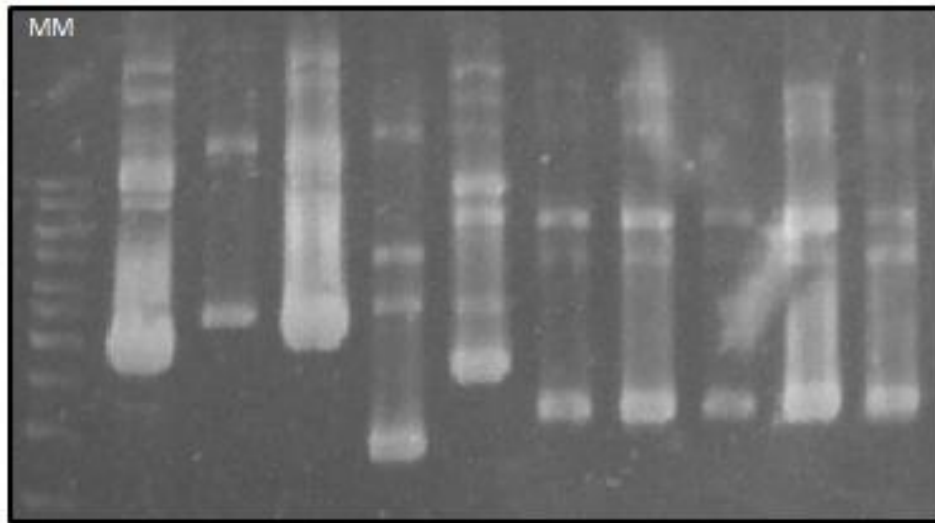


Figura14 – DNA plasmidial purificado das colônias isoladas de cada clone. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Na primeira canaleta está o marcador molecular (MM) e nas seguintes o DNA plasmidial purificado. Os diferentes padrões de banda revelam que existem plasmídeos vazios e com inserto.

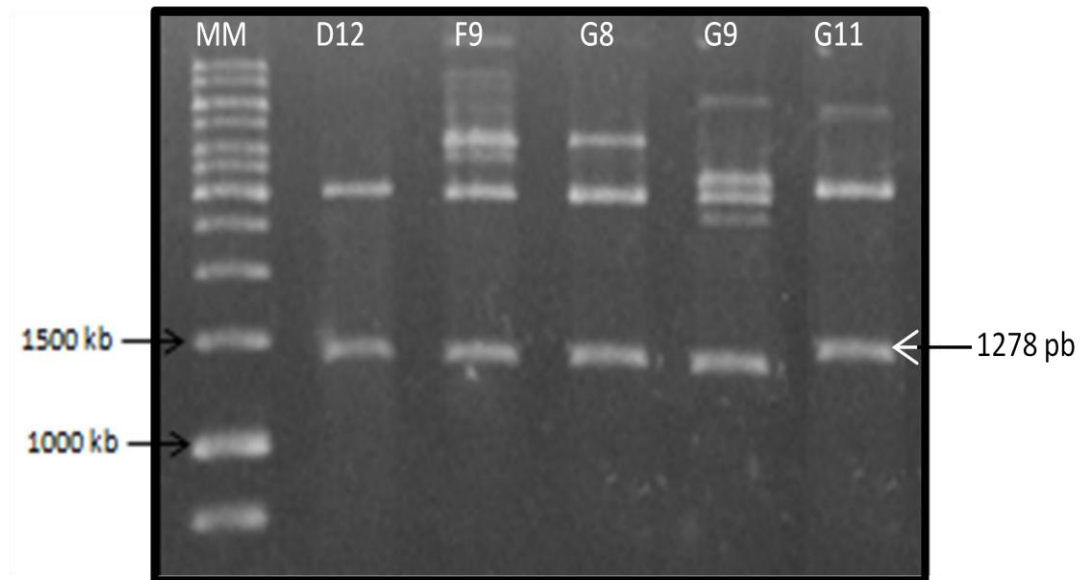


Figura15–Digestão do DNA plasmidial obtido a partir de colônias isoladas de cada clone. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A digestão foi realizada com a enzima *Bgl*III. As bandas obtidas apresentam tamanho que comprova a presença do inserto no vetor, 1278 pb, indicado pela seta a direita. As setas pretas mostram as bandas de 1000 e de 1500 pd do marcador molecular (MM).

As amostras de DNA plasmidial que tiveram a confirmação do inserto foram submetidas a sequenciamento pelo método de Sanger. De forma semelhante à estratégia 1, as sequências foram inspecionadas manualmente e editadas no programa Sequencher 4.1.4 e as sequências consenso adquiridas foram alinhadas no MEGA 5.05 por meio do programa ClustalW. Também foi utilizada como referência, para a edição e para o alinhamento, a sequência contida no banco de dados [*Leishmania braziliensis* clone M2904 (MHOM/BR/75M2904) – no alinhamento denominada “Lb bd”]. O resultado completo do alinhamento está contido no anexo 3.

De forma similar à primeira parte do trabalho, foram encontrados dois SNPs nas posições 861 e 879, com as bases G e A sendo substituídos, respectivamente, pelas bases A e G (figura 23). Na posição 385 há uma indefinição quanto a base (figura 24), representado pela letra M, que significa que a base é A ou C. Para se ter certeza acerca da base correta, é necessário um ressequenciamento. Esse possível SNP pode significar que a amostra sequenciada não estava totalmente pura, podendo ter sido isolada mais de uma colônia no procedimento descrito na seção 3.2.5. Uma outra explicação ainda pode ser a de que foi sequenciado um alelo do gene.

Lb_bd	AGGCATACGGAACACCTGAATGGTGTGGAACCTCGAAACGGCGATTCCACGGACTTCGACGTTTGTGTAATCTTTTTCGAGAGCACGTC	[900]
D12A.....G.....	[900]
F9A.....G.....	[900]
G8A.....G.....	[900]
G9A.....G.....	[900]

Figura 23 – Região do alinhamento entre as sequências consenso das colônias isoladas de cada clone onde se encontram os SNPs comuns a todas as colônias sequenciadas. Dados obtidos por meio do alinhamento utilizando o programa ClustalW e o programa MEGA 5.05.

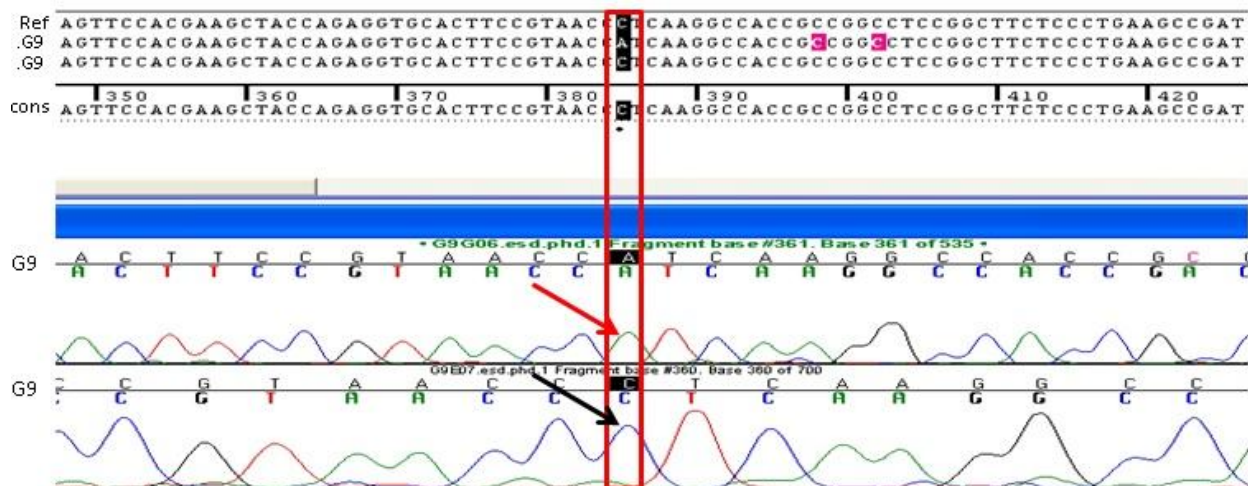


Figura 24 – Região da sequência da NTPDase 2 do clone G9 onde há indefinição acerca da base certa. O pico verde do cromatograma (seta vermelha) é referente à base A e o pico azul (seta preta) referente à base C. A primeira linha, Ref, corresponde à sequência referência, as duas abaixo são as sequências do clone G9 e a quarta, cons, é a sequência consenso. Esta imagem foi obtida pelo programa Sequencher 4.1.4. Para que se tenha certeza de qual é a base certa, deve-se ressequenciar esta amostra.

A sequência de aminoácidos (anexo 4), como esperado, já que as sequências de nucleotídeos foram idênticas às da primeira parte, não foram alteradas. Apenas na posição onde há a indefinição na sequência nucleotídica ocorre também indefinição em relação ao aminoácido códon-referente. Caso a base seja C, o aminoácido não muda, sendo mantida a leucina. Mas se a base correta for a A, o aminoácido resultante é a isoleucina.

Em ambas estratégias, tanto a estratégia 1 quanto a estratégia 2, com exceção da base indefinida (M), o resultado do sequenciamento foi idêntico. Esse resultado leva a crer que não há polimorfismos de base única na região codificante do gene da NTPDase-2. Era esperado, antes do resultado do sequenciamento, que tanto a diferença do crescimento entre os clones quanto a diferença entre as atividades fosse justificada pela presença dos SNPs na região codificante do gene da NTPDase-2. Como observado nas sequências tanto das colônias quanto dos clones, os dois SNPs comprovadamente encontrados são silenciosos, não gerando alteração alguma na sequência primária da NTPDase-2.

Como existem dois genes de E-NTPDases em *L. b.*, as diferenças observadas poderiam ser atribuídas à NTPDase-1, mas tomar isso como explicação seria um tanto simplista. Estudo semelhante a este, buscando SNPs na isoforma maior (NTPDase-1) é, sem dúvida, um trabalho que será realizado a fim de se confirmar se há SNPs e se estas são responsáveis pelas diferenças encontradas entre o crescimento e atividade ecto-nucleotidásica dos clones.

6. Conclusão e Perspectivas

Com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- nas colônias de bactéria que foram isoladas e tiveram o gene sequenciado, foram encontrados dois SNPs;
- nos cinco clones de *Leishmania* isolados também foram encontrados os mesmos dois SNPs;
- os SNPs encontrados são silenciosos, não alterando a sequência aminoacídica da NTPDase-2;
- os clones isolados apresentaram diferença na proliferação, observada na curva de crescimento;
- os clones isolados apresentaram diferença também na atividade ecto-nucleotidásica, sendo que, com exceção do clone D12, nos que foram observado um maior crescimento foi observado também uma maior atividade.

Uma correlação entre proliferação celular e atividade ecto-nucleotidásica foi, em partes, confirmada, corroborando os dados de diversos trabalhos (Lemmens e cols, 1996; Bernardes e cols, 2010; Ennes-Vidal e cols, 2011; Porcino, 2012).

Os clones isolados ainda serão alvos de estudo e a realização de um trabalho semelhante utilizando como objeto de estudo a cepa NSL de *L. b.* também será realizado. Espera-se que nas NTPDases desta cepa ocorram mais SNPs, pelo fato de ela ser mais virulenta que a cepa ET. A presença destes SNPs poderiam justificar a diferença de virulência entre as cepas, bem como entre clones isolados dentro da população desta cepa. Esta é, portanto, a maior perspectiva deste trabalho.

7. Bibliografia

ABBRACCHIO, M.P.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol* 78:113–145. 1998.

AGALLOU, M.; SMIRLIS, D.; SOTERIADOU, K.P.; KARAGOUNI, E. Vaccination with *Leishmania* histone H1-pulsed dendritic cells confers protection in murine visceral leishmaniasis. *Vaccine*. Jun 13. 2012.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFFM.; ROBERTSK.; WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. New York: Garland Science; 2002.

ASAY, T.; MIURA, S.; SIBLEY, D.; OKABAYASHI, H.; TAKEUCHI, T. Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *T. gondii*. *J. Biol. Chem.* 270(19): 11391-11397, 1995.

BALANÍA-FOUCE, R.; REGUERA, R.M.; CUBRÍA, J.C.; ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. *Gen Pharmacol.* Apr;30(4):435-43. 1998.

BARROS, F.S.; DE MENEZES, L.F.; PINHEIRO, A.A.S.; SILVA, E.F.; LOPES, A.H.C.S.; DE SOUZA, W.; MEYER-FERNANDES, J.R. Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in *Entamoeba histolytica*. *Arch of Biochem. biophys.* 375: 304-314, 2000.

BERNARDES, C.F.; MEYER-FERNANDES, JR.; SAAD-NEHME, J.; VANNIER-SANTOS, M.A.; PERES-SAMPAIO, C.E.; VERCESI, A.E. Effects of 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid on *Trypanosoma cruzi* proliferation and Ca(2+) homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol.* May;32(5):519-27. 2000.

BERRÊDO-PINHO, M.; PERES-SAMPAIO, C.E.; CHRISPIM, C.C.M.; BELMONT-FIRPO, R.; LEMOS, P.; MARTINY, A.; VANNIER-SANTOS, M.A.; MEYER-

FERNANDES, J.R. A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. Archives of Biochem.and Biophys. 391: 16-24, 2001.

BISAGGIO, D.F.; PERES-SAMPAIO, C.E.; MEYER-FERNANDES, J.R.; SOUTO-PADRON, T. Ecto-ATPase activity on the surface of Trypanosoma cruzi and its possible role in the parasite-host cell interaction. Parasitology Research. outubro;91(4):273-82, 2003.

BOURS, M.J.; SWENNEN, E.L.; DI VIRGILIO, F.; CRONSTEIN, B.N.; DAGNELIE, P.C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. Pharmacology & Therapeutics. v.112(2), p.358-404, 2006.

CARGILL, M.; ALTSHULER, D.; IRELAND, J.; SKLAR, P.; ARDLIE, K.; PATIL, N.; SHAW, N.; LANE, C.R.; LIM, E.P.; KALYANARAMAN, N.; NEMESH, J.; ZIAUGRA, L.; FRIEDLAND, L.; ROLFE, A.; WARRINGTON, J.; LIPSHUTZ, R.; DALEY, G.Q.; LANDER, E.S. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. Nat Genet. Jul;22(3):231-8. 1999.

CARLSON, C.S.; EBERLE, M.A.; RIEDER, M.J.; SMITH, J.D.; KRUGLYAK, L.; NICKERSON, D.A. Additional SNPs and linkage-disequilibrium analyses are necessary for whole-genome association studies in humans. Nat Genet; 33:518–21. 2003.

CARTER, N.S.; YATES, P.; ARENDT, C.S.; BOITZ, J.M.; ULLMAN, B. Purine and pyrimidine metabolism in *Leishmania*. Adv Exp Med Biol.;625:141-54. 2008.

CHAKRAVARTI, A. It's raining SNPs, hallelujah? Nat Genet 19:216–217. 1998.

CHRISTOFORIDIS, S.; PAPAMARCAKI, T.; GALARIS, D. Purification and properties of human placental ATP diphosphohydrolase. Eur J Biochem, 234: 66-74, 1995.

COLLINS, F.S.; GUYER, M.S.; CHARKRAVARTI, A. Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. Science 278:1580–1581. 1997.

COUTINHO-SILVA, R.; MONTEIRO DA CRUZ, C.; PERSECHINI, P.M.; OJCIUS, D.M. The role of P2 receptors in controlling infections by intracellular pathogens. *Purinergic Signal*. 2007 Mar;3(1-2):83-90. 2007.

DAHGAM, S.; NYBERG, F.;MODIG, L.; NALUAI, A.T.; OLIN, A.C. Single nucleotide polymorphisms in the NOS2 and NOS3 genes are associated with exhaled nitric oxide. *J Med Genet*. Mar;49(3):200-5. 2012.

DE JESUS, J.B.; DE SA PINHEIRO, A.A.; LOPES, A.H.; MEYER-FERNANDES, J.R. An ectonucleotide ATP-diphosphohydrolase activity in *Trichomonas vaginalis* stimulated by galactose and its possible role in virulence. *Z Naturforsch [C]*. Sep-Oct;57(9-10):890-6, 2002.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol*. Sep-Oct;14(5):417-23. 1996.

DI VIRGILIO, F. Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signalling* 1: 205–209, 2005.

DOMBROWSKI, K.E.; KE, Y.; BREWER, K.A.; KAPP, J.A. Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function. *Immunological Reviews*. v.161, p.111-118, 1998.

DOMBROWSKI, K.E.; KE, Y.; LANGSTON, H.P.; KAPP, J.A. The hydrolysis of extracellular ATP provides essential signals for the effector functions activated and immortalized lymphocytes. In Vanduffel (Ed.). *Ecto-ATPases and related ectonucleotidases*. Maastricht: Shaker Publishing. p.145-157, 2000.

DOUA, F.; MIEZAN, T.W.; SANON SINGARO, J.R.; BOA YAPO, F.; BALTZ, T. The efficacy of pentamidine in the treatment of early-late stage *Trypanosoma brucei* gambiense trypanosomiasis. *Am J Trop Med Hyg*. Dec;55(6):586-8. 1996.

ENNES-VIDAL, V.; CASTRO, R.O.;BRITTO, C.;BARRABIN, H.;D'AVILA-LEVY, C.M.;MOREIRA, O.C.CrATP interferes in the promastigote-macrophage interaction in *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitology*.Jul;138(8):960-8. 2011.

ESAKI, S.;MALKARAM, S.A.; ZEMPLINI, J. Effects of single-nucleotide polymorphisms in the human holocarboxylase synthetase gene on enzyme catalysis. *Eur J Hum Genet*. Apr;20(4):428-33. 2012.

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

FISCHER, B. Therapeutic applications of ATP-(P2)-receptors agonists and antagonists. *Expert Opin Ther Patents* 9:385–399. 1999.

FISCHER, M.; GOMESPAES, M.; REINEL, D.; TALHARI, S. Diffuse infiltration of the external ear in a 59-year-old Brazilian patient. "New world" cutaneous leishmaniasis (leishmaniasis tegumentar Americana). *Hautarzt*. May;53(5):342-6. 2002.

GONZÁLEZ, U.; PINART, M.; RENGIFO-PARDO, M.; MACAYA, A.; ALVAR, J.; TWEED, J.A. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis.*Cochrane Database Syst Rev*. Apr 15;(2):CD004834. 2009.

GOTO, H.; LAULETTA LINDOSO, J.A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am*. Jun;26(2):293-307. 2012.

HALUSHKA, M.K.; FAN, J.B.; BENTLEY, K.; HSIE, L.; SHEN, N. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat. Genet*.. 22:239–247. 1999.

HAMMOND, D.J.; GUTTERIDGE, W.E.Purine and pyrimidine metabolism in the *Trypanosomatidae*.*Mol Biochem Parasitol*. Nov;13(3):243-61. 1984.

HANDA, M.; GUIDOTTI, G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). Biochem Biophys Res Commun, 218:916-923, 1996.

HARLEY, I.; NAROD, S. Single nucleotide polymorphisms – variation on a theme. BJOG; 116:1556–1557. 2009.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. The Lancet; 354:1191-9, 1999.

KEDZIERSKI, L.; SAKTHIANANDESWAREN, A.; CURTIS, J. M.; ANDREWS, P.C.; JUNK, P.C.; KEDZIERSKA, K. LEISHMANIASIS: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. Curr Med Chem.;16(5):599-614. 2009.

KIMCHI-SARFATY, C.; OH, J.M.; KIM, I.W.; SAUNA, Z.E.; CALCAGNO, A.M.; AMBUDKAR, S.V.; GOTTESMAN, M.M. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. Science. Jan 26;315(5811):525-8. 2007.

KOMAR, A.A. Genetics. SNPs, silent but not invisible. Science. Jan 26;315(5811):466-7. 2007.

KRIPKE, D.F.; NIEVERGELT, C.M.; TRANAH, G.J.; MURRAY, S.S.; MCCARTHY, M.J.; REX, K.M.; PARIMI, N.; KELSOE, J.R. Polymorphisms in melatonin synthesis pathways: possible influences on depression. J Circadian Rhythms. Aug 9;9:8. 2011.

LANGSTON, H.P.; KE Y.; GEWIRTZ, A.T.; DOMBROWSKI, K.E.; KAPP, J.A. Secretion of IL-2 and IFN- γ , but not IL-4, by antigen-Specific T cells requires extracellular ATP. The J. Immunol. 170(6):2662-70. 2003.

LEITE, P.M.; GOMES, R.S.; FIGUEIREDO, A.B.; SERAFIM, T.D.; TAFURI, W.L.; DE SOUZA, C.C.; MOURA, S.A.; FIETTO, J.L.; MELO, M.N.; RIBEIRO-DIAS, F.; OLIVEIRA, M.A.; RABELLO, A.; AFONSO, L.C. Ecto-Nucleotidase Activities of Promastigotes from *Leishmania (Viannia) braziliensis* Relates to Parasite Infectivity and Disease Clinical Outcome. PLoS Negl Trop Dis. Oct;6(10):e1850. 2012.

LEMMENS, R.; VANDUFFEL, L.; TEUCHY, H.; CULIC, O. Regulation of proliferation of LLC-MK2 cells by nucleosides and nucleotides: the role of ecto-enzymes. *Biochem J.* Jun 1;316 (Pt 2):551-7. 1996.

LEMOS, A.P.; PINHEIRO, A.A.S.; BÊRREDO-PINHO, M.; SOUZA, A.L.F.; MOTTA, M.C.M.; SOUZA, W.; MEYER-FERNANDES, J.R. Ectonucleotide diphosphohydrolase activity in *Crithidia deanei*. *Parasitology Research.* v.88(10), p.905-911, 2002.

MAIOLLI, T. U.; TAKANI, E.; ARANTES, R. M. E.; FIETTO, J. L. R.; AFONSO, L. C. C. Immune response induced by New World Cutaneous *Leishmania*. *Parasitology Research, Parasitol Res.* Oct;94(3):207-12. 2004.

MANQUE, P.A.; WOHLBIER, U.; LARA, A.M.; TENJO, F.; ALVES, J.M.; BUCK, G.A. Identification and characterization of a novel calcium-activated apyrase from *Cryptosporidium* parasites and its potential role in pathogenesis. *PLoS One.*;7(2):e31030. 2012.

Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007.

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

Ministério da Saúde –
http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1560, 20/05/2012.

NAKAAR, V.; BECKERS, C. J.; POLOTSKY, V.; JOINER, K. A. Basis for substrate specificity of the *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. *Mol Biochem Parasitol.* Nov 30;97(1-2):209-20. 1998.

NEUBER, H. Leishmaniasis. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* Sep;6(9):754-65. 2008.

NEVES, P. D. Parasitologia Humana. 11ª edição, editora Atheneu, 2002.

OKWOR, I.; MOU, Z.; LIU, D.; UZONNA, J. Protective immunity and vaccination against cutaneous leishmaniasis. *Front Immunol.*;3:128. Epub May 29. 2012.

ORR, N.; CHANOCK, S. Common genetic variation and human disease. *Adv Genet*; 62:1–32. 2008.

PASTOR-ANGLADA, M.; FELIPE, A.; CASADO, F.J. Transport and mode of action of nucleoside derivatives used in chemical and antiviral therapies. *Trends Pharmacol Sci* 19:424–430. 1998.

PORCINO, G.N.; CARVALHO-CAMPOS, C.; MAIA, A.C.; DETONI, M.L.; FARIA-PINTO, P.; COIMBRA, E.S.; MARQUES, M.J.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; DINIZ, V.Á.; CORTE-REAL, S.; VASCONCELOS, E.G. *Leishmania (Viannia) braziliensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1): Localization and in vitro inhibition of promastigotes growth by polyclonal antibodies. *Exp Parasitol.* Oct;132(2):293-9. 2012.

PULCHINELLI, A. JR.; MASSAD COSTA, A.M.; DE CARVALHO, C.V.; DE SOUZA, N.C.; HAIDAR, M.A.; ANDRIOLO, A.; GUERREIRO DA SILVA, I.D. Positive association of the hepatic lipase gene polymorphism c.514C > T with estrogen replacement therapy response. *Lipids Health Dis.* Nov 2;10:197. 2011.

RALEVIC, V; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews.* v.50(3), p.413-492, 1998.

READY P. D., Leishmaniasis emergence and climate change., *Revue scientifique et technique Journal*, 2008.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* 7, 581–596. 2007.

RISCH, N.J. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature*; 405:847–56. 2000.

ROBSON, S.C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*. 2006 Jun;2(2):409-30. 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, second edition. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring, NY. 1989.

SANSOM, F.M.; RIEDMAIER, P.; NEWTON, H.J.; DUNSTONE, M.A.; MÜLLER, C.E.; STEPHAN, H.; BYRES, E.; BEDDOE, T.; ROSSJOHN, J.; COWAN, P.J.; D'APICE, A.J.; ROBSON, S.C.; HARTLAND, E.L. Enzymatic properties of an ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase from *Legionella pneumophila*: substrate specificity and requirement for virulence. *J Biol Chem*. May 9;283(19):12909-18. 2008.

SANSOM, F.M.; NEWTON, H.J.; CRISIS, S.; CIANCIOTTO, N.P.; COWAN, P.J.; D'APICE, A.J.F.; HARTLAND, E.L. A bacterial ecto-triphosphate diphosphohydrolase similar to human CD39 is essential for intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Cellular Microbiology*. v.9(8), p.1922-1935, 2007.

SANTOS, R. F.; PÔSSA, M. A.; BASTOS, M. S.; GUEDES, P. M.; ALMEIDA, M. R.; DEMARCO, R.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; BAHIA, M. T.; FIETTO J. L. R. Influence of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase Activity on *Trypanosoma cruzi* Infectivity and Virulence. *PLoS Negl Trop Dis*.;3(3):e387. 2009.

SENGER, M. R.; ROSEMBERG, D. B.; RICO, E. P.; ARINI, M. B.; DIAS, R. D.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D. In vitro effect of zinc and cadmium on acetylcholinesterase and ectonucleotidase activities in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Toxicology in Vitro*, 20: 954-958, 2006.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R.K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med*. Jun;5(6):485-97. 2012.

SMITH, T.M.; CARL, S. A.; KIRLEY, T.L. Immunological detection of ecto-ATPase in chicken and rat tissues: characterization, distribution, and a cautionary note. *Biochem Mol Biol Int.*, Aug;45(5):1057-66. 1999.

TASCA, T.; BONAN, C.D.; DE CARLI, G.A.; SARKIS, J.J. *Trichomonas vaginalis*: cytochemical localization of a NTPDase I and an ecto-5'-nucleotidase and effects of adenine nucleotides on cellular viability. *Parasitology Research.* v.93(4), p.300-303, 2004.

TAUSSKY, H. H.; SHORR, E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J Biol Chem*, v.202, n.2, Jun, p.675-85. 1953.

VASCONCELOS, E. G.; FERREIRA, S.T.; CARVALHO, T.M.; SOUZA, W.; KETTLUN, A. M.; MANCILLA, M.; VALENZUELA, M. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. 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.* Sep 6;271(36):22139-45. 1996.

VIGNAL. A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol.* May-Jun;34(3):275-305. 2002.

WHO, Report of the Fifth Consultative Meeting on *Leishmania*/HIV Coinfection, 2007.

WHO. <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/default.htm>. 20/05/2012.

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

ZIMMERMANN, H.; BRAUN, N. Extracellular metabolism of nucleotides in the nervous system. *J Auton Pharmacol.* v.16(6), p. 397-400, 1996.

8. Anexos

Anexo 1 – Alinhamento das sequências consenso (obtidas pelo programa Sequencher 4.1.4) das colônias isoladas na estratégia 1. Dados obtidos por meio do alinhamento utilizando o programa ClustalW e o programa MEGA 5.05.

```
Lb_bd ATGCGACCGTACTCCTCAGTGC GGCGGATGACTCAACAGTCTGAACCGACTGCGCGTCATCGGCGTACTCGTGCTTAGCGCATTTCGTTCTC [90]
E_16 ..... [90]
E_21----- [90]
E_22 ..... [90]
E_43 ..... [90]
E_49 ..... [90]
E_52 ..... [90]
E_54 ..... [90]
E_59 ..... [90]
E_60 ..... [90]
E_64 ..... [90]
E_65 ..... [90]

Lb_bd TTCGGCTTTGTCATTTACTCTGAAAGCCCTTGTTCTCTCCTTGCAACTCGCCATACTCGAATGTCTACGACATCGTAATCGACGCCGGC [180]
E_16 ..... [180]
E_21 ..... [180]
E_22 ..... [180]
E_43 ..... [180]
E_49 ..... [180]
E_52 ..... [180]
E_54 ..... [180]
E_59 ..... [180]
E_60 ..... [180]
E_64 ..... [180]
E_65 ..... [180]

Lb_bd AGTACCGGCTCGCGGTACATGTGTTTCAGTACGAGCGCAGTAGCACTGGTGTCTACTTCTGAGAGAGCGCTTCAAACGGATAGAGCCG [270]
E_16 ..... [270]
E_21 ..... [270]
E_22 ..... [270]
E_43 ..... [270]
E_49 ..... [270]
E_52 ..... [270]
E_54 ..... [270]
E_59 ..... [270]
E_60 ..... [270]
E_64 ..... [270]
E_65 ..... [270]

Lb_bd GGACTGTCTTCATTTGCCACCGATCAGGAAGGCGCTAAGCAGTCGCTTGCGGGGCTCCTGCGCTTCGCTGAAAAGGCAGTTCACGAAGC [360]
E_16 ..... [360]
E_21 ..... [360]
E_22 ..... [360]
E_43 ..... [360]
E_49 ..... [360]
E_52 ..... [360]
E_54 ..... [360]
E_59 ..... [360]
E_60 ..... [360]
E_64 ..... [360]
E_65 ..... [360]

Lb_bd TACCAGAGGTGCACTTCCGTAACCCCAAGGCCACCGCCGGCCTCCGGCTTCTCCCTGAAGCCGATCAGCAGGTGTTGCTGGATGCTGCC [450]
E_16 ..... [450]
E_21 ..... [450]
E_22 ..... [450]
E_43 ..... [450]
E_49 ..... [450]
E_52 ..... [450]
E_54 ..... [450]
E_59 ..... [450]
E_60 ..... [450]
E_64 ..... [450]
E_65 ..... [450]
```

```

Lb_bd CAGCAGACCCTCAAGGCATTTCCGTTTCAGTCTCGTGGCGCCTCCATCGTCTCTGGTGCTCAAGAGGGCGTCTATGGGTGGCTCACGGTG [540]
E_16 ..... [540]
E_21 ..... [540]
E_22 ..... [540]
E_43 ..... [540]
E_49 ..... [540]
E_52 ..... [540]
E_54 ..... [540]
E_59 ..... [540]
E_60 ..... [540]
E_64 ..... [540]
E_65 ..... [540]

Lb_bd AACTACCTCTTAACAGGCTCGACAAGGAGGGGCCACCGTCGCGACCATAGACATGGGGGTGCCTCGACGCAGGTGGTGTTCGAGACG [630]
E_16 ..... [630]
E_21 ..... [630]
E_22 ..... [630]
E_43 ..... [630]
E_49 ..... [630]
E_52 ..... [630]
E_54 ..... [630]
E_59 ..... [630]
E_60 ..... [630]
E_64 ..... [630]
E_65 ..... [630]

Lb_bd AAGTTCACGTCTGGAGAGTGGCTGCCCTTCAACTACGCCACCAGCTGCGCACGCCAAAGCGCACCATCGCCATGTATCAGCACAGCTAC [720]
E_16 ..... [720]
E_21 ..... [720]
E_22 ..... [720]
E_43 ..... [720]
E_49 ..... [720]
E_52 ..... [720]
E_54 ..... [720]
E_59 ..... [720]
E_60 ..... [720]
E_64 ..... [720]
E_65 ..... [720]

Lb_bd CTAGGCCTTGGGCTCAACGAGGCAAAGAAGACACTGATGACGTTGTTCCGCAAAGTGAACGGGACATCCCCTTTTTCATGCTTCCCGAGA [810]
E_16 ..... [810]
E_21 ..... [810]
E_22 ..... [810]
E_43 ..... [810]
E_49 ..... [810]
E_52 ..... [810]
E_54 ..... [810]
E_59 ..... [810]
E_60 ..... [810]
E_64 ..... [810]
E_65 ..... [810]

Lb_bd AGGCATACGGAACACCTGAATGGTGTGGAACCTCGAAACGGCGATTCCACGGACTTCGACGTTTGTGTAATCTTTTTTCGAGAGCACGTC [900]
E_16 ..... A ..... G ..... [900]
E_21 ..... A ..... G ..... [900]
E_22 ..... A ..... G ..... [900]
E_43 ..... A ..... G ..... [900]
E_49 ..... A ..... G ..... [900]
E_52 ..... A ..... G ..... [900]
E_54 ..... A ..... G ..... [900]
E_59 ..... A ..... G ..... [900]
E_60 ..... A ..... G ..... [900]
E_64 ..... A ..... G ..... [900]
E_65 ..... A ..... G ..... [900]

```

```

Lb_bd ATAACGAAGCCGATCTGCAGGTTTGATGCCTGTGGCGCTCGCGGCGTGCCGAGCCGCCGCTGCCGTCGAAGCAGCATCCAATTTACGCC [990]
E_16 ..... [990]
E_21 ..... [990]
E_22 ..... [990]
E_43 ..... [990]
E_49 ..... [990]
E_52 ..... [990]
E_54 ..... [990]
E_59 ..... [990]
E_60 ..... [990]
E_64 ..... [990]
E_65 ..... [990]

Lb_bd TTTTCTTACTTCTACGACCGTCTTACCCTTCCGAGTGAAGGATTCCCGGTATACGTCTCGTCGTACAAGGAGCTCGGGCGGGAGGTG [1080]
E_16 ..... [1080]
E_21 ..... [1080]
E_22 ..... [1080]
E_43 ..... [1080]
E_49 ..... [1080]
E_52 ..... [1080]
E_54 ..... [1080]
E_59 ..... [1080]
E_60 ..... [1080]
E_64 ..... [1080]
E_65 ..... [1080]

Lb_bd TGTCAGCGAGAGTCTGCAGACCACACCACCCCAAGGAAACGACCTGCATGGAGCTGGCATACTTGTACAGCTTCTTGACGCACGGG [1170]
E_16 ..... [1170]
E_21 ..... [1170]
E_22 ..... [1170]
E_43 ..... [1170]
E_49 ..... [1170]
E_52 ..... [1170]
E_54 ..... [1170]
E_59 ..... [1170]
E_60 ..... [1170]
E_64 ..... [1170]
E_65 ..... [1170]

Lb_bd CTAGGGCTTAGCGACGACAGAACCCTCGAGGTTCTAACCGCATAGAGGGTATCGCGGTCTCCTGGTCTCTAGGCTGCTCTGTCTTC [1260]
E_16 ..... [1260]
E_21 ..... [1260]
E_22 ..... [1260]
E_43 ..... [1260]
E_49 ..... [1260]
E_52 ..... [1260]
E_54 ..... [1260]
E_59 ..... [1260]
E_60 ..... [1260]
E_64 ..... [1260]
E_65 ..... [1260]

Lb_bd GTGCTCAAGATGGAATGA [1278]
E_16----- [1278]
E_21 ..... [1278]
E_22 ..... [1278]
E_43----- [1278]
E_49 ..... [1278]
E_52 ..... [1278]
E_54 ..... [1278]
E_59 ..... [1278]
E_60 ..... [1278]
E_64----- [1278]
E_65 ..... [1278]

```

Anexo 2 – Alinhamento das sequências aminoacídicas derivadas das sequências consenso oriundas do sequenciamento das colônias isoladas na estratégia 1. Dados obtidos por meio de tradução e alinhamento utilizando o programa ClustalW e o programa MEGA 5.05.

```

Lb_bd MRPYSSVRRMTQQSNRLRVIGVLVLSAFVLFVGFVIYSESPWFSPCNSPYSNVYDIVLDAGSTGSRVHFVQYERSSTGVILLRERFKRIEP [90]
E_16 ..... [90]
E_21----- [90]
E_22 ..... [90]
E_43 ..... [90]
E_49 ..... [90]
E_52 ..... [90]
E_54 ..... [90]
E_59 ..... [90]
E_60 ..... [90]
E_64 ..... [90]
E_65 ..... [90]

Lb_bd GLSSFATDQEGAKQSLAGLLRFAEKAVPRSYQRCTSVTLKATAGLRLLEADQQVLLDAAQQLKAFPFQSRGASIVSQAQEGVYGWLTV [180]
E_16 ..... [180]
E_21 ..... [180]
E_22 ..... [180]
E_43 ..... [180]
E_49 ..... [180]
E_52 ..... [180]
E_54 ..... [180]
E_59 ..... [180]
E_60 ..... [180]
E_64 ..... [180]
E_65 ..... [180]

Lb_bd NYLLNRLDKEGATVATIDMGGASTQVVFETKFTSGEWLFPNYAHLRTPKRTIAMYQHSYLGGLNEAKKTLMTLFAKVNGTSPFSCFPR [270]
E_16 ..... [270]
E_21 ..... [270]
E_22 ..... [270]
E_43 ..... [270]
E_49 ..... [270]
E_52 ..... [270]
E_54 ..... [270]
E_59 ..... [270]
E_60 ..... [270]
E_64 ..... [270]
E_65 ..... [270]

Lb_bd RHTEHLNGVELRNGDSTDFDVCVNLFRHVITKPICRFDACGARGVPQPPLPSKQHPYAFSYFYDRLYHFRSEGFVYVSSYKELGREV [360]
E_16 ..... [360]
E_21 ..... [360]
E_22 ..... [360]
E_43 ..... [360]
E_49 ..... [360]
E_52 ..... [360]
E_54 ..... [360]
E_59 ..... [360]
E_60 ..... [360]
E_64 ..... [360]
E_65 ..... [360]

Lb_bd CQRESADHTTTPKETTCEMELAYLYSFLTHGLGLSDDRTLEVPNRIEGIAVSWSLGCSLSFVLKME* [426]
E_16 ..... [426]
E_21 ..... [426]
E_22 ..... [426]
E_43 ..... [426]
E_49 ..... [426]
E_52 ..... [426]
E_54 ..... [426]
E_59 ..... [426]
E_60 ..... [426]
E_64 ..... [426]

```

Anexo 3 – Alinhamento das seqüências consenso (obtidas pelo programa Sequencher 4.1.4) das colônias isoladas para cada clone da estratégia 2. Dados obtidos por meio do alinhamento utilizando o programa ClustalW e o programa MEGA 5.05.

```

Lb_bd ATGCGACCGTACTCCTCAGTGCGGCGGATGACTCAACAGTCGAACCGACTGCGCGTCATCGGGCTACTCGTGCTTAGCGCATTTCGTTTCTC [90]
D12 ..... [90]
F9 ..... [90]
G8 ..... [90]
G9 ..... [90]
G11----- [90]

Lb_bd TTCGGCTTTGTCAATTTACTCTGAAAGCCCTTGGTTCTCTCCTTGCAACTCGCCATACTCGAATGTCTACGACATCGTAATCGACGCCGGC [180]
D12 ..... [180]
F9 ..... [180]
G8 ..... [180]
G9 ..... [180]
G11----- [180]

Lb_bd AGTACCGGCTCGCGGTACATGTGTTTCAGTACGAGCGCAGTAGCACTGGTGTCACTTCTGAGAGAGCGCTCAAACGGATAGAGCCG [270]
D12 ..... [270]
F9 ..... [270]
G8 ..... [270]
G9 ..... [270]
G11----- [270]

Lb_bd GGACTGTCTTCATTTGCCACCGATCAGGAAGGCGCTAAGCAGTCGCTTGC GGCGCTCCTGCGCTTCGCTGAAAAGGCAGTTCACGAAGC [360]
D12 ..... [360]
F9 ..... [360]
G8 ..... [360]
G9 ..... [360]
G11----- [360]

Lb_bd TACCAGAGGTGCACTTCCGTAACCTCAAGGCCACCGCGCCCTCCGGCTTCTCCCTGAAGCCGATCAGCAGGTGTTGCTGGATGCTGCC [450]
D12 ..... [450]
F9 ..... [450]
G8 ..... [450]
G9 ..... M. [450]
G11----- [450]

Lb_bd CAGCAGACCCTCAAGGCATTTCCGTTTCAGTCTCGTGCGCCCTCCATCGTCTCTGGTGTCAAGAGGGCGTCTATGGGTGGCTCACGGTG [540]
D12 ..... [540]
F9 ..... [540]
G8 ..... [540]
G9 ..... [540]
G11----- [540]

Lb_bd AACTACCTCCTTAACAGGCTCGACAAGGAGGGCGCCACCGTCGCGACCATAGACATGGGGGTGCCTCGACGCAGGTGGTGTTCGAGACG [630]
D12 ..... [630]
F9 ..... [630]
G8 ..... [630]
G9 ..... [630]
G11----- [630]

Lb_bd AAGTTCACGTCTGGAGAGTGGCTGCCCTCAACTACGCCACCCAGCTGCGCACGCCAAAGCGCACCATCGCCATGTATCAGCACAGCTAC [720]
D12 ..... [720]
F9 ..... [720]
G8 ..... [720]
G9 ..... [720]
G11----- [720]

```

```

Lb_bd CTAGGCCTTGGGCTCAACGAGGCAAAGAAGACACTGATGACGTTGTTCCGCAAAGTGAACGGGACATCCCCTTTTTCATGCTTCCCGAGA [810]
D12 ..... [810]
F9 ..... [810]
G8 ..... [810]
G9 ..... [810]
G11 ..... [810]

Lb_bd AGGCATACGGAACACCTGAATGGTGTGGAACCTCGAAACGGCGATTCCACGGACTTCGACGTTTGTGTAAATCTTTTCGAGAGCACGTC [900]
D12 ..... A ..... G ..... [900]
F9 ..... A ..... G ..... [900]
G8 ..... A ..... G ..... [900]
G9 ..... A ..... G ..... [900]
G11 ..... A ..... G ..... [900]

Lb_bd ATAACGAAGCCGATCTGCAGGTTTGATGCCTGTGGCGCTCGCGCGTGCCGCAGCCGCCGCTGCCGTCGAAGCAGCATCCAATTTACGCC [990]
D12 ..... [990]
F9 ..... [990]
G8 ..... [990]
G9 ..... [990]
G11 ..... [990]

Lb_bd TTTTCTTACTTCTACGACCGTCTCTACCACTTCCGCAGTGAAGGATTCCCGGTATACGTCTCGTCGTACAAGGAGCTCGGGCGGGAGGTG [1080]
D12 ..... [1080]
F9 ..... [1080]
G8 ..... [1080]
G9 ..... [1080]
G11 ..... [1080]

Lb_bd TGTCAGCGAGAGTCTGCAGACCACACCACCCCAAGGAAACGACCTGCATGGAGCTGGCATACTTGTACAGCTTCTTGACGCACGGG [1170]
D12 ..... [1170]
F9 ..... [1170]
G8 ..... [1170]
G9 ..... [1170]
G11 ..... [1170]

Lb_bd CTAGGGCTTAGCGACGACAGAACCCTCGAGGTTCTAACC GCATAGAGGGTATCGCGGTCTCCTGGTCTCTAGGCTGCTCTGTCTTC [1260]
D12 ..... [1260]
F9 ..... [1260]
G8 ..... [1260]
G9 ..... [1260]
G11 ..... [1260]

Lb_bd GTGCTCAAGATGGAATGA [1278]
D12 ..... [1278]
F9 ..... [1278]
G8 ..... [1278]
G9 ..... [1278]
G11 ..... [1278]

```

Anexo 4 – Alinhamento das seqüências aminoacídicas derivadas das seqüências consenso oriundas do sequenciamento das colônias isoladas para cada clone. Dados obtidos por meio de tradução e alinhamento utilizando o programa ClustalW e o programa MEGA 5.05.

```

Lb_bd MRPYSSVRRMTQQSNRLRVIGVLVLSAFVLFVGFVIYSESPWFSPCNSPYSNVYDIVIDAGSTGSRVHVVFQYERSSTGVILLRERFKRIEP [ 90]
D12 ..... [ 90]
F9 ..... [ 90]
G8 ..... [ 90]
G9 ..... [ 90]
G11----- [ 90]

Lb_bd GLSSFATDQEGAKQSLAGLLRFAEKAVPRSYQRCTSVTLKATAGLRLLPEADQVLLDAAQOTLKAFPQSRGASIVSGAQEGVYGWLTV [180]
D12 ..... [180]
F9 ..... [180]
G8 ..... [180]
G9 .....?..... [180]
G11----- [180]

Lb_bd NYLLNRLDKEGATVATIDMGASTQVVFETKFTSGEWLFPNYAHQLRTPKRTIAMYQHSYLGLGLNEAKKTLMTLFAKVNGTSPFSCFPR [270]
D12 ..... [270]
F9 ..... [270]
G8 ..... [270]
G9 ..... [270]
G11----- [270]

Lb_bd RHTEHLNGVELRNGDSTDFDVCVNLFRHVITKPICRFDACGARGVPPPLPSKQHPIYAFSYFYDRLYHFRSEGFPVYVSSYKELGREV [360]
D12 ..... [360]
F9 ..... [360]
G8 ..... [360]
G9 ..... [360]
G11 ..... [360]

Lb_bd CQRESADHTTTPKETTCEMELAYLYSFLTHGLGLSDDRTLEVNPRIEGLIAVSWSLGC SL SFVLKME [426]
D12 .....- [426]
F9 ..... [426]
G8 ..... [426]
G9 ..... [426]
G11 ..... [426]

```

? = I ou L