

MATHEUS SILVA E BASTOS

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA E
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E BIOLÓGICA DA NTPDase-1
DE *Leishmania infantum chagasi***

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
2011

MATHEUS SILVA E BASTOS

EXPRESSÃO HETERÓLOGA E
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E BIOLÓGICA
DA NTPDase 1 de *Leishmania infantum chagasi*

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: 18 de fevereiro de 2011.

Prof. José Roberto Meyer Fernandes

Prof. Gustavo Costa Bressan

Prof. Eduardo de Almeida Marques da Silva

Prof^a. Juliana Lopes Rangel Fietto
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos sempre são complicados, as pessoas que são lembradas ficam muito satisfeitas, mas sempre tem alguém que acabamos esquecendo e por isso desde já agradeço a todos que me ajudaram em mais esta conquista.

Agradeço ao meu pai e minha mãe, porque sem eles eu não estaria aqui, a meus irmãos Gabriel e Henrique que também são muito importantes em minha vida.

A professora Juliana Lopes Rangel Fietto pela orientação e oportunidade, já são 7 anos de trabalho e convivência e sei que em muitos momentos ela teve de ter muita paciência com meu desespero, não posso deixar de lembrar do professor Luciano Gomes Fietto que considero como meu segundo orientador.

À todos amigos que me ajudaram nestes dois anos, não tem como citar todos, porque a lista ocuparia muitas páginas, com certeza todos foram de grande ajuda, principalmente nos momentos que pensei em desistir. Tenho de fazer um agradecimento especial à Dani (Mel) e ao Ramon (Mamona), estes dois são grandes amigos.

À todos integrantes do laboratório e ex-membros do Laboratório de Infectologia Molecular Animal pela colaboração, em especial ao Sr. Valdir que está sempre disposto a ajudar. Agradeço também ao Lucas Borges Pereira e a Pedro Marcus que tiveram uma grande contribuição neste trabalho, sem ajuda deles com certeza este trabalho não seria possível e com certeza não teria como demonstrar muitos dos resultados que serão apresentados nesta dissertação.

Aos professores José Roberto e Eduardo Marques que se prontificaram a me ajudar, tirando dúvidas “que não são poucas” e dando sugestões. O professor José Roberto que acompanha o trabalho do grupo há muito tempo e sempre disposto a ajudar e que fez questão de participar da banca, é com satisfação que recebo este prestígio e espero corresponder as expectativas. O professor Eduardo Marques que na reta final me ajudou muito nos experimentos com *Leishmania*, nas análises

dos resultados e na discussão, sem esta ajuda seria inviável a apresentação dos últimos resultados.

À Universidade Federal de Ouro Preto e a cidade de Ouro Preto que fizeram de mim o que sou hoje. Não posso Falar de Ouro Preto sem lembrar da Gloriosa Republica Tróia onde morei a maior parte do meu ensino médio e graduação, nesta república fiz grandes amigos que considero como irmãos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola que disponibilizaram esta oportunidade e também pelo aprendizado adquirido nestes dois anos, Eduardo Pereira Monteiro que está sempre auxiliando todos alunos da pós graduação.

Aos membros da banca que disponibilizaram um tempo de sua vida para participar da elaboração deste trabalho.

A todos integrantes do Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Ouro Preto e ao professor Luís Carlos Croco Afonso que estão sempre disposto a colaborar no trabalho do nosso grupo de pesquisa e principalmente no meu trabalho, espero que esta ótima colaboração possa continuar e possibilite trabalhos de qualidade.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. LEISHMANIOSE	1
1.2. E-NTPDases.....	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Leishmaniose Visceral.....	4
2.2. E-NTPDases.....	6
2.2.1. E-NTPDases de <i>Leishmania</i>	9
2.2.2. GDPases da família E-NTPDase.....	10
2.3. E-NTPDases e sinalização purinérgica do sistema imune	12
2.4. Correlação entre E-NTPDases e virulência de parasitos.....	15
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo Geral.....	18
3.2. Objetivos específicos.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. Análises por bioinformática das E-NTPDases de Tripanosomatídeos	19
4.2. Organismos usados nos experimentos.....	20
4.3. Meios de culturas usados	21
4.4. Obtenção de células competentes e transformação.....	21
4.5. Clonagem da NTPDase-1 de <i>L. infantum chagasi</i>	22
4.6. Confirmação e testes de expressão da NTPDase-1 recombinante.....	25
4.7. Quantificação de proteína	26
4.8. Purificação da NTPDase-1 recombinante.....	26
4.9. Obtenção de soro com anticorpos policlonais anti-NTPDase-1 recombinante.....	28
4.10. Dosagem de atividade nucleotidásica	28
4.11. Tratamento da cultura de <i>L. braziliensis</i>	29
5. Resultados e Discussão	30
5.1. Análises por bioinformática.....	30
5.2. Estudos experimentais com a L. i NTPDase-1	38
6. Conclusões.....	60
7. Perspectivas	62
8. Referências bibliográficas.....	63

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Distribuição de Leishmaniose Visceral no mundo, dados de 2009, (WHO,2010).....	4
Figura 2: Distribuição Leishmaniose Visceral no Brasil (Saúde, 2006)	5
Figura 3: Família das E-NTPDases de mamíferos e de alguns patógenos:.....	7
Figura 4: Comparação entre a estrutura da NTPDase de <i>L. pneumophila</i> (cinza) com a estrutura da NTPDase-2 de <i>R.norvegicus</i> (laranja) (Vivian <i>et al.</i> , 2010).....	9
Figura 5: Topologia de membrana dos receptores P1 e P2 e uma sequência de alguns agonistas que podem ativá-los (Yegutkin, 2008).....	13
Figura 6: Mapa do vetor de expressão pET21 b (NOVAGEM).....	23
Figura 7: Oligonucleotídeos iniciadores usados para amplificação do gene da NTPDase-1 de <i>L. infantum chagasi</i> :	23
Figura 8: Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega).....	24
Figura 9: Agrupamento das NTPDases 1 e 2 de tripanosomatídeos, preferência por substrato da T. c NTPDase-1, L. i NTPDase-1, L. i NTPDase-2 e L. m NTPDase-2.	33
Figura 10: Análise do resultado gerado pelo signalP da L. i NTPDase-1	39
Figura 11: Amplificação da região codificante da porção solúvel da NTPDase-1 de <i>L. infantum chagasi</i>	40
Figura 12: Confirmação da sub-clonagem em pET 21b da NTPDase-1 de <i>L. infantum chagasi</i>	41
Figura 13: Verificação do melhor tempo de expressão da NTPDase-1 de <i>L. infantum chagasi</i>	42
Figura 14: Confirmação do tempo de expressão da NTPDase-1 de <i>L. infantum chagasi</i>	43
Figura 15: Determinação da solubilidade da NTPDase-1 de <i>L. infantum chagasi</i> recombinante.....	45
Figura 16: Purificação da L. i NTPDase-1 recombinante..	47
Figura 17: Titulação do soro policlonal anti-L.i NTPDase-1 e reconhecimento da proteína recombinante purificada	50
Figura 18: Teste de influência do agente redutor DTT na atividade nucleotidásica da NTPDase-1 purificada	52
Figura 19: Avaliação da atividade de hidrólise de GTP em diferentes faixas de pH	54
Figura 20: Dados preliminares do efeito dos diferentes tratamentos em culturas axênicas de <i>L. braziliensis</i>	59
Tabela 1: E-NTPDases analisadas	20
Tabela 2: Predição de localização extracelular e transmembrana nas NTPDase-1 e 2	35
Tabela 3: Predição e análise de sítios de O-Glicosilação e N-glicosilação das NTPDases 1 e 2	36
Tabela 4: Pontes dissulfeto das NTPDases 1 e 2	38

Tabela 5: Rendimento da purificação da L. i NTPDase-1	48
Tabela 6: Teste de preferência de substrato, ensaios feitos com 1,5 mM de substrato...	53

RESUMO

BASTOS, Matheus Silva e., M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011.
Expressão heteróloga e caracterização bioquímica e biológica da NTPDase-1 de *Leishmania infantum chagasi*. Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto.
Coorientadores: Márcia Rogéria de Almeida Lamego e Luciano Gomes Fietto.

A Leishmaniose Visceral (LV) é um grave problema de saúde pública em vários países do mundo incluindo o Brasil. Atualmente tem se observado um número crescente de casos no homem e no cão, sendo este último considerado principal reservatório doméstico responsável pela manutenção da doença em periferias de grandes cidades. O foco central deste trabalho é o estudo da NTPDase-1 de *Leishmania infantum chagasi*, agente etiológico principal da LV no Brasil. A NTPDase-1 faz parte da família das E-NTPDases, que são enzimas implicadas como fatores de virulência de alguns parasitos. Elas participam da via de salvação de purinas e da modulação da resposta imune do hospedeiro dependente de nucleotídeos extracelulares. Essas enzimas constituem importantes alvos para o desenvolvimento de novas drogas e vacinas para as leishmanioses, tanto humana quanto canina. Neste trabalho foram feitas análises de bioinformática das E-NTPDases de *Leishmania braziliensis*, *L. infantum*, *L. major*, *Trypanosoma brucei* e *T. cruzi*. Além disto, foi feita a clonagem, expressão em sistema bacteriano, purificação e caracterização enzimática da porção solúvel da NTPDase-1 de *L. infantum chagasi*. A enzima purificada foi usada também para produção de anti-soro policlonal anti-NTPDase-1. Foram feitos testes de crescimento de *L. braziliensis*, onde foi feito tratamento com a NTPDase-1 recombinante durante o cultivo celular. Nas análises de bioinformática foi possível observar a existência de dois grupos, as NTPDases-1 e NTPDases-2. Os dados demonstram que existem conservações específicas entre enzimas do mesmo grupo, como sítios de glicosilação e predição de localização subcelular onde a maioria das isoformas-1 são preditas como secretadas e as isoformas 2 como presentes na membrana. Foram observadas algumas possíveis pontes dissulfeto conservadas em todas as sequências. Quanto as características bioquímicas, baseado em dados já existentes, viu-se clara distinção de preferência por substrato entre as enzimas dos diferentes grupos, e duas enzimas (*L. i* NTPDase-2 e *L. m* NTPDase-2), muito próximas no agrupamento, apresentam hidrólise comum para a maioria dos substratos. Quando é comparada a NTPDase-1 de *T. cruzi* e a de

L. infantum chagasi, caracterizada neste trabalho, observa-se que o pH de atividade máxima é distinto: a enzima de *T. cruzi* apresenta atividade maior em pH básico (7,5-8) e a NTPDase-1 de *L. infantum chagasi* em pH ácido (5,5-6,0). A L. i NTPDase-1 apresentou especificidade para GTP enquanto as outras enzimas de tripanosomatídeos hidrolisam vários nucleotídeos tri e di-fosfatados. Nas análises do efeito biológico da adição da L.i NTPDase-1 em cultura axênica de promastigotas de *L. braziliensis*, verificou-se uma possível influência na metaciclogênese “in vitro”. Todos os dados são discutidos em termos de possíveis papéis da L.i NTPDase-1 na biologia de *L. infantum chagasi* e na infecção do vetor e do hospedeiro, abrindo novas perspectivas de estudos na área. Os dados obtidos sugerem que esta enzima pode influenciar de no mecanismo de metaciclogênese por algum processo ainda não conhecido.

ABSTRACT

BASTOS, Matheus Silva e., M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2011.
Heterologous expression and biochemical and biological Characterization of *Leishmania infantum chagasi* NTPDase-1. Adviser: Juliana Lopes Rangel Fietto.
Co-advisers: Márcia Rogéria de Almeida Lamego and Luciano Gomes Fietto.

The Visceral *Leishmaniasis* (VL) represents an important global health problem in many countries including Brazil and it has seen a growing number of cases in humans and dogs. The dogs are being considered the main domestic reservoir responsible for maintaining the disease in the outskirts of large cities. The aim of this work is the study of *Leishmania infantum chagasi* NTPDase-1. *L. infantum chagasi* is the main etiologic agent of VL in Brazil. The NTPDase-1 is part of the E-NTPDase family, enzymes that are implicated as virulence factors of some parasites. They participate in the purines salvage pathways and in the modulation of host immune response that depend on extra cellular nucleotides. These enzymes are important targets for the development of new drugs and effective vaccines for *Leishmaniasis*. In this work were made bioinformatics analysis of E-NTPDase from *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. major*, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. Moreover, was made the cloning, expression in bacterial system, purification and characterization of soluble portion of the enzyme NTPDase 1 from *L. infantum chagasi*. The purified enzyme was also used for production of polyclonal antiserum. In addition were evaluated the role of recombinant NTPDase-1 in the biology of *L. braziliensis*. The results of the bioinformatics analysis showed the existence of two groups of *Trypanosomatid* NTPDases named here as NTPDase-1 and NTPDase-2. These groups presented similar predicted glycosilation pattern, transmembrane domain, disulphide bonds and substrate specificity. Comparing the *T. cruzi* NTPDase-1 and *L. infantum chagasi* NTPDase-1 (L.i. NTPDase-1), characterized in this work, we observe that the pH of maximum activity is different: the enzyme from *T. cruzi* has a higher activity at alkaline pH (7.5 to 8) and the NTPDase-1 from *L. infantum chagasi* in acidic pH (5.5 to 6.0). L.i. NTPDase-1 showed specificity for GTP while the other enzymes of *Trypanosomatids* hydrolyze various tri- and di-phosphate nucleotides. In the analysis of biological effect of addition of L.i. NTPDase-1 in axenic culture of promastigotes of *L. braziliensis*, there was a possible influence on in vitro metacyclogenesis. All data are discussed in terms of possible roles of L.i. NTPDase-1 in the biology of *L. infantum chagasi* and the infection vector and host,

opening new prospects for studies in this area. The data suggests that this enzyme may influence the mechanism of metacyclogenesis by some process not yet known.

1. INTRODUÇÃO

1.1. LEISHMANIOSE

As Leishmanioses são enfermidades causadas por pelo menos 20 espécies patogênicas de protozoários flagelados do gênero *Leishmania* (Ross, 1903). São doenças de caráter zoonótico e sua transmissão ocorre de forma natural, pela picada de fêmeas de espécies de flebotomíneos infectadas (Ordem *Diptera*; Família *Psychodidae*; Sub-Família *Phlebotominae*; gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomya*). Existem aproximadamente 600 espécies de flebotomíneos, mas apenas 10% delas agem como vetores para as diferentes espécies de *Leishmania* e apenas 30 espécies possuem importância para a saúde pública (Sharma e Singh, 2008).

Estes protozoários apresentam um ciclo de vida heteroxeno, onde parte ocorre no sistema digestivo do hospedeiro invertebrado e parte no interior de fagolisossomas de macrófagos de mamíferos. Nas porções anteriores do trato digestivo do hospedeiro invertebrado o parasito é encontrado principalmente na forma infecciosa promastigota metacíclica. Estes promastigotas são inoculados pelo flebotomíneo ao fazer o repasto sanguíneo em mamíferos. Já nos mamíferos estas promastigotas são fagocitadas por macrófagos, sendo localizados no vacúolo parasitóforo formado pelo fagolisossoma, onde após um período de 12-24 horas se diferenciam em formas arredondadas denominadas amastigotas. Um flebotomíneo não infectado se contamina ao fazer o repasto sanguíneo ingerindo macrófagos infectados. As formas amastigotas iniciam a diferenciação em promastigotas poucas horas após a ingestão e a completa diferenciação ocorre após 24-48 horas (Sharma e Singh, 2008).

As leishmanioses são amplamente distribuídas pelo mundo, estando presentes em 88 países. Cerca de 350 milhões de pessoas estão em áreas de risco e estima-se que a população de infectados seja de 12 milhões de pessoas com 2 milhões de novos casos por ano (WHO, 2009). As leishmanioses apresentam diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da pré-disposição do hospedeiro, sendo basicamente divididas em Visceral (forma mais grave da doença), onde o parasito infecta células do fígado, baço ou medula óssea, o que acarreta em uma imunossupressão e posteriormente a morte do hospedeiro se não tratado; e as formas tegumentares que podem ser subdivididas em mucocutânea, cutânea e cutânea difusa. Na Leishmaniose Mucocutânea, o parasito se aloja em células da mucosa do hospedeiro, podendo causar uma lesão grave na área de infecção. Na

Leishmaniose Cutânea o parasito se mantém na área da picada do flebotomíneo gerando uma lesão típica, geralmente ulcerada. Por fim, a Leishmaniose Cutânea Difusa, que é uma forma onde ocorre a disseminação de lesões nodulares por metástases.

Um fator que dificulta o controle desta enfermidade é a leishmaniose Canina. É visto que em áreas endêmicas o número de cães positivos para leishmaniose é altíssimo e levando em consideração a relação de proximidade do cão com o homem, este animal torna-se um importante reservatório (Baneth *et al.*, 2008; Miro *et al.*, 2008). Devido a limitação nas drogas disponíveis para tratamento das leishmanioses e a ineficácia das drogas na cura parasitológica dos cães (Miro *et al.*, 2008), atualmente no Brasil o tratamento dos cães está proibido por portaria Nº 1.426, de 11 de julho de 2008 do Ministério da Saúde e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, sendo preconizada a eutanásia dos animais infectados. Ainda não existem também vacinas com eficácia comprovada, apesar de existirem algumas vacinas no mercado veterinário (Saúde, 2006).

1.2. E-NTPDases

As E-NTPDases ou Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases são enzimas que hidrolisam nucleotídeos tri e difosfatados, são dependentes de cátions divalentes, possuem 5 regiões conservadas de apirase (ACRs) e até o momento têm se mostrado como insensíveis ou parcialmente inibidas por inibidores de ATPases do tipo P, V e F (Plesner, 1995). Os nucleotídeos extracelulares são sinalizadores em diversos eventos celulares, incluindo a regulação do sistema imune de mamíferos, atuando sobre os receptores purinérgicos e pirimidinérgicos. Já é bem conhecido o efeito da ativação destes receptores em células do sistema imune, bem como a sua importância na modulação da resposta imune (Chen *et al.*, 2006; Burnstock, 2007; Kukulski *et al.*, 2007; Ben Yebdri *et al.*, 2009; Kukulski *et al.*, 2009; Levesque *et al.*, 2010). Outro papel importante atribuído às E-NTPDases (presentes dentro das células no aparato de golgi e reticulo endoplasmático) é a participação em vias de glicosilação, como demonstrado em *Saccharomyces cerevisiae*, onde estas enzimas regulam a entrada de açúcar-nucleotídeo com saída de nucleotídeo hidrolisado (Abeijon *et al.*, 1993; Gao *et al.*, 1999).

As E-NTPDases de *Leishmania* se tornaram um alvo promissor de estudos, sendo objeto de patente pelo nosso grupo de pesquisa para uso em vários fins, como

diagnóstico, prognóstico, vacinação e desenvolvimento de quimioterápicos. Vários trabalhos recentes demonstraram que as ecto-nucleotidases, incluindo as E-NTPDases, parecem atuar como fatores de virulência em patógenos, incluindo *Leishmania* (Berredo-Pinho *et al.*, 2001; De Almeida Marques-Da-Silva *et al.*, 2008; Sansom, Robson *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009). *Leishmania infantum* cepa JPCM5, utilizada no sequenciamento genômico, apresenta dois genes codificantes de E-NTPDases em seu genoma, denominados como Guanosine Diphosphatase (gi|146079010) e Nucleoside diphosphatase (gi|146081774), sendo que neste trabalho iremos nos referir a GDPase como NTPDase-1 (devido a similaridade de sequências primária com a NTPDase-1 de *T. cruzi* já descrita e bioquimicamente caracterizada como E-NTPDase) e a NTPDase como NTPDase-2, sendo que nenhuma NTPDase-2 de tripanosomatídeos foi até então bioquimicamente caracterizada.

Tendo como foco uma possível aplicação biotecnológica destas enzimas na Leishmaniose Canina, este trabalho vem primariamente estudar a NTPDase-1 de *L. infantum chagasi*, enzima da família das E-NTPDases até então não estudadas na literatura que podem ser potencialmente importantes para o processo de infecção e manutenção da infecção em mamíferos e um bom alvo para o desenho racional de drogas, desenvolvimento de vacinas e kits de diagnóstico (uso já com pedido de patente no Brasil por nosso grupo de pesquisa (Fietto, J. L. R *et al.*, 2010). Nesta dissertação serão apresentados também resultados de análises “in silico” determinação da possível localização subcelular, possíveis regiões de O-glicosilação, possíveis pontes dissulfeto e um agrupamento com base no alinhamento feito com as sequências de aminoácidos das NTPDases1 e NTPDase-2 de *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. major*, *Trypanosoma brucei* e *T. cruzi*. Serão apresentados dados de clonagem da região que codifica a porção solúvel da NTPDase-1 de *L. infantum chagasi*, e análises de expressão heteróloga em sistema bacteriano pET21-b, purificação e caracterização da enzima recombinante. Por fim uma possível função desta enzima na biologia de *Leishmania*, foi avaliada por adição da proteína recombinante ativa em cultura axênica de promastigotas totais de *L. braziliensis*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Leishmaniose Visceral

L. chagasi é hoje considerada espécie sinônima de *L. infantum*, e será citada neste trabalho como *L. infantum chagasi*, a fim de discriminar esta espécie como inicialmente aquela caracterizada como *L. chagasi* e isolada no Brasil (Romero e Boelaert, 2010). Segundo a Organização Mundial de Saúde, dos casos de Leishmaniose Visceral (LV) notificados no mundo 90% estão concentrados em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (figura 1). Dados de 2002 demonstram que, no Brasil, a LV está presente em 17 estados (figura 2), sendo que a maior parte dos casos está concentrada na região nordeste. Conforme dados epidemiológicos disponíveis (Saúde, 2006) é possível verificar uma urbanização da LV que antes era estritamente rural. Entre 1990 e 2006 foram notificados cerca de 50.060 casos de LV no Brasil, o que corresponde a 90% de todos os casos reportados nas Américas (Saúde, 2006; Bern *et al.*, 2008; Romero e Boelaert, 2010).

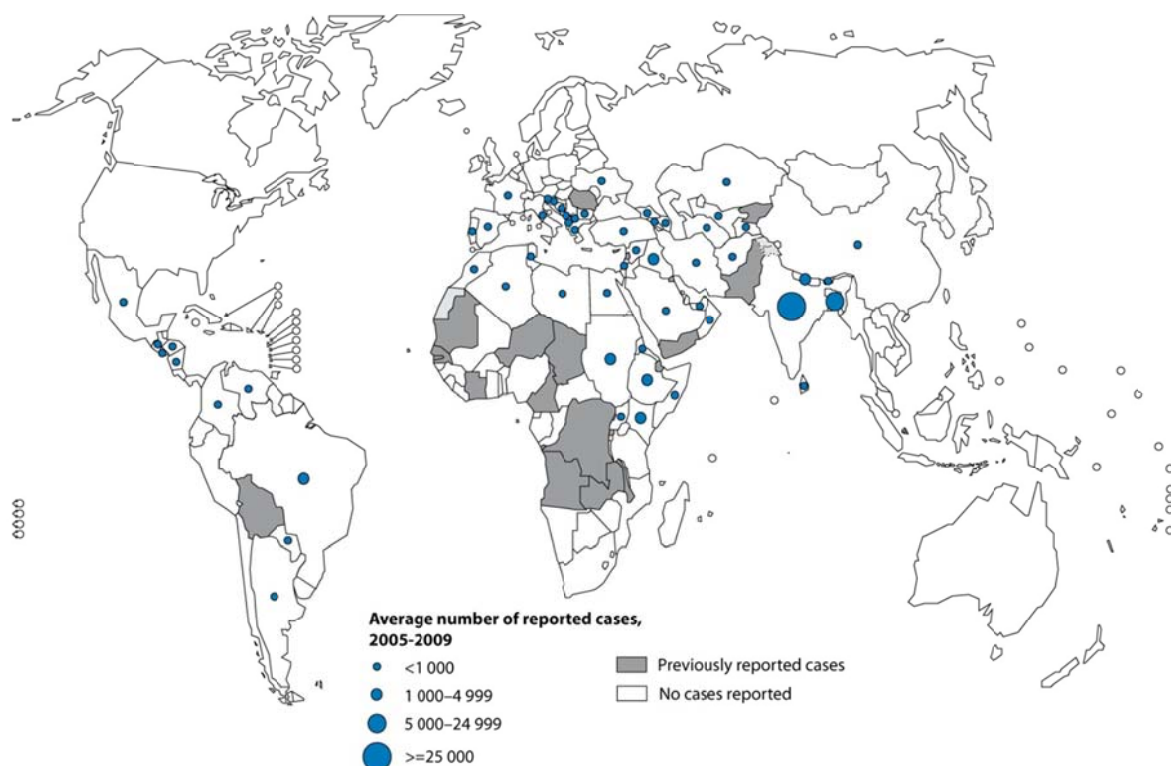
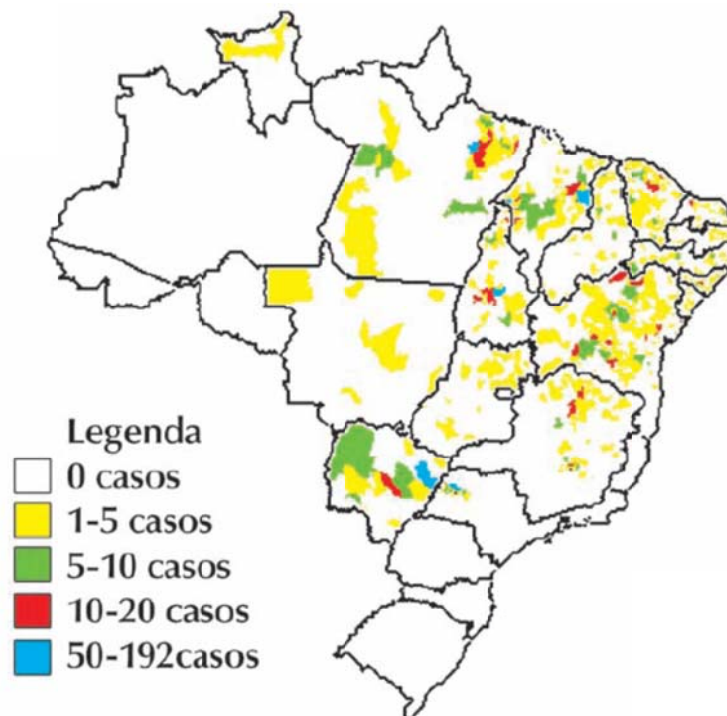


Figura 1: Distribuição de Leishmaniose Visceral no mundo, dados de 2009, (WHO,2010)



Fonte: SINAN- COVEV/ CGDT/DEVEP/SVS/MS

Figura 2: Distribuição Leishmaniose Visceral no Brasil (Saúde, 2006)

Além do elevado número de pessoas infectadas, outro fator preocupante é o número de cães infectados nas áreas endêmicas, pois estes são um importante reservatório destes parasitos. Como exemplo, em Jacobina-Bahia a prevalência de cães infectados com *L. infantum chagasi* chega a 36%, sendo a infecção mais prevalente entre animais mais jovens (Ashford *et al.*, 1998). Em Jequié – Bahia, cerca de 6,55 cães em cada 100 são infectados por ano (Paranhos-Silva *et al.*, 1998). Em estudo avaliando de cães positivos para LV em áreas urbanas e rurais do nordeste brasileiro e 72,2% dos cães avaliados nas áreas urbanas foram positivos para LV. Dos casos positivos 30,8% não apresentavam sinais clínicos. Para as áreas rurais o índice de cães positivos caiu para 12,4%, destes cães positivos cerca de 75% não apresentaram sinais clínicos (Queiroz *et al.*, 2009). Como pode ser observado nos dados citados o número elevado de cães que não apresenta sinais clínicos o que acarreta em uma maior dificuldade no diagnóstico, sendo necessário um diagnóstico laboratorial rápido e confiável para um controle eficiente desta doença. A urbanização da LV no Brasil nas últimas décadas é consequência da migração de pessoas do meio rural para as periferias das grandes cidades, onde a superlotação e as baixas condições sanitárias criaram um ambiente propício para os vetores (Paranhos-Silva *et*

al., 1998). Portanto a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é um grande problema de saúde animal e saúde pública, sendo foco de vários estudos. O cão é um animal doméstico que favorece a manutenção do ciclo da doença na região peri-domiciliar. Desta forma estudos focados no diagnóstico e vacina para cães são de grande importância para o controle desta enfermidade. Hoje existem diversos métodos de diagnósticos para Leishmaniose Visceral Canina e humana, como os métodos de aglutinação direta, imunocromatografia, ELISA e PCR. A organização mundial de saúde considera dois métodos de diagnósticos como apropriados para programas de controle: o teste de aglutinação direta, que usa formas promastigotas e o teste de imunocromatografia baseado em rK39 (Romero e Boelaert, 2010). No Brasil os testes laboratoriais para detecção de leishmaniose são feitos principalmente usando o método de imunofluorescência indireta com o “antígeno de Manguinhos” (Saúde, 2006). Apesar de existirem estes métodos preconizados, os mesmos apresentam eficácia variável em diferentes regiões e não existe um método de diagnóstico confiável principalmente para cães assintomáticos o que dificulta o trabalho de controle da LVC (Romero e Boelaert, 2010). É visto que, para o diagnóstico do cão existe, no momento uma grande discrepância entre especificidade e sensibilidade dos testes que variam do tipo de teste e também conforme o grupo de amostragem usado principalmente quando se trata de cães assintomáticos. Em estudo na cidade Belo Horizonte-MG, foi demonstrado que usando os métodos de imunofluorescência indireta e ensaio imuno enzimático (ELISA), ocorreu reação cruzada com infecções por *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis* e *L. braziliensis* (Ferreira Ede et al., 2007). Na busca por métodos de diagnósticos mais rápidos e mais confiáveis, diversos grupos procuram alvos como proteínas de *Leishmania* que sejam espécie específicas ou que possam sanar as dificuldades encontradas atualmente de se ter um antígeno universal confiável, permitindo um melhor controle da LV em áreas endêmicas.

2.2. E-NTPDases

Atualmente muitos grupos que estudam Leishmaniose Visceral, seja no homem ou no cão, estão focando seus estudos na busca de novos alvos para drogas, para uma vacina efetiva e também novos métodos de diagnósticos que incluam alvos que possibilitem um diagnóstico mais confiável. Dentro deste contexto, as E-NTPDases de *Leishmania* se tornaram um alvo promissor de estudos, tendo sido objeto de patente para estes fins pelo nosso grupo de pesquisa (Fietto, J. L. R et al., 2010) .

As E-NTPDases (EC 3.6.1.5), ou Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases, são enzimas capazes de hidrolisar nucleotídeos tri e difosfatos em diferentes ambientes, incluindo o meio extracelular (Zimmermann, 2000). Estas enzimas são dependentes de cátions divalentes para sua atividade e insensíveis ou parcialmente sensíveis a inibidores de ATPases tipo P, V e F, como por exemplo azida sódica que inibe ATPases mitocondrial (tipo-F), Orthovanadato que inibe H⁺ ATPase (Tipo-P), adenilil (3',5')-adenosina pentafofato (Ap5A) que inibe Adenilato cinase, trifluoperazino que inibe Ca²⁺-ATPase(Tipo-P) e outros (Plesner, 1995; Knowles e Nagy, 1999; De Aguiar Matos *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2001). Elas podem estar presentes na forma solúvel ou serem integrantes de membranas com uma ou duas porções transmembranas (figura 3). Todos os membros desta família possuem 5 regiões conservadas denominadas regiões conservadas de apirases (ACRs), (Zimmermann, 2000), sendo que estas ACRs (figura 3) possuem alguns resíduos que variam mais ou menos de enzima para enzima. Esta variação é um possível fator determinante da diferença de especificidade para substrato existente entre as várias enzimas que compõem a família (Zimmermann, 2000; Sansom, Robson *et al.*, 2008).

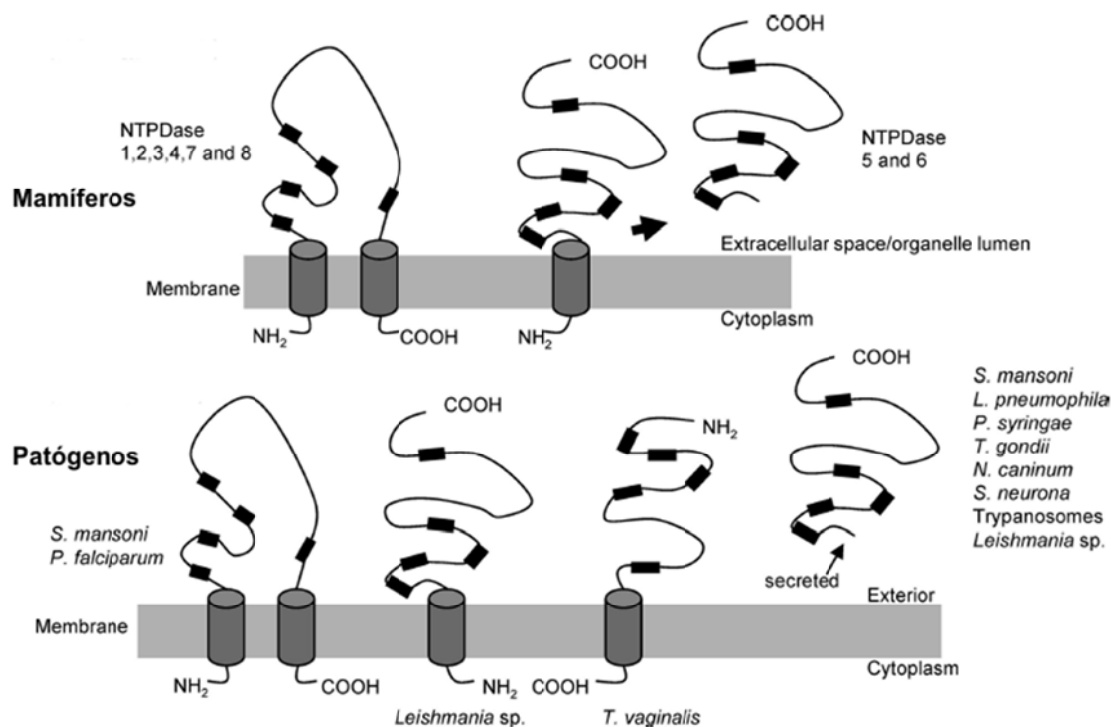


Figura 3: Família das E-NTPDases de mamíferos e de alguns patógenos: Esta figura demonstra a topologia de membrana e as 5 ACRs (blocos pretos). *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*), *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*), *Pseudomonas syringae* (*P. syringae*), *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*), *Neospora caninum* (*N. caninum*), *Sarcocystis neurona*, (*S. neurona*), figura modificada de (Sansom, Robson *et al.*, 2008).

Recentemente foi resolvida a estrutura da NTPDase de *Legionella pneumophila* (Vivian *et al.*, 2010), sendo esta a segunda NTPDase a ter sua estrutura resolvida até o momento, já que em 2008 a NTPDase-2 de *Rattus norvegicus* teve sua estrutura resolvida por (Zebisch e Strater, 2008). Em análise comparativa, verifica-se que estas duas enzimas de organismos tão distantes evolutivamente possuem uma identidade de sequência de apenas 26%, mas quando é feita sobreposição das estruturas observa-se uma similaridade estrutural significativa (figura 4) (Vivian *et al.*, 2010). Tal constatação sugere que, apesar dos resíduos conservados nas duas sequências serem poucos, estes são estruturalmente conservados e alguns poucos resíduos que se mantêm conservados são importantes para manter estas enzimas em estruturas similares, principalmente as duas pontes dissulfeto conservadas na ACR1 das duas enzimas. No entanto, a preferência por substrato nestas duas enzimas apresenta diferenças: a NTPDase de *L. pneumophila* apresenta uma eficácia similar na hidrólise de ADP e ATP, mas o K_m para ATP foi bem menor (0,4 mM) do que para ADP (1 mM) (Sansom, Riedmaier *et al.*, 2008). Já a NTPDase-2 de *R. norvegicus* possui um K_m aproximado para ATP e ADP de 0,0303 e 0,039 mM respectivamente (Zebisch e Strater, 2007). Isto sugere que as alterações, principalmente dentro das ACRs, proporcionam uma diferença na atividade da enzima, mesmo sendo a estrutura semelhante.



Figura 4: Comparação entre a estrutura da NTPDase de *L. pneumophila* (cinza) com a estrutura da NTPDase-2 de *R. norvegicus* (laranja) (Vivian *et al.*, 2010): É possível observar um grau elevado de sobreposição entre as α -hélices e as folhas β entre as duas estruturas.

Isso demonstra que temos de obter mais conhecimento sobre estas enzimas para podermos determinar estas pequenas diferenças que geram especificidade diferente para nucleotídeos. As E-NTPDases são enzimas que controlam a concentração de nucleotídeos em torno do seu microambiente e juntamente com a CD73 ou 5'nucleotidase, podem agir na modulação de sinal via diversos subtipos de purino receptores nas células. Em trabalho recente foi verificado que a NTPDase-1 de macrófagos de camundongo age indiretamente sobre o receptor P2X₇, controlando a sua ativação provavelmente através da regulação da concentração de ATP extracelular (Levesque *et al.*, 2010).

2.2.1. E-NTPDases de *Leishmania*

Como dito anteriormente, existem preditos no genoma de *L. infantum* (cepa JPCM5) dois genes codificantes de E-NTPDases, anotados como: Guanosine Diphosphatase (gi|146079010), provavelmente por apresentar na anotação automática do genoma uma similaridade com a GDPase de leveduras, já bem

caracterizadas como tal, e um segundo gene anotado como Nucleoside diphosphatase (gi|146081774). Nenhuma das proteínas resultantes destes genes foi estudada bioquimicamente, sendo estes nomes hipotéticos quanto às características bioquímicas das enzimas. Neste trabalho nos referiremos então à possível GDPase como NTPDase-1 (devido a sua maior similaridade de sequência primária com a NTPDase-1 de *T. cruzi* já descrita e bioquimicamente caracterizada como E-NTPDase, capaz de hidrolisar vários nucleotídeos tri e difosfatados) (Santos *et al.*, 2009). O produto do segundo gene chamaremos de NTPDase-2, sendo que esta enzima de *L. infantum* foi recentemente caracterizada bioquimicamente como uma genuína apirase, capaz de hidrolisar nucleotídeos tri e difosfatados (ADP=UDP=GTP>GDP) (dissertação de mestrado de Raphael de Souza Vasconcellos, 2010, trabalho em preparação para publicação, Vasconcellos *et al.*, 2011).

Devido aos genes das E-NTPDases 1 e 2 de *L. infantum* apresentarem então similaridade com GDPases e NTPDases, a seguir descreveremos alguns importantes dados da literatura sobre enzimas conhecidas assim descritas e seus papéis biológicos.

2.2.2. GDPases da família E-NTPDase

As GDPases, pertencentes à família das E-NTPDases, são enzimas com uma maior especificidade por nucleotídeos de guanina. Elas compartilham todas as características comuns desta família e geralmente têm preferência por GDP. Porém há poucos trabalhos direcionados para o estudo destas enzimas e por isso, se sabe muito pouco sobre elas. A maioria dos trabalhos são direcionados para estudos das GDPases de levedura (Abeijon *et al.*, 1993; Vowels e Payne, 1998; Gao *et al.*, 1999; Lopez-Avalos *et al.*, 2001; Herrero *et al.*, 2002; Uccelletti *et al.*, 2007).

Alguns estudos demonstram que estas GDPases da família das E-NTPDases estão presentes no lúmen de organelas como retículo endoplasmático e complexo de golgi e possuem um papel importante para glicosilação de proteínas (Abeijon *et al.*, 1993; Berninsone *et al.*, 1994; Vowels e Payne, 1998; Gao *et al.*, 1999; D'alessio *et al.*, 2003). Aparentemente elas podem agir sobre o mecanismo de transporte de açúcares ligados a nucleotídeos nestas organelas, já que a entrada de açúcares ligados a nucleotídeos é dependente da saída de nucleotídeos monofosfatados que

são produzidos pela ação dessas após a liberação dos nucleotídeos difosfatados que estavam ligados aos açúcares que foram transferidos para seus alvos, regulando assim, a entrada de novas moléculas de açúcar-nucleotídeo. Em trabalho feito com a clonagem de um gene de *Kluyveromyces lactis* que codifica a KIYND1. Esta é uma enzima que está com o sítio catalítico voltado para o lúmen do complexo de golgi e possui uma atividade significativa para GDP, UDP, ADP e GTP. Neste estudo foi demonstrado que esta enzima participa da via de O-glicosilação de proteínas e como proteínas secretadas dependem de glicosilação, esta proteína pode atuar em vias de secreção, já que em testes de super-expressão deste gene em *K. lactis* é possível verificar um aumento na produção de proteína extracelular (Uccelletti *et al.*, 2007). Estudos em *Saccharomyces cerevisiae* demonstraram que uma GDPase do complexo de golgi também pode estar agindo sobre vias de glicosilação, só que neste organismo existe uma aparente redundância na função da GDPase, pois há outra enzima envolvida, a YND1. Ambas afetam parcialmente o mecanismo de glicosilação de *S. cerevisiae* e células com super expressão do YND1 têm o efeito da deleção do gene da GDPase anulado (Abeijon *et al.*, 1993; Gao *et al.*, 1999). Em *Candida albicans* uma GDPase codificada por um gene homólogo ao da GDA1 de *S. cerevisiae* também demonstra influência sobre a via de glicosilação onde células mutantes para o gene que codifica GDA1 apresentam problemas na via de O-glicosilação. Isto parece ser consequência direta do baixo nível de GMP (falta da atividade da GDPase) que por sua vez interfere no mecanismo de transporte de açúcar-nucleotídeo para o interior do complexo de golgi (Herrero *et al.*, 2002).

Existe uma grande lacuna de conhecimento sobre as GDPases pertencentes a família das E-NTPDases. A maioria dos trabalhos sobre estas enzimas são feitos em leveduras, mas existem trabalhos como os de (Wang e Guidotti, 1998) que demonstram a existência, em células humanas de uma enzima com grande similaridade com as GDPases de levedura. No entanto esta enzima de humano apresenta uma preferência por UDP, apesar de hidrolisar com eficiência também GDP, UTP e GTP.

2.3. E-NTPDases e sinalização purinérgica do sistema imune

A maioria dos trabalhos sobre NTPDases, abordam a hidrólise de nucleotídeos de adenina e uracila tri e difosfatados e seus papéis na regulação da sinalização purinérgica. Relataremos agora os papéis dos nucleotídeos extracelulares e das NTPDases de mamífero envolvidas com seu metabolismo.

Os nucleotídeos extracelulares são sinalizadores celulares em diversos eventos, incluindo a regulação do sistema imune de mamíferos, atuando sobre receptores purinérgicos e pirimidinérgicos (Burnstock, 2007; Yegutkin, 2008). O conceito de um sistema de sinalização purinérgica utilizando nucleotídeos e nucleosídeos purínicos como mensageiros extracelulares, é conhecido há mais de 30 anos, onde temos o trabalho de (Burnstock, 1972) que já demonstrava a influência da liberação de ATP sobre células do sistema nervoso. Os purino-receptores são proteínas ancoradas à membrana celular que reconhecem purinas e pirimidinas, estas ao se ligarem ao receptor desencadeiam uma série de reações, alterando o comportamento celular. Os purino-receptores são divididos em receptores do tipo P1 e P2 (figura 5). Os receptores tipo P1 são subdivididos em A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 , sendo todos eles ativados pelo reconhecimento de adenosina (figura 5). Estes receptores possuem sete domínios transmembrana, e são acoplados a proteína G na porção citosólica, atuando na ativação ou inibição da adenilato ciclase. Os receptores P2 são subdivididos em dois grandes grupos (figura 5): os receptores tipo canal P2X ($P2X_{1-7}$), que quando interagem com ATP, possibilitam o fluxo de cátions de forma não seletiva através da membrana; e os receptores tipo serpentina, P2Y ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$ e $P2Y_{11-14}$). Uma das vias de ação destes receptores, quando ativados, é a ativação de fosfolipase C, que leva à produção de diacilglicerol e inositol trifosfato, culminando na mobilização de cálcio do retículo. Cada receptor possui uma sensibilidade distinta para determinados nucleotídeos e o sinal desencadeado por eles irá depender da célula que foi estimulada e da co-estimulação. Os receptores P2X são ativados por diferentes concentrações de ATP, dependendo do subtipo. Já os receptores P2Y podem ser ativados por diferentes concentrações de ATP, ADP, UTP, UDP, ITP e nucleotídeos ligados a açúcares, o que também é dependente do subtipo do receptor, para revisão (Lazarowski *et al.*, 2003; Robson *et al.*, 2006; Burnstock, 2007).

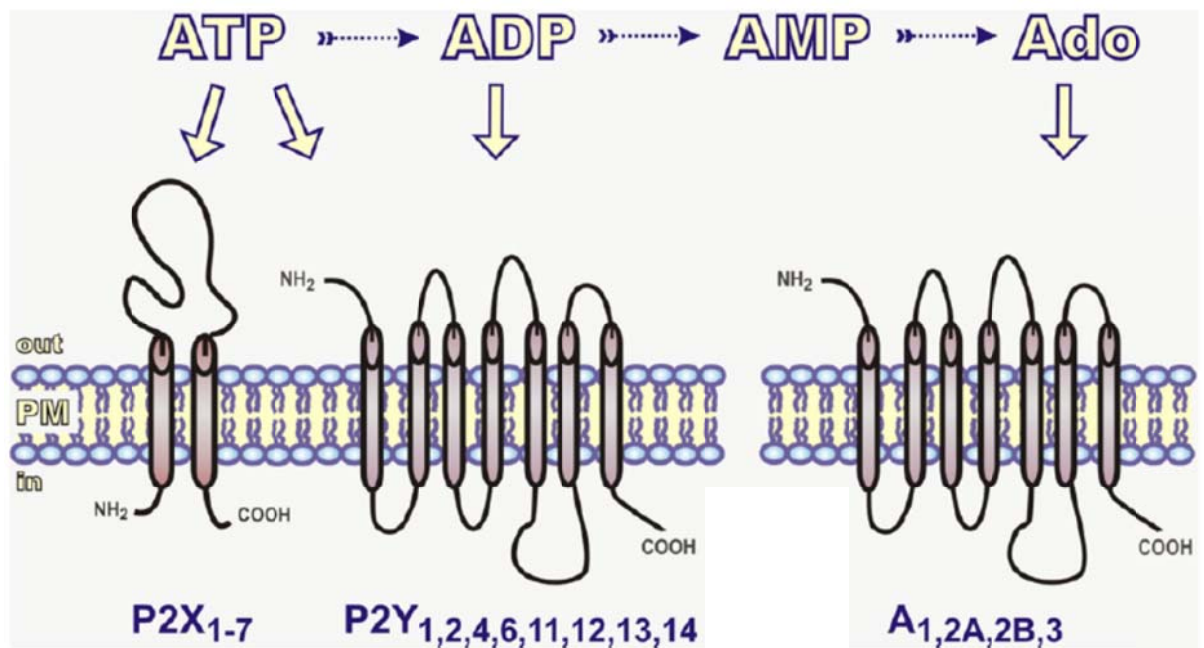


Figura 5: Topologia de membrana dos receptores P1 e P2 e uma sequência de alguns agonistas que podem ativá-los (Yegutkin, 2008). Nesta figura é possível verificar nucleotídeo que podem regular a ativação dos receptores P2X e P2Y.

Recentemente tem-se demonstrado em alguns trabalhos o efeito da ativação destes receptores em células do sistema imune, bem como a sua importância na modulação da resposta, por intermédio do controle de liberação de citocinas. No trabalho de (Kronlage *et al.*, 2010) foi demonstrado que os receptores P2Y₂ e P2Y₁₂ e os receptores P1A2a, A2b e A3 são importantes para o mecanismo de quimiotaxia dos macrófagos e que quando adicionado apirase de batata (uma E-NTPDase com alta atividade ATPásica e ADPásica) no experimento ocorre uma queda da quimiotaxia induzida por gradiente de C5a. O mesmo ocorre quando é feita uma inibição dos receptores citados. A ativação ou inibição dos receptores P2 em monócitos podem causar alteração em repostas de outras células, como por exemplo, o seu efeito na migração de neutrófilos (Ben Yebdri *et al.*, 2009; Kukulski *et al.*, 2009). Os macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) secretam IL-8 que, por sua vez, estimula a migração de neutrófilos. No entanto a liberação de IL-8 é dependente de uma auto-estimulação de receptores P2Y₂ e P2Y₆. Por outro lado, ocorre uma diminuição na liberação de IL-8 quando é feita uma inibição destes receptores, seja por “knockdown” ou pelo uso de antagonistas ou mesmo pela adição de apirase de batata durante o estímulo com LPS (Ben Yebdri *et al.*, 2009). Já em estudo com neutrófilos humanos, é visto que a liberação polarizada de ATP juntamente com ativação de receptores P2Y₂ e P1A3 está relacionada com a amplificação do sinal do

controle de orientação e migração da célula. Quando é feita a adição de apirase nos ensaios é observada uma alteração na quimiotaxia dos neutrófilos. Outro fenômeno observado é a redução da formação de superóxido (Chen *et al.*, 2006). Com estes dados é possível verificar que os purino receptores têm um papel crucial no controle destas células, já que para migração de neutrófilos é preciso que o macrófago libere quimio-atraentes para desencadear a migração, mas para o macrófago liberar estas moléculas ele depende da ativação de purino receptores e os neutrófilos também dependem da ativação de seus purino receptores para se direcionarem e terem uma migração efetiva. Outro dado importante é que a adição de apirase nestes ensaios acarreta alterações nas respostas da célula. Todos estes ensaios foram feitos usando apirase de batata comercial e o intuito do estudo era demonstrar o efeito da eliminação dos nucleotídeos e não o papel da apirase da célula, no entanto observando os resultados deste trabalho é possível supor que a apirase da própria célula pode atuar nesta regulação.

Outro receptor muito importante para resposta imune é o P2X₇. Vários trabalhos demonstram que a ativação deste receptor é necessária para a ativação e eliminação de infecção pelos macrófagos. Estudos demonstram uma possível correlação entre ativação de P2X₇ de monócitos e macrófagos com liberação de IL-1 β . Nestes estudos verifica-se que a liberação desta interleucina é inibida com a adição do inibidor AG126, no entanto a correlação direta deste inibidor com o receptor P2X₇ ainda não é certa (Wewers e Sarkar, 2009). Este receptor parece agir também na via de controle de apoptose de monócitos e macrófagos infectados com *Mycobacterterium tuberculosis* (Placido *et al.*, 2006). Neste estudo é verificado que a apoptose induzida pela infecção por *M. turberculosis* é inibida quando o receptor P2X₇ é bloqueado. No trabalho de (Chaves *et al.*, 2009) é verificado um aumento de expressão do receptor P2X₇ em macrófagos infectados com *Leishmania amazonenses* quando comparado com células não infectadas e que a ativação deste receptor é importante para eliminação do parasito, já que células infectadas tratadas com ATP apresentaram uma redução na infecção e o mesmo não ocorre quando é usado um antagonista de P2X₇. Recentemente foi demonstrado que o receptor P2X₇ em macrófagos de camundongo C57BL/6 é regulado pela NTPDase-1 existente na própria célula. Em experimentos de indução de apoptose por ATP, verifica-se que células normais apresentam um índice de mortalidade muito menor do que células com o gene da NTPDase-1 “knockout”. Este dado sugere que a NTPDase-1 age como um regulador

da ativação do P2X₇, que por sua vez controla a indução de apoptose destas células (Levesque *et al.*, 2010). Foi possível verificar também que a secreção de IL-1 β e IL18 induzida pela ativação de P2X₇, é controlada pela NTPDase-1 (Levesque *et al.*, 2010). Observando a importância da NTPDase-1 na regulação deste receptor, podemos imaginar que outras NTPDases expressas por estas células podem ter um papel importante no controle deste e dos outros purino receptores. Provavelmente esta regulação é dependente do momento e do tipo de infecção que a célula está combatendo, já que cada situação leva a uma determinada resposta. Além disso, a expressão de E-NTPDases dos parasitos pode influenciar estas respostas, simulando o efeito regulador das enzimas da própria célula.

2.4. Correlação entre E-NTPDases e virulência de parasitos

Diversos trabalhos demonstram a participação das E-NTPDases no mecanismo de virulência de vários parasitos tais como, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* e outros (Berredo-Pinho *et al.*, 2001; Bisaggio *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2003; Pinheiro *et al.*, 2006; De Almeida Marques-Da-Silva *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009). Recentemente, foi demonstrado para *T. cruzi* que diferentes cepas com diferentes capacidades infecciosas apresentam um perfil de hidrólise para ATP e ADP distintos e uma mesma cepa mantida “in vitro” por vários ciclos apresenta redução na razão de hidrólise ATP/ADP, sendo esta mudança na atividade ecto-nucleotidásica acompanhada por uma perda na capacidade infecciosa deste parasito. Uma perda significativa na capacidade infecciosa também foi notada em ensaios com inibidores específicos para NTPDase (Santos *et al.*, 2009). Neste mesmo trabalho foram mostrados resultados que indicam a existência de dois mecanismos distintos de ação das NTPDases do parasito na infecção: um mecanismo dependente da atividade ecto-nucleotidásica. Em testes usando inibidores específicos para apirase (suramina, cloreto de gadolínio e ARL 67156) foi verificado uma redução na infecção presença destes inibidores, e um mecanismo independente de atividade enzimática. Em um outro teste de infecção usando um antisoro policlonal específico, que não inibe atividade da enzima, foi verificado também uma redução no número de parasito por células infectada.

Em trabalho com *L. amazonensis* (Berredo-Pinho *et al.*, 2001) demonstrou-se a existência de uma ecto-ATPase dependente de magnésio e sensível a suramina

(inibidor para NTPDases) na superfícies de células intactas do parasito, sugerindo um possível papel desta enzima na via de captação de adenosina e também na virulência do parasito. Em outro trabalho com diferentes espécies de *Leishmania* (De Almeida Marques-Da-Silva *et al.*, 2008) demonstrou-se que as espécies *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major* apresentavam um perfil de hidrólise distinto para ATP, ADP e AMP, sendo este dado de hidrólise diferenciado entre as espécies comprado com as lesões geradas na pata de camundongos (C57BL/6). Para *L. amazonensis*, a atividade foi maior, sendo a lesão não curada no modelo animal usado. Além disso, foi possível comprovar por “western blotting” a existência de NTPDase-2 (a isorforma menor da enzima) na membrana do parasito. Para isso foi usado um anti-soro anti-NTPDase-1 de *T. cruzi*. Em publicação recente demonstrou-se a presença de uma ATP difosfohidrolase, nome sinônimo de E-NTPDase, capaz de hidrolisar ATP e ADP, na superfície de promastigotas de *L. braziliensis*. Apesar de usarem um anticorpo policlonal contra apirase de batata, os autores conseguiram um bom reconhecimento da enzima de *L. braziliensis*, tendo a banda proteica reconhecida massa molecular compatível com a NTPDase2 predita no genoma deste parasito (Rezende-Soares *et al.*, 2010).

Desta forma, considerando a importância dos nucleotídeos extracelulares como sinalizadores, e das E-NTPDases como fatores de infectividade e virulência de patógenos, estas enzimas se mostram atualmente como alvos promissores para estudos, sendo que é de extrema importância obtermos um melhor conhecimento sobre estas enzimas para que possamos interferir no papel das mesmas no processo de infecção relacionado as doenças e quem sabe assim abrir novas perspectivas de uso destas como alvo quimioterápico, imunoterápico ou no diagnóstico.

Neste trabalho foram feitas algumas análises de bioinformática das sequências de aminoácidos das duas isoformas de NTPDases presentes em *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. major* e também de *T. brucei* e *T. cruzi*. As análises consistiram em fazer um alinhamento das sequências, com posterior agrupamento usando três métodos diferentes de geração de árvores e análises para determinação de peptídeo sinal amino-terminal. Foi analisada a possível localização subcelular de cada uma das proteínas e a existência de sítios de N e O-glicosilação e possíveis pontes de dissulfeto. Além disto foi feita a clonagem em vetor de expressão pET 21-b (NOVAGEN) da porção solúvel da NTPDase-1 de *L. infantum chagasi* com o objetivo de fazer a caracterização bioquímica desta enzima. A enzima expressa foi purificada,

parcialmente caracterizada bioquimicamente e usada na produção de anti-soro policlonal anti-NTPDase-1. Por fim foram feitos testes de influência da NTPDase-1 no crescimento e metaciclogênese de *L. braziliensis* em cultivo axênico de promastigotas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o possível papel da NTPDase-1 de *L. infantum chagasi* no organismo de origem e utilizar as informações obtidas sobre a ação da enzima em cultura de *Leishmania* para verificar a importância desta enzima na biologia do protozoário, o que no futuro poderá ser um conhecimento importante para o desenvolvimento de drogas para o tratamento da doença causada por estes parasitos.

3.2. Objetivos específicos

1. Realizar análises “in silico” (avaliar possível localização subcelular, possíveis glicosilações e pontes de dissulfeto, fazer um agrupamento baseado nas conservações existente entre as diferentes NTPDases) das E-NTPDases de *L. braziliensis*, *L. infantum chagasi*, *L. major*, *T. brucei* e *T. cruzi*.
2. Clonar em vetor de expressão pET21-b a região que codifica a porção solúvel da NTPDase-1 de *L. infantum chagasi*.
3. Padronizar a expressão e purificação da enzima na forma ativa.
4. Caracterizar bioquimicamente a enzima, verificando a preferência de substrato e determinando a faixa de pH em que a mesma apresenta maior atividade.
5. Produzir anti-soro policlonal anti-NTPDase-1 recombinante.
6. Avaliar o efeito da adição da L. i NTPDase-1 recombinante em cultura axênica de promastigotas de *L. braziliensis*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Análises por bioinformática das E-NTPDases de Tripanosomatídeos

Inicialmente foram selecionadas no banco de dados *UniProtKB* (<http://www.uniprot.org/>) as sequências de aminoácidos das diferentes isoformas de E-NTPDases de *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. major*, *T. brucei* e *T. cruzi*, sendo duas isoformas para cada organismo, com exceção de *T. cruzi* onde só existe uma proteína descrita até o momento. O primeiro passo do trabalho foi fazer um alinhamento com estas sequências usando o programa ClustalX2 (Thompson *et al.*, 1997; Larkin *et al.*, 2007). Para isso, todas as sequências foram agrupadas em um único arquivo fasta e para rodar o programa, foi usada a configuração padrão do mesmo. O arquivo fasta de saída gerado foi analisado manualmente para verificar se todas as ACRs estavam alinhadas. Com este alinhamento em mãos foram feitas três análises de agrupamentos diferentes. O primeiro agrupamento foi feito usando o método “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean” (UPGMA), no segundo foi usado o método “Neighbor joining”, sendo ambos feitos no programa Mega 4.1 (Kumar *et al.*, 1994; Tamura *et al.*, 2007). Para os dois primeiros os programas foram usados na sua configuração padrão e 10.000 gerações. O terceiro agrupamento foi feito com o método de inferência Bayesiana (Markov chain Monte Carlo MCMC) usando o programa MrBayes v3.1 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001). As árvores filogenéticas foram calculadas utilizando 20.000.000 de gerações. O uso dos 3 métodos foi feito com intuito de verificar se os grupos eram consistentes e assim validar os resultados, pois os dois primeiros possuem algoritmos que analisam similaridade de sequência e o terceiro analisa distância com base em evolução.

Cada sequência foi analisada individualmente em outros programas. O primeiro foi o signal P 3.0 (Bendtsen *et al.*, 2004), para verificar presença de peptídeo sinal ou uma possível região transmembrana amino terminal (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). A análise subsequente foi feita com o programa TargetP 1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2000), analisando possível localização subcelular para proteínas de eucariotos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). A próxima etapa das análises foram a avaliação de sítios de O-glicosilação e N-glicosilação e de possíveis pontes dissulfeto em cada sequência do agrupamento. Para determinar sítios de O-glicosilação foi usado o programa DictyOGlyc 1.1 (Gupta

et al., 1999). Este programa foi feito baseando em resultados de estudos de proteômica de *Dictyostelium discoideum* (um protozoário), sendo este um organismo modelo para glicosilação de proteínas de eucarioto (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DictyOGlyc/>). Os possíveis sítios de N-glicosilação foram determinados pelo programa NetNglyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Para predição de pontes foi usado o programa Scratch Protein Predictor. Dentro deste programa usou-se o DIpro (Cheng et al., 2006), (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/index.html>).

A seguir apresenta-se a tabela 1 que contém os dados sobre as sequências das proteínas analisadas.

Tabela 1: E-NTPDases analisadas

Enzima	Organismo	Cepa	Código de acesso
Guanosina difosfatase (L. b NTPDase-1)	<i>L. braziliensis</i>	M2904	A4H5Z8_LEIBR
Nucleosideo difosfatase (L. b NTPDase-2)	<i>L. braziliensis</i>	M2904	A4H7X3_LEIBR
Guanosina difosfatase (L. i NTPDase-1)	<i>L. infantum</i>	JPCM5	A4HUC4_LEIIN
Nucleosideo difosfatase (L. i NTPDase-2)	<i>L. infantum</i>	JPCM5	A4HWA0_LEIIN
Guanosina difosfatase (L. m NTPDase-1)	<i>L. major</i>	Friedlin	Q4QHK3_LEIMA
Nucleosideo difosfatase (L. m NTPDase-2)	<i>L. major</i>	Friedlin	Q4QF11_LEIMA
Nucleosideo fosfatase (T. c NTPDase-1)	<i>T. cruzi</i>	CL Brener	Q4D4Q0_TRYC R
Nucleosideo fosfatase (T. br NTPDase-1)	<i>T. brucei</i>	GUTat10.1	Q6IEK0_9TRYP
Nucleosideo difosfatase (T. br NTPDase-2)	<i>T. brucei</i>	GUTat10.1	Q57V17_9TRYP

4.2. Organismos usados nos experimentos

Para elaboração deste trabalho foram utilizadas duas cepas de *Escherichia coli*, *E. coli* DH5 α que foi usado nos ensaios de clonagem e a BL21 codon plus-RIL (STRATAGENE) que foi usado nos ensaios de expressão heteróloga. Para o ensaio de cultivo de *Leishmania* “in vitro” foi usada a *L. braziliensis* cepa M2904.

4.3. Meios de culturas usados

Para os ensaios com *E. coli* foram utilizados dois meios diferentes. O meio Luria-Bertani (LB) (1% de bacto-triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl, pH 7,0), líquido ou sólido (adição de 1,5% de agar) com ou sem 50 µg/mL de ampicilina. Este meio foi usado nos experimentos de clonagem e na expansão de BL21, antes da indução da expressão. Para a expressão o meio utilizado foi meio SOC (2 % de bacto-triptona, 0,5% de extrato de levedura 0,05% de NaCl, 10 mM de MgCl₂, 2,5 mM de KCl e 20 mM de glicose, pH 7) que é uma modificação do meio SOB (Sambrook e Russell, 2001). A cultura de *L. braziliensis* foi mantida em meio de Grace's (Sigma) pH 6,5, suplementado com 10% soro fetal bovino (LGC), 2mM de L-glutamina e 100µg/mL de penicilina (Grace, 1962; De Almeida Marques-Da-Silva *et al.*, 2008).

4.4. Obtenção de células competentes e transformação

Para obtenção das células competentes inicialmente foi feito um pré-inóculo das cepas de *E. coli* em 4 mL de LB. As células foram incubadas sob agitação de 180 rpm a 37°C por aproximadamente 20 horas. Em seguida foi feita, expansão das culturas para 100 mL de meio LB. Neste ponto foi feita uma diluição de 50 vezes. Então as células foram crescidas até atingir DO₆₀₀ ≈ 0,5de 0,5 (a leitura foi feita em cubeta com caminho ótico de 1 cm). Quando as células alcançaram a expansão desejada, foram centrifugadas a 12500 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em 40 mL de solução de CaCl₂ 0,1 M (solução esterilizado e gelada). Este material ficou no gelo por pelo menos 1 hora e depois foi centrifugado novamente e o precipitado foi suspenso com 1mL de solução de CaCl₂ 0,1 M, sendo o volume completado com 176 µL de glicerol (para ficar em concentração de 15%). As células foram estocadas em freezer a -80°C em alíquotas de 100 µL, protocolo adaptado de (Sambrook e Russell, 2001). Para transformação das células foi usado o método de choque térmico descrito em (Sambrook e Russell, 2001) com alteração apenas nos volumes de material genético usado. Para produtos de ligação usados durante a clonagem foram adicionados 20 µL da reação de ligação (vetor mais gene alvo), enquanto que para a transformação e indução da expressão foi usado apenas 1µL da extração de DNA plasmidial que corresponde aproximadamente a 50 ng.

4.5. Clonagem da NTPDase-1 de *L. infantum chagasi*

O gene de 2034 pares de base que codifica a NTPDase-1 de *L. infantum chagasi* foi isolado da cepa M2682 e clonado em vetor pGEM-T Easy pelo aluno Murilo Sena Amaral, sendo esta construção usada para fazer a subclonagem da região que codifica a proteína solúvel.

A sequência de aminoácidos da NTPDase-1 de *L. infantum* (XM_001463628) foi inicialmente avaliada nos programas SignalP-NN, para predição de peptídeo sinal (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e TMAP, para predição de transmembrana (<http://seqtool.sdsc.edu/>). Posteriormente foi feito um mapeamento de restrição deste gene e do vetor pET21 b (NOVAGEM) para encontrar sítios para enzimas de restrição compatíveis que permitiriam a inserção dos genes neste vetor (figura 6), sendo escolhidas as enzimas Xho I e Nde I. A escolha deste vetor foi devido ao fato do mesmo fusionar uma cauda de 6 resíduos de histidina na porção C-Terminal da proteína, o que possibilita purificação por cromatografia de afinidade em resina de níquel ou cobre. Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores (figura 7) para amplificar a porção que codifica somente a porção predita como solúvel da enzima (domínio extracelular). Foram adicionados nos oligonucleotídeos sítios de restrição para a enzima Nde I (iniciador direto) e Xho I (iniciador reverso). O gene então foi amplificado por PCR usando Taq de alta fidelidade (Pfu DNA polimerase – Fermentas). As condições de amplificação consistiram de um passo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos, 34 ciclos de 94°C por 1 minuto; 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, e o passo final de 74°C por 5 minutos, posteriormente baixando a temperatura para 4°C indefinidamente. O produto (1953 pares de base) gerado foi purificado, usando o kit PureLink™ Quick Gel Extraction (Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante. O material purificado foi clonado em vetor de amplificação pGEM-T Easy (figura 8), as enzimas e os procedimentos usados nesta etapa seguiram as recomendações do fabricante PROMEGA.

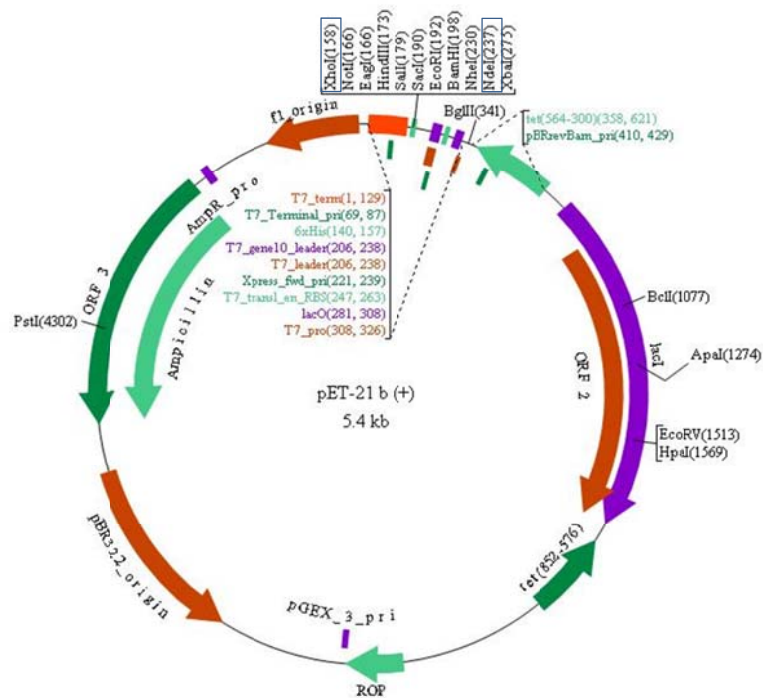


Figura 6: Mapa do vetor de expressão pET21 b (NOVAGEM).

sNTPDase-1_Lc_pET21b-FW – 5' **ATACATATGAACCCGCTTCAGTCG** 3'
sNTPDase-1_Lc_pET21b-RV 5' **ATCTCGAGGGTAAGAGAGAGGAG** 3'

Figura 7: Oligonucleotídeos iniciadores usados para amplificação do gene da NTPDase-1 de *L. infantum chagasi*: A região marcada de amarelo corresponde aos sítios de clivagens adicionados para posterior ensaio de restrição

Em seguida a construção pGEM/NTPDase-1 foi usada para transformar bactérias *E. coli* DH5 α competentes, obtidas pelo método de cloreto de cálcio (Sambrook e Russell, 2001). A seleção dos transformantes foi feita em meio LB sólido com ampicilina, X-Gal e IPTG, crescidas a 37°C por cerca de 20 horas (Sambrook e Russell, 2001). As colônias que tiveram marcação branca, foram crescidas em meio LB líquido por aproximadamente 20 horas a 37°C em rotação de 180 RPM. Em seguida foi feita a extração de DNA plasmidial com o kit do kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega). Foi feito então o ensaio de restrição com 1 μ L das enzimas Nde I e XhoI (Fermentas) e com 1 do DNA plasmidial contendo aproximadamente 50 ng de DNA, seguindo recomendações do fabricante das enzimas. O ensaio de restrição do gene foi feito por 2 horas a 37°C, e o tampão usado foi o indicado pelo manual das enzimas. Neste mesmo passo foi feito isoladamente o ensaio de restrição com o vetor pET21 b usando as mesmas enzimas (Figura 8). O fragmento liberado e o vetor pET21 b aberto foram purificados

separadamente usando o mesmo kit anterior PureLink™ Quick Gel Extraction (Invitrogen), sendo a amostra final suspensa em 50 µL de água ultra pura esterilizada. A reação de ligação foi feita a uma temperatura de 4°C por 20 horas, em um volume de 20 µL com 1µL de plasmídeo digerido e purificado (aproximadamente 50 ng de DNA), 5 µL do gene da *L. i* NTPDase-1 purificado (aproximadamente 100 ng de DNA), 1 µL T4DNA ligase (fermentas), o restante foi feito conforme manual do fabricante da ligase.

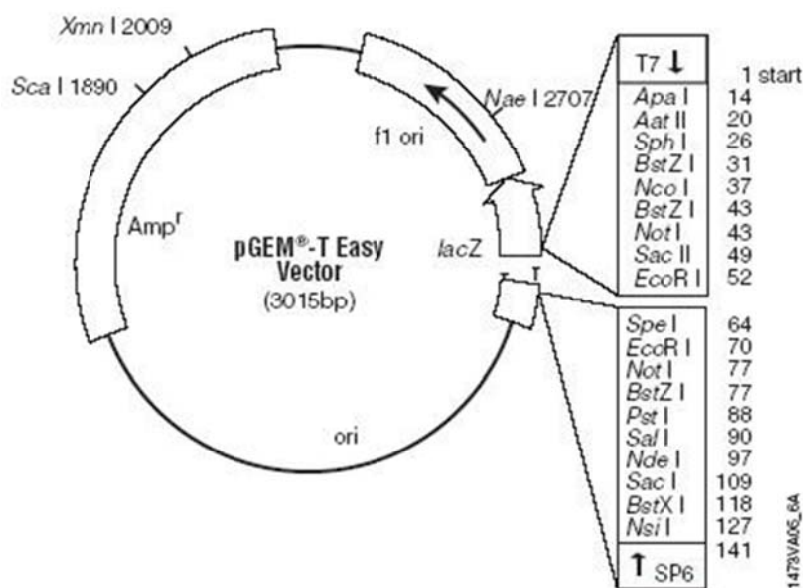


Figura 8: Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega).

A construção gerada nesta etapa foi então usada para transformar *E. coli* DH5α, seguindo o mesmo procedimento usado na clonagem anterior. As colônias que cresceram em meio LB sólido com 50 µg de ampicilina foram isoladas e armazenadas em freezer -80 °C com 15% de glicerol e 85% de meio. Em seguida cada colônia foi crescida em meio LB com 50 µg de ampicilina e posteriormente feita a extração de DNA plasmidial (segundo o mesmo protocolo descrito anteriormente). As extrações de DNA plasmidial foram usadas para fazer ensaios de restrição com as enzimas Nde I e Xho I (Fermentas). As amostras que no ensaio de restrição liberaram um fragmento no tamanho esperado (1953 pb) foram então enviadas para sequenciamento. O sequenciamento completo do inserto foi feito pela empresa MACROGEN (www.macrogen.com). Os primers utilizados foram os que estão descritos no manual do vetor. Com a sequência consenso foi feito um blast-N (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para confirmar se a clonagem estava

correta. Todas as análises dos resultados de extração de DNA plasmidial, PCR, e ensaio de restrição foram feitas por eletroforese usando como matriz gel de agarose 1,2 % em tampão TBE (Sambrook e Russell, 2001). Após a corrida o gel foi corado com brometo de etídio e as bandas de DNA visualizadas sob luz U.V.

4.6. Confirmação e testes de expressão da NTPDase-1 recombinante

A construção pET21b/NTPDase-1 de *L. infantum chagasi* foi utilizada para transformar bactérias *E. coli* BL21 codon plus-RIL (STRATAGENE). As células transformadas foram colocadas para crescer em meio SOC com 50 µg/mL de ampicilina em incubadora por 20 horas a 37°C em uma de 180 RPM. Posteriormente as células foram transferidas para um novo meio com 50 µg/mL de ampicilina fazendo uma diluição de 20 vezes e deixadas crescendo mais duas horas. Após este tempo o material foi transferido para um maior volume (10-20 mL) de meio SOC sem antibiótico. A incubação foi feita da mesma forma. As culturas foram incubadas até que atingissem um $DO_{600} \approx 0,6$, sendo então adicionado 0,5 mM de IPTG (Fermentas). As células foram incubadas por mais 2 horas. Para os experimentos padrão de expressão em testes iniciais foram feitas induções em diferentes tempos para determinar o melhor tempo de indução. Foram utilizadas as técnicas de SDS-PAGE 10% e “western-blotting” para avaliação da expressão proteica, segundo descrito em (Sambrook e Russell, 2001).

Para o “western-blotting” foi utilizado como marcador de indução o anticorpo monoclonal anti-Histidina (Sigma), e para marcar o anticorpo primário foi usado o anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma). Após as etapas de lavagens e incubação descritas em (Sambrook e Russell, 2001), foi feita a marcação da membrana usando como substrato um solução tampão de 50 mM de Tris pH 7,2, com 10 mg de 3,3'- Diaminobenzidina tetrahydroclorida (DAB) fornecido pela Sigma e adicionando 10 µL de peróxido de hidrogênio 30%. No “western-blotting”, feito para determinar melhor tempo de expressão, cada amostra de célula induzida ou não, foi lisada e centrifugada a 12500 x g a 4°C por 30 minutos para separar os corpos de inclusão (C.I), sendo usados apenas os corpos de inclusão para determinar o tempo de indução.

4.7. Quantificação de proteína

O método usado para determinação da concentração de proteína foi o método de Bradford (Bradford, 1976), seguindo o manual do fabricante BioRad. Os ensaios foram feitos em microplacas em um volume final de 200 μL , onde 160 μL de amostra mais água ultra pura (sendo preparado 40-100 μL de amostra e completando o volume com água para assim obter um volume final de 160 μL) e 40 μL de reagente de Bradford concentrado. A leitura foi feita em leitora de microplaca Synergy HT (BioTek) no comprimento de onda de 595 nm. Para a conversão de absorbância em concentração de proteína foi feita uma curva padrão com soro albumina bovina (BSA) (Sigma).

4.8. Purificação da NTPDase-1 recombinante

Com os testes de expressão feitos, o próximo passo foi fazer ensaios de expressão em maior volume para obter amostras para purificação. A expressão neste momento foi feita da mesma forma descrita anteriormente porém em um volume de 500 mL. Após 2 horas de indução, a cultura foi fracionado em alíquotas de 50 mL em tubos cônicos e centrifugado a 12500 $\times g$, em temperatura de 4°C por 10 minutos. O precipitado obtido de cada alíquota foi congelado em freezer -80°C, e estas amostras foram usadas nos ensaios de purificação.

Na etapa de purificação o precipitado congelado foi suspenso em 4 mL do tampão de lise contendo inibidores de proteases (50 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 1 mg/mL de lisozima, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinina, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pepstatina e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de leupeptina). Para que a lisozima pudesse agir, a suspensão foi mantida em gelo por 30 minutos. Posteriormente, a amostra foi sonicada em 6 ciclos de 10 segundos com intervalo de 10 segundos, usando 10 watts de potência, sempre no gelo. Posteriormente, foi feito um processo de clareamento dos corpos de inclusão, onde o lisado foi centrifugado a 12500 $\times g$ a 4°C por 30 min. O precipitado desta centrifugação foi lavado duas vezes (alternando entre a suspensão e a centrifugação descrita acima) com 20 mL de tampão contendo 2 M de uréia (50 mM tris pH 7,2, 500 mM NaCl, 10 mM β -mercaptoetanol e 2 M de uréia). Após a lavagem o precipitado foi então solubilizado com 3 mL de tampão contendo 8 M de uréia (50 mM tris pH 7,2, 500 mM NaCl, 10 mM DTT e 8 M de uréia) seguindo o protocolo descrito por (Palmer e Wingfield, 2004), alterando apenas o uso do Triton – X 100 que foi abolido no presente protocolo.

Posteriormente, foi feita uma diluição da uréia com o mesmo tampão A usado no FPLC (descrito abaixo). Assim, nos corpos de inclusão solubilizados foi gotejado lentamente o tampão A até chegar em um volume de 12 mL. Esta amostra é centrifugada mais uma vez a 12500 x g a 4°C por 30 min e aplicada em FPLC AKTA PURIFIER UPC10 (GE Healthcare) usando looping de 10 mL e coluna de afinidade HisTrap FF crude 1 mL. Para o uso do sistema Akta foram preparados dois tampões com concentrações diferentes de imidazol: O tampão “A” (50 mM de tris, 100 mM de NaCl e 5 mM de imidazol) e o tampão “B” (50 mM de tris, 100 mM de NaCl e 250 mM de imidazol), sendo o primeiro tampão para promover interação da resina com as proteínas e o segundo para eluir as proteínas que interagiram com a resina da coluna. Em um primeiro teste foi feito um ensaio de purificação em eluição por gradiente crescente de imidazol, variando de 5-250 mM. Após determinação do ponto mínimo da concentração de imidazol para eluir a proteína recombinante o experimento passou a ser feito em apenas 3 etapas. A primeira consistiu em passar na coluna a amostra de proteína na presença de 5 mM de imidazol (concentração do tampão A). Posteriormente, a coluna foi lavada com 7 mL de tampão A contendo 10% de tampão B e posteriormente eluída com 100% do tampão B, coletando frações de 1,2 mL, sendo que as frações 2 e 3 apenas foram aproveitadas para os ensaios seguintes. Logo em seguida, as amostras 2 e 3 foram somadas e dessalinizadas em coluna Hitrap Desalting 5 mL. Neste ponto foi feita a substituição do tampão B por tampão de atividade enzimática (50 mM HEPES pH 7,2, 50 mM tris pH 7,2, 116 mM NaCl, 5 mM KCl e 5 mM MgCl₂), conforme descrito no trabalho de (Berredo-Pinho *et al.*, 2001). Estas amostras então foram quantificadas e colocadas a 4°C por 24 horas para posterior ensaio enzimático.

Para avaliar o rendimento e a qualidade das purificações algumas amostras foram analisadas em Bioanalyzer (Agilent). Para isso, utilizado o kit proteína 230 (<http://www.genomics.agilent.com/CollectionSubpage.aspx?PageType=Product&SubPageType=ProductData&PageID=1644#proteinKits>), foram aplicadas as amostras obtidas antes de serem purificadas em FPLC e após a eluição. Para obter um bom resultado todos os procedimentos seguiram as especificações do manual do fabricante para corrida desnaturante.

4.9. Obtenção de soro com anticorpos policlonais anti-NTPDase-1 recombinante

Inicialmente nosso grupo adquiriu uma coelha de aproximadamente 3 meses de idade. Este animal foi mantido no coelhário do departamento de veterinária da UFV. Antes da primeira imunização foi feita uma coleta de sangue da coelha para obtermos o soro pré-imune, esta coleta foi feita pela veia marginal da orelha do animal. Para separar as células do soro, o sangue coletado foi submetido a centrifugação a 1500 x g por 10 minutos, em temperatura ambiente, sendo que antes da centrifugação o sangue ficou de 15-30 minutos em temperatura ambiente. As injeções foram preparadas na proporção 1:1 de adjuvante e amostra, sendo a aplicação subcutânea feita no dorso e região abdominal do animal. A primeira injeção aplicada na coelha continha adjuvante de Freud completo e 75 µg de proteína recombinante. Após 21 dias foi feita a segunda imunização com adjuvante de Freud incompleto mais 150 µg de proteína recombinante. A coleta do sangue para obter o soro imune foi feita 15 dias após a segunda imunização.

O título do anti-soro anti-NTPDase-1 foi determinado por Dot-elisa: Foram cortados discos de membrana de nitrocelulose, que foram colocados dentro de uma microplaca com 96 poços, 1 por poço. Cada disco foi sensibilizado com 0,5 µg de rNTPDase-1 purificada. Para os procedimentos posteriores foram seguidos os mesmos usados na técnica de “western-blotting” com diferença que foi feita uma variação na diluição do soro imune de 1:50 a 1:102400. Como anticorpo secundário foi usado anti-IgG de coelho (Sigma) conjugado com peroxidase na proporção 1:6000. A revelação foi feita com o mesmo substrato do “western blot” descrito anteriormente.

4.10. Dosagem de atividade nucleotídica

Os ensaios foram feitos em microplaca de 96 poços em volume de reação de 80 µL. Para isso foi usado o equipamento de leitura synergy HT (Biotek) que possui uma incubadora de temperatura que permite trabalhar em temperaturas. A placa foi preparada com o tampão de atividade (50 mM HEPES pH 7,2, 50 mM tris pH 7,2, 116 mM NaCl, 5 mM KCl e 5 mM MgCl₂) mais substrato (ATP, ADP, GTP, GDP, UTP e UDP) na concentração final de 1,5 mM. A placa foi colocada na incubadora e deixada por 5 minutos para equilibrar a temperatura (37°C), a reação sempre era disparada com adição da enzima na concentração de 0,1-0,5 µg (concentração colocada dentro

da placa) e parada com adição de 80 µL de HCl 0,2 M após 20 minutos de reação. Para o ensaio de determinação de pH de máxima atividade foi usado tampão contendo 50 mM HEPES, 50 mM tris, MES 50 mM, 116 mM NaCl, 5 mM KCl e 5 mM MgCl₂, diferente do descrito acima e o pH foi acertado de 5,5 à 9, variando de 0,5 de um ponto para o outro. A medida da atividade enzimática foi feita através da dosagem de fosfato inorgânico liberado na hidrólise e para isso foi usado o protocolo descrito por (Ekman e Jager, 1993), adaptando para os volumes usados na microplaca e fazendo a leitura em 650 nm. Para a conversão de absorbância em nmol de fosfato, foi feita uma curva padrão de fosfato a partir de uma solução estoque de Na₃PO₄ 12H₂O 1,5 mg/mL.

4.11. Tratamento da cultura de *L. braziliensis*

Células de *L. braziliensis* gentilmente cedidas pelo Dr. Luís Carlos Croco Afonso da Universidade Federal de Ouro Preto foram cultivadas em placas de cultivo de 6 poços contendo 7 mL de meio Grace (Sigma). A cultura foi expandida a partir de um número fixo de células (1×10^5) por poço e a placa foi mantida em estufa BOD a 25°C por 48 horas. Após este tempo, cada poço recebeu um tratamento específico, sendo um poço reservado como controle. Ao primeiro poço foi adicionado tampão de atividade, sendo usado mesmo volume que teria de ser usado quando fosse adicionar a enzima. No segundo poço adicionou-se 0,43 µg/mL de enzima recombinante, no terceiro poço usou-se 0,43 µg/mL de enzima mais 0,0438 mM de GTP, no quarto poço foram adicionados 2,14 µg/mL de enzima mais 0,0438 mM de GTP, no quinto poço adicionou-se 0,0438 mM de GTP. Após a adição dos componentes citados, as placas foram colocadas na estufa BOD mais uma vez por mais 48 horas. Após este tempo foi feita a contagem total de células de cada poço. Todas as contagens foram feitas usando câmara de Neubauer, com os parasitos imobilizados por suspensão em solução de formalina (10% formol, PBS).

Após a contagem do número total de células de cada poço, foi feito um fracionamento por gradiente de ficoll para enriquecimento em formas metacíclicas seguindo o protocolo descrito por (De Almeida Marques-Da-Silva *et al.*, 2008). Após a separação por gradiente de ficoll as células foram contadas novamente e foi determinado o rendimento das formas metacíclicas, determinando o número total de

células obtidas após o gradiente em relação ao número de células contadas antes do gradiente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análises por bioinformática

As E-NTPDase possuem diferentes funções em diferentes tecidos e organismos. Algumas das funções possíveis e comprovadas foram apresentadas na revisão deste trabalho. Até o momento a importância destas enzimas em parasitos, está relacionada com a possível participação em mecanismos de virulência e via modulação da sinalização purinérgica dos hospedeiros e por consequência modulação da resposta imune (Berredo-Pinho *et al.*, 2001; Coutinho-Silva *et al.*, 2007; De Almeida Marques-Da-Silva *et al.*, 2008; Sansom, Robson *et al.*, 2008; Chaves *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009). Outra grande importância destas enzimas é a possibilidade delas auxiliarem em vias de captação de purinas em tripanosomatídeos, já que estes organismos não possuem vias de síntese de purinas e por consequência precisam captar purinas do meio extracelular (Nakaar *et al.*, 1998; Berredo-Pinho *et al.*, 2001). Também existe a possibilidade destas enzimas estarem participando diretamente de mecanismo de adesão celular entre parasito-célula hospedeira, como foi sugerido no trabalho de (Santos *et al.*, 2009), onde um soro policlonal anti-NTPDase-1 de *T. cruzi* diminuiu a infecção *in vitro*, mas não inibiu a atividade enzimática. O fato é que a maioria das enzimas estudadas até o momento hidrolisam nucleotídeos tri e difosfatados, apresentando uma preferência ou uma eficiência maior de hidrólise por substratos diferentes para cada enzima. A participação exata destas enzimas no mecanismo de infecção de parasitos ainda não foi demonstrada, mas existe trabalho que demonstra uma expressão aumentada no receptor P2X₇ em macrófagos infectados por *L. amazonensis* e que a ativação deste receptor é importante na eliminação do parasito (Chaves *et al.*, 2009).

Com o intuito de ampliar os conhecimentos sobre estas enzimas e seu papel nas infecções causadas pelas diferentes espécies de *Leishmania* e por *T. cruzi*, nosso grupo de pesquisa vem estudando incessantemente as diferentes isoformas nestas diferentes espécies. Neste trabalho os estudos se concentram na NTPDase-1 de *L. infantum chagasi*, mas para obter uma maior compreensão do todo e possibilitar uma correlação entre as diferentes isoformas das espécies de tripanosomatídeos (Tabela

1), algumas análises de Bioinformática que visam demonstrar similaridades e diferenças entre estas enzimas foram feitas.

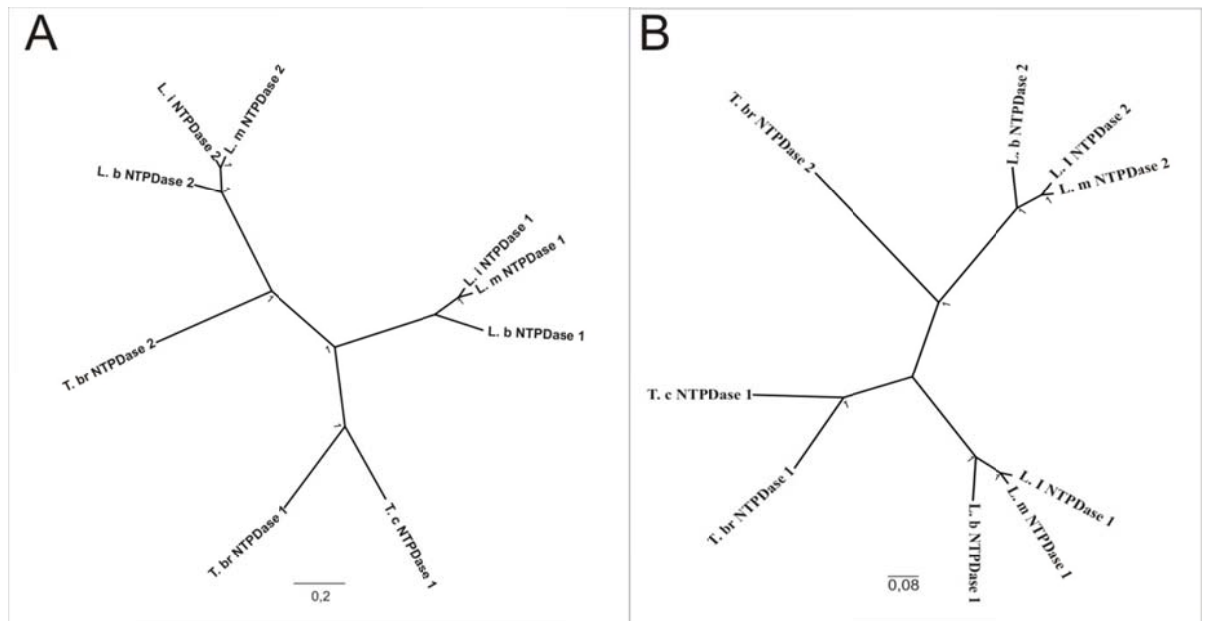
As sequências de aminoácidos das enzimas presentes na tabela 1 foram alinhadas usando o programa clustalX (Anexo 1) para um posterior agrupamento. O agrupamento foi feito através de 3 métodos diferentes, inferência Bayesiana-Markov chain Monte Carlo (MCMC), Neighbor joining e UPGMA (figura 9). Os dois últimos métodos geraram árvores idênticas (figura 9 B) e por isso ilustrou-se apenas uma das árvores. Estes métodos avaliam similaridade de sequência e por isso deduz-se que as proteínas que estão mais próximas na árvore possuem uma maior identidade de sequência do que as proteínas mais distantes. Então, as NTPDases-1 de *Leishmania* possuem uma maior identidade entre si, o mesmo ocorre com as NTPDases-2 e isso vale para as NTPDases-1 de *T. brucei* e *T. cruzi* também. Outra observação importante é que as NTPDases de *L. major* e *L. infantum* possuem uma maior identidade entre si do que quando comparado com NTPDases de *L. braziliensis*. A NTPDase-2 de *T. brucei* é a que apresentou menor identidade com as outras NTPDases-2. Na análise por inferência Bayesiana (figura 9 A), que é um método mais usado para determinar distanciamento evolutivo (sendo uma análise mais robusta), o que incorpora mutações conservativas e que pode está correlacionado com função, foi observado que a disposição dos grupos foi a mesma apresentada pela análise anterior, o que pode servir para validar estes grupos, já que duas análises diferentes apresentaram os mesmos agrupamentos.

Nas duas árvores da figura 9 formaram-se dois grandes grupos, os de NTPDase-1 e NTPDase-2, sendo que as NTPDases de *Trypanosoma* estão mais distantes das de *Leishmania*, e isso pode estar correlacionado com características bioquímicas e função biológica.

Para as NTPDases-1 já possuímos vários dados de caracterização bioquímica (ainda não publicados): a *T. c* NTPDase-1 apresenta uma maior preferência por nucleotídeos de guanosina e uridina do que de adenina, e sua preferência é maior por nucleotídeos difosfatados, comparando com os trifosfatados de guanosina e uridina; porém o Km para ATP é menor que para ADP, o que pode sugerir maior afinidade por este substratos (dados não publicados Bastos et al., 2011, em preparação: Heterologous expression, biochemical characterizations and immunolocalization of *T. cruzi* NTPDase-1 virulence factor). O mesmo não é

observado para *L. i* NTPDase-1 que hidrolisa apenas GTP como será mostrado mais adiante (tabela 6). A *L.i*NTPDase-2, que foi estudada na dissertação de mestrado do estudante Raphael S. Vasconcellos defendida em 2010, possui uma atividade completamente distinta da *L. i* NTPDase-1(figura 9 C). Quando comparamos a atividade apresentada pela *L. m* NTPDase-2, que hidrolisa ADP, GTP, GDP, UTP e UDP, este dado não representa preferência por substrato, mas os nucleotídeos que esta enzima hidrolisa, observamos que elas hidrolisam os mesmo substratos que a *L. i* NTPDase-2, com diferença que aparentemente a *L. m* NTPDase-2 hidrolisa GDP e UTP que não são hidrolisados pela *L. i* NTPDase-2 (figura 9 C). Outra diferença está no pH de atividade máxima, onde a *T. c* NTPDase-1 (dados produzidos pelo grupo do professor José Roberto Meyer Fernandes) apresenta uma atividade maior em pH mais alcalino, quando comparado com as NTPDases de *L. infantum chagasi* em quanto que a *L.i* NTPDase-1 (gráfico 2) possui uma atividade maior em pH mais ácido e a *L. i* NTPDase-2 apresenta uma atividade maior em pH mais próximo do pH fisiológico (todos os dados experimentais sobre a NTPDase-1 de *T. cruzi* e NTPDase-2 de *L. infantum chagasi* discutidos neste trabalho ainda não foram publicados).

Estas diferenças entre estas enzimas podem ser favorecidas pelas pressões seletivas que estes organismos enfrentaram e pela localização ou momento (estágio) do ciclo de vida do parasito em que cada enzima deve estar atuando. Para as NTPDases 1 de *T. cruzi* e de *L. infatum chagasi* é possível comparação baseada nas diferenças que cada organismo causa na infecção já que possuem diferentes alvos celulares , hospedeiros invertebrados diferentes e são as formas de infecção distintas o que determina um ambiente completamente diferente (pH, concentração de ions e proteínas) para cada um dos parasitos. Agora quando comparamos a NTPDase-1 e 2 do mesmo organismo, é possível imaginar que a expressão e atuação destas enzimas podem ocorrer em estágios e regiões diferentes da célula, já que elas apresentam uma distinção enorme entre as características bioquímicas estudadas até o momento. Por exemplo: apesar da *L. i* NTPDase-2 hidrolisar GTP, a atividade da *L. i* NTPDase-1 é aproximadamente 47,4 vezes maior para este nucleotídeo. Os dados da caracterização bioquímica da *L. i* NTPDase-1 serão discutidos com mais detalhes mais a frente.



C

Preferência por substratos das NTPDases

Enzima	L. i NTPDase-1	*T. c NTPDase-1	*L. i NTPDase-2	**L. m NTPDase-2
Substratos	nmol Pi/ug *min	nmol Pi/ug *min	nmol Pi/ug *min	nmol Pi/ug *min
ATP	-	0,0843 ± 0,0139	-	-
ADP	-	0,1423 ± 0,0592	0,098 ± 0,031	0,483 ± 0,150
AMP	-	-	-	-
GTP	5,04 ± 1,85	0,6336 ± 0,1751	0,103 ± 0,022	0,084 ± 0,021
GDP	-	1,3356 ± 0,3214	0,001 ± 0,002	0,033 ± 0,011
UTP	-	0,5330 ± 0,1490	-	0,194 ± 0,067
UDP	-	1,2241 ± 0,1209	0,09 ± 0,007	0,061 ± 0,013

*Dados da L.i NTPDases-2 foram retirados da dissertação do Raphael S. Vasconcelos, defendida em 2010. Todos os dados ainda não foram publicados.

*Dados ainda não publicados das T. c NTPDase-1.

**Dados parciais da caracterização da L. m NTPDase-2

Figura 9: Agrupamento das NTPDases 1 e 2 de tripanosomatídeos, preferência por substrato da T. c NTPDase-1, L. i NTPDase-1, L. i NTPDase-2 e L. m NTPDase-2.
 A) Agrupamento feito por inferência Bayesian. B) Agrupamento feito pelos métodos Neighbor joining / UPGMA. As árvores foram feitas com alinhamento das sequências de aminoácidos das NTPDases de *Leishmania*, *T. brucei* e *T. cruzi*. Logo abaixo das árvores está apresentado a relação de hidrólise de substrato para a NTPDase-1 de *T. cruzi* e para NTPDase-1 e 2 de *L. infantum chagasi* (dados não publicados). Os dados apresentados sobre a L. i NTPDase-2 foram retirados da dissertação de mestrado do Raphael S. Vasconcelos, defendida em 2010. C) Tabela com dados de preferência de substrato das diferentes NTPDases.

Até o momento foram demonstrados dados que explicam as separações entre os grupos de NTPDases apresentadas neste trabalho. Agora serão demonstrado dados que possibilitam uma maior proximidade entre os grupos de NTPDases-1 e as NTPDases-2. Inicialmente foram feitas análises nos programas signal P e target P

para determinar a possibilidade de cada enzima possuir peptídeo sinal ou transmembrana (tabela 2) e assim sugerir suas localizações subcelulares (tabela 2). Foi observado que todas as NTPDases-1 de *Leishmania* possuem um sítio de proteólise logo após uma possível região de transmembrana, o que indica a existência de um peptídeo sinal amino-terminal. Já as NTPDases-1 de *Trypanosoma* possuem um domínio transmembrana N-terminal sem a presença do sítio de proteólise (tabela 2). Todas as NTPDases-2 possuem uma possível região transmembrana N-terminal e todas as NTPDases com exceção a T. br NTPDase-2 são enzimas secretadas. Estes dados sugerem que as NTPDases-1 de *Leishmania* são enzimas que possivelmente são secretadas na forma solúvel. As NTPDases 2 e NTPDases-1 de *T. brucei* e *T. cruzi* são enzimas secretadas que possuem uma possível região transmembrana sem sítio de proteólise, o que dá indícios de estas proteínas serem proteínas secretadas e ancoradas a membrana. Todos os valores de probabilidade para o SignalP estão acima de 0,8 (tabela 2) ou seja a chance de acerto quanto a existência de transmembrana ou peptídeo sinal é alta. Nosso grupo possui um dado que reforça esta idéia (dissertação defendida em 2010 pela aluna Luana Celina Seraphim Cunha, trabalho em preparação Bastos, et al., 2011) onde se demonstra que a T. c NTPDase-1 está presente na membrana de *T. cruzi*. Estes primeiros dados já sugerem um forte indício do porque os agrupamentos ficaram dispostos na conformação demonstrada na figura 9, já que as NTPDases-1 de *Leishmania* são possivelmente secretadas na forma solúvel e as NTPDases-2 possivelmente são ancoradas e quando comparamos as NTPDases-1 de *Leishmania* com *Trypanosoma* também vemos esta diferença entre ser secretada na forma solúvel ou ancorada a membrana.

Tabela 2: Predição de localização extracelular e transmembrana nas NTPDase-1 e 2

Enzima	Predição da localização pelo TargetP 1.1	Probabilidade de dada pelo TargetP 1.1	Predição da presença de peptídeo sinal ou transmembrana pelo SignalP 3.0	Probabilidade e dada pelo SignalP 3.0
L. b NTPDase 1	Secretada	0,772	Peptídeo sinal	0,801
L. i NTPDase 1	Secretada	0,931	Peptídeo sinal	0,994
L. m NTPDase 1	Secretada	0,937	Peptídeo sinal	0,996
T. c NTPDase 1	Secretada	0,913	Transmembrana	0,818
T. br NTPDase 1	Secretada	0,921	Transmembrana	0,929
L. b NTPDase 2	Secretada	0,678	Transmembrana	0,988
L. i NTPDase 2	Secretada	0,619	Transmembrana	0,988
L. m NTPDase 2	Secretada	0,610	Transmembrana	0,943
T. br NTPDase 2	Mitocôndria	0,676	Transmembrana	0,842

Em seguida foram feitas análises de possíveis sítios de glicosilação (tabela 3), onde é possível observar outras semelhanças e diferenças dentro e fora dos grupos. Estas análises foram feitas usando os programas DictyOGlyc e NetNGlyc. Antes de discutir o resultado, alguns detalhes da tabela 3 devem ser comentados: foram marcadas com cores diferentes as glicosilações que estão na mesma posição nas enzimas (em relação ao alinhamento do anexo 1) e foram inseridos na tabela apenas os dados de N-glicosilações que estavam acima do “cutoff” do programa e a posição apresentada na tabela não corresponde à mesma que está no alinhamento (anexo 1), já que no alinhamento tem de ser levado em consideração os “gaps” gerados.

Nesta análise é possível observar que nas NTPDases-1 de *Leishmania* existe pelo menos uma N-glicosilação que é conservada (marcada de vermelho na tabela 3). Isto ocorre também nas NTPDases-2 de *Leishmania* (marcada de azul na tabela 3). O mesmo pode ser dito para T. br NTPDase-1 e T. c NTPDase-1 (marcada de azul claro na tabela 3). Para L. i NTPDase-1 e L. m NTPDase-1, mais duas N-glicosilações conservadas foram observadas (marcadas de verde e amarelo na tabela 3). Apenas L. b NTPDase-1 e 2 e a T. br NTPDase-1 possuem O-glicosilação. Estas semelhanças entre as NTPDases-1 de *Leishmania* e de *Trypanosoma*, bem como as NTPDase-2 de *Leishmania*, proporcionam um maior suporte para o agrupamento proposto.

Tabela 3: Predição e análise de sítios de O-Glicosilação e N-glicosilação das NTPDases 1 e 2

Enzima	Predição de O-glicosilação pelo DictyOGlyc 1.1	Predição de regiões de N-glicosilação pelo NetNGlyc 1
L. b NTPDase-1	Ser 461	468 NVSA, 136 NTTA, 571 NFTG , 472 NDSK
L. i NTPDase-1	-	121 NFTA , 309 NETF , 557 NFTG
L. m NTPDase-1	-	317 NASV, 121 NFTA , 554 NFTG , 309 NETF , 573 NSSL
T. c NTPDase-1	-	220 NLTS , 229 NFSW, 233 NGTR, 186 NKTE, 156 NGSS, 572 NDTK
T. brNTPDase-1	Thr 103, Ser 124 e Ser 449	131 NMTG, 197 NLTS
L. b NTPDase-2	Thr 371	260 NGTS
L. i NTPDase-2	-	260 NGTS
L. m NTPDase-2	-	260 NGTL
T. brNTPDase-2	-	367 NVTV, 206 NSTA, 95 NSTH

Por fim, foram feitas análises de possíveis pontes dissulfeto em cada proteína e as conservações entre elas, usando o programa Scratch Protein Predictor que, na verdade, é uma página com um conjunto de ferramentas que podem fornecer dados sobre pontes dissulfeto, antigenicidade, solubilidade em super expressão e outros. Para este trabalho foi feito somente o estudo de pontes dissulfeto. Os resultados desta análise foram agrupados na tabela 4. As cisteínas que estão marcadas de mesma cor são conservadas, as que não estão marcadas não estão conservadas.

A primeira análise feita com este resultado foi a respeito de qual ponte dissulfeto poderia estar presente em todas as enzimas, pode-se observar que as pontes marcadas de vermelho e amarelo e as que estão marcadas de verde escuro e roxo estão presentes em todas as sequências, sendo T. brNTPDase-1 uma exceção para a ponte vermelha/amarelo. Neste caso a mesma cisteína marcada de amarelo nas outras sequências está presente na T. brNTPDase-1 e esta cisteína pode fazer uma ponte dissulfeto com uma outra cisteína. Outro ponto importante é que esta possível ponte marcada com as cores vermelhas e amarela corresponde a ponte dissulfeto (C330-C351) citada no trabalho de (Vivian *et al.*, 2010), sendo este um forte indicio para confirmação da existência desta ponte dissulfeto e uma possível importância estrutural.

Outra exceção similar à de T. br NTPDase 1 é a L. i NTPDase-1 que faria uma ponte diferente para a ponte marcada de verde escuro/ roxo, mas mantendo neste caso cisteínas que estão conservadas nas outras sequências e fazendo uma ponte em posição diferente.

Apesar das pequenas diferenças, estes dados sugerem que possivelmente estas duas pontes são estruturalmente importantes para estas enzimas já que as cisteínas são conservadas em todas as sequências e configuram uma possível ponte dissulfeto, principalmente para a ponte marcada pelas cores vermelha e amarela.

Claro que, para termos certeza, precisamos obter dados experimentais que confirmem esta idéia.

Quando a análise é focada apenas nas NTPDases-1 é observado que existe uma possível ponte presente apenas nestas enzimas (azul claro/verde claro), o que pode gerar uma enzima com uma conformação diferente das NTPDases-2 e que pode ser importante para a conformação do sítio ativo e possível preferência por substrato. No entanto, observando os dados bioquímicos da L. i NTPDase-1 e a T. c NTPDase-1 é possível verificar que ambas possuem atividades completamente distintas, contudo tem que se levar em conta as outras possíveis pontes dissulfeto que não são compartilhadas entre elas. A T. c NTPDase-1 possui uma possível ponte dissulfeto distinta (C12-C24).

Outras diferenças que devem ser levadas em conta são as possíveis glicosilações presentes na T. c NTPDase-1 e que não estão presentes na L. i NTPDase-1. As NTPDases-1 de *Leishmania* provavelmente são secretadas na forma solúvel enquanto as de *Trypanosoma* possuem domínio transmembrana o que também proporciona um suporte para explicar tamanha distinção na preferência de substrato por estas enzimas.

Já para as NTPDases 2 de *Leishmania* todas possuem uma possível ponte conservada (vermelho escuro / cinza), e as T. br NTPDases também possuem esta mesma ponte conservada. Esta ponte também pode ser uma conservação que permite uma distinção entre a estrutura das NTPDase-1 e 2 de *Leishmania* e quem sabe possa influenciar a sua afinidade por substrato.

Por fim a ponte dissulfeto marcada com cores azul escuro e rosa presentes nas NTPDase 1 de *Leishmania* também deve ser levada em consideração, já que esta ponte corresponde a ponte dissulfeto (C244-C264) citada no trabalho de (Vivian *et al.*, 2010) o que sugere uma maior possibilidade da existência desta ponte.

Tabela 4: Pontes dissulfeto das NTPDases 1 e 2

Enzima		Predição pontes dissulfeto				
L. b NTPDase-1			68 / 118	507 / 538	554 / 559	620 / 646
L. i NTPDase-1	277 / 326		53 / 103		493 / 540	606 / 632
L. m NTPDase-1			53 / 103	490 / 521	537 / 542	603 / 629
T. c NTPDase-1	15 / 24		68 / 117		504 / 509	559 / 587
T. br NTPDase-1		171 / 266	61 / 110		468 / 473	554 / 602
L. b NTPDase-2		45 / 124			306 / 311	361 / 377
L. i NTPDase-2		45 / 124			306 / 311	361 / 377
L. m NTPDase-2		45 / 124			306 / 311	361 / 377
T. brNTPDase-2		60 / 134				381 / 393

Até o momento foram apresentados dados de predição que apesar de possibilitarem uma infinidade de especulações, precisam ser comprovados experimentalmente em trabalhos futuros.

5.2. Estudos experimentais com a L. i NTPDase-1

Para efetuar a sub-clonagem da porção codificante do domínio solúvel, foi avaliado o resultado do programa SignalP. Como citado anteriormente este programa avalia a probabilidade da existência de peptídeo sinal ou domínio transmembrana amino terminal.

Esta avaliação é feita com base no potencial hidrofóbico que os primeiros 70 resíduos de aminoácidos amino terminal possam ter. Conforme a tabela 2 a L. i NTPDase-1 possui um possível peptídeo sinal, sendo então uma proteína possivelmente secretada na forma solúvel. Fazendo uma análise mais completa deste resultado (figura 10) verifica-se que o sítio de clivagem deste peptídeo sinal está entre os resíduos 28 e 29 desta enzima. Com o intuito de clonar apenas a região solúvel desta enzima, foi feito o desenho de iniciadores (figura 6) que amplificam apenas 1953 pares de base do gene da NTPDase-1 ou seja, amplifica após a região do peptídeo sinal. Então o gene que codifica a enzima solúvel foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (figura 11) e posteriormente foi clonado em vetor pGEM-T Easy e em seguida re-isolado por restrição e clonado em vetor de expressão pET 21 b. Este amplicon deu origem a um enzima com massa molecular teórica de 71780.55

daltons, sendo que antes a enzima completa com peptídeo sinal que teria uma massa molecular teórica de 73578,82 daltons (levando em consideração apenas a sequência de aminoácidos). Para fazer o cálculo de massa teórica foi usado o programa compute pl/Mw (http://br.expasy.org/tools/pi_tool.html) .

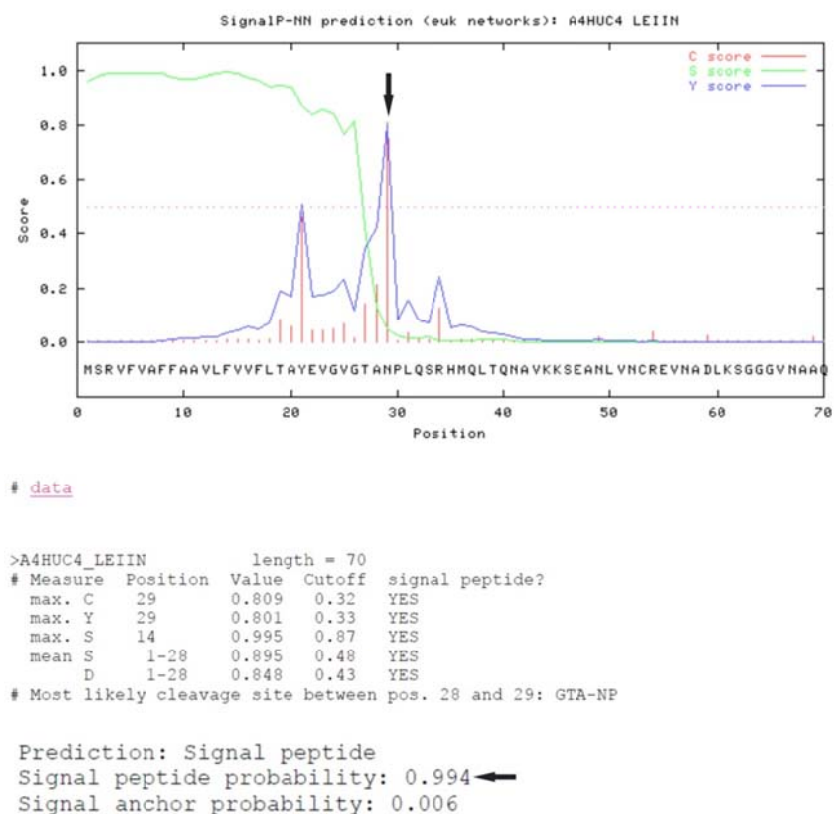


Figura 10: Análise do resultado gerado pelo signalP da L. i NTPDase-1. Nesta figura é possível verificar o sitio mais provável de clivagem e a probabilidade de se ter o peptídeo sinal (seta preta).

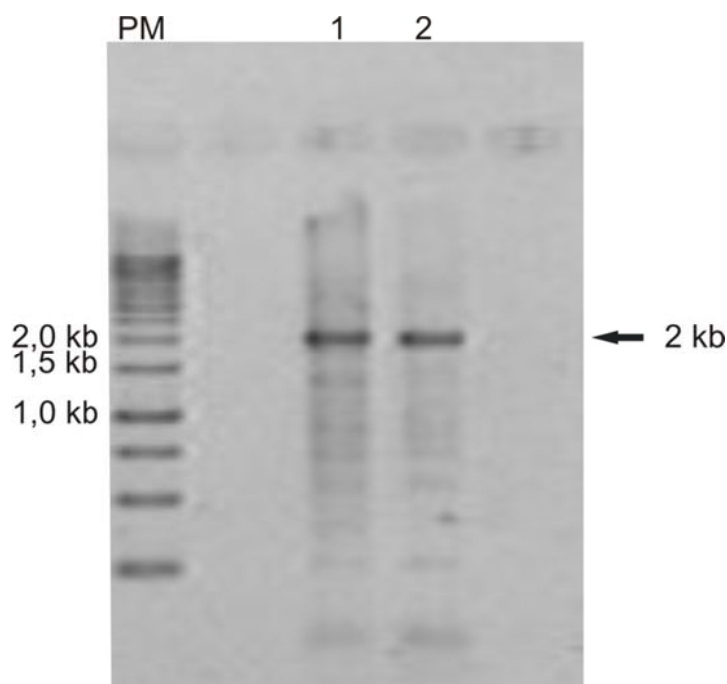


Figura 11: Amplificação da região codificante da porção solúvel da NTPDase-1 de *L. infantum chagasi* (canaletas 1 e 2). Gel de agarose 1% corado com Brometo de. Foi usado como marcador de massa molecular(PM) oGeneRuler 1Kb DNA Ladder. Foram aplicados 10 μ L do produto das reações de PCR. A seta preta marca a posição da banda de interesse.

Para confirmar a clonagem em vetor pET 21 b foi feita PCR (figura 12 A) de DNA plasmidial extraído de *E. coli* que poderia conter a transformação. Para isso foram usados os mesmo iniciadores da sub-clonagem. Com este mesmo material foi feito um ensaio de restrição, usando as mesma enzimas da clonagem. Estes resultados foram analisados em gel de agarose 1 % e foi possível verificar uma banda na altura esperada tanto para o vetor quanto para o gene (figura 12 A). Para garantir que a construção pET21-b/NTPDase-1 estava correta, uma alíquota da amostra foi enviada para a empresa Macrogem para que fosse feito o sequenciamento usando iniciadores que flanqueiam a região da clonagem do vetor .Com a sequência consenso resultante do sequenciamento foi feito um BlastN que encontrou o gene da GDPase de *L. infantum* cepa JPM5, dando uma similaridade de 99%, confirmando que o gene clonado era mesmo a NTPDase-1 de *L. infantum chagasi* e que o mesmo se encontra “in frame” de leitura correto (figura 12 B).

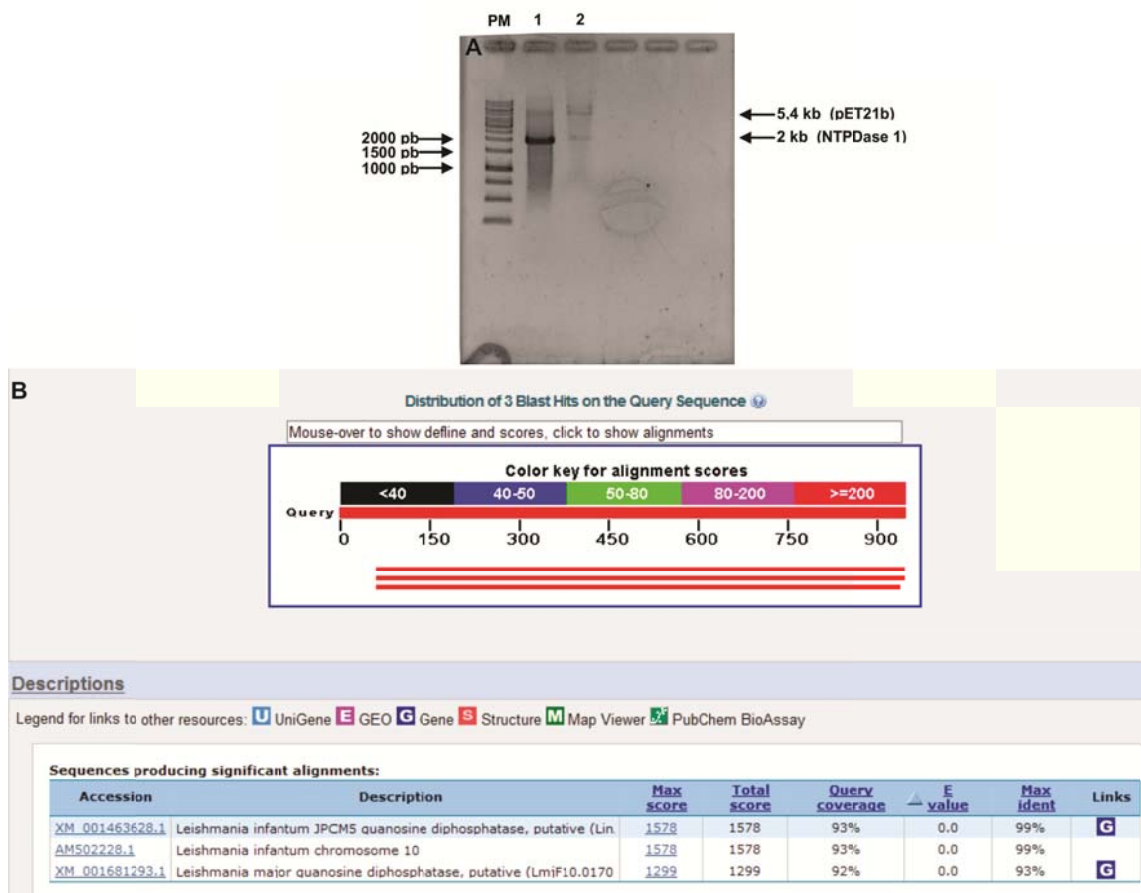


Figura 12: Confirmação da sub-clonagem em pET 21b da NTPDase-1 de *L. infantum chagasi*. A) Confirmação da sub-clonagem em pET 21b da NTPDase-1 de *L. infantum chagasi* por PCR e restrição enzimática com as enzimas NdeI e XhoI canaletas 1 e 2 respectivamente. Gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio e visualizado sob luz UV. O marcador de massa molecular (PM) usado foi GeneRuler 1Kb DNA Ladder. Foram aplicados 10 µL da reação de PCR e da digestão. B) Confirmação da sub-clonagem em pET21b da NTPDase-1 de *L. infantum chagasi*. A figura mostra o BLASTN entre a sequência teste de NTPDase-1 (cepa M2682) comparada com a sequência de nucleotídeos do banco de dados (cepa JPCM5) de forma gráfica, com e-value e o alinhamento com sequências mais similares

Após a confirmação da clonagem foram iniciados os testes de expressão e assim verificada a viabilidade de expressão desta enzima em sistema bacteriano. O primeiro teste feito foi o de tempo de indução. Neste teste foi feita indução da expressão da NTPDase-1 em tempos crescentes para isso foi usado *E. coli* BL21 codon-plus RIL, sendo adicionado 0,5 mM do indutor IPTG o tempo zero foi estabelecido como o momento antes da adição do indutor e após a adição foram retiradas amostras no intervalo de 1-4 horas de indução. Em uma primeira análise feita em SDS-PAGE 10% com 20 µg do extrato total da *E. coli* lisada (figura 13) foi possível verificar uma banda de proteína com concentração visual crescente

conforme o tempo de indução, tendo uma concentração maior no tempo de 2 horas. Nos tempos de 3 e 4 horas verificou-se uma perda na intensidade da banda de proteína o que indica que ocorreu uma degradação destas amostras de forma geral, já que as outras bandas também apresentam um decréscimo na concentração. Por ser o primeiro teste de expressão usamos como controle a recombinante T. c NTPDase-1 de *T. cruzi* purificada (Santos *et al.*, 2009), isso porque esta proteína possui uma massa molecular próxima da massa da L. i NTPDase-1. Como pode ser observado a banda do extrato de *E. coli* aqui discutida possui uma altura bem próxima da banda da enzima de *T. cruzi* (figura 13).

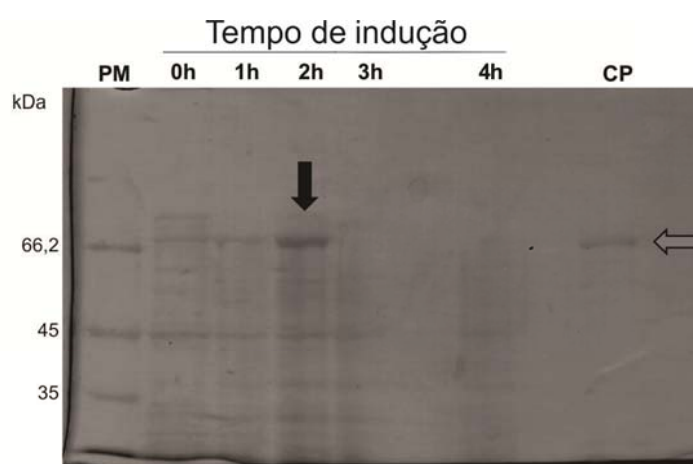


Figura 13: Verificação do melhor tempo de expressão da NTPDase-1 de *L. infantum chagasi*. A análise foi feita em SDS-PAGE 10%. Tempo zero de indução (0h), 1 hora (1h), 2 horas (seta preta), 3 horas (3h), tempo de 4 horas (4h) e controle positivo (seta cinza) feito com NTPDase-1 de *T. cruzi*. O marcador de massa molecular (PM) usado neste experimento foi o Unstained Protein Ladder Fermentas SM0431. O gel foi corado por Comassie Blue.

Apesar do forte indício que a proteína estava sendo induzida e que no tempo de 2 horas era o momento em que a NTPDase-1 apresentava sua maior concentração, era preciso ainda uma confirmação mais convincente, pois somente a massa molecular aparente não identifica a proteína de interesse em um extrato proteico total. Então para determinar com certeza que a expressão estava ocorrendo foi feito um “western blotting” usando como anticorpo primário um anticorpo monoclonal anti-His (Sigma). Este anticorpo reconhece proteínas com cauda de histidina e como o vetor pET 21b fusiona uma cauda de histidina na porção C-terminal da proteína recombinante foi possível verificar no western (figura 14 B) uma banda marcada com o tamanho esperado. Neste experimento não foi usado extrato total de *E. coli* e sim um extrato parcial onde as células foram lisadas

por sonicação e posteriormente centrifugadas (segundo o protocolo de lise usado para purificação). Então foi determinada a concentração de proteína do precipitado e aplicados 25,8 µg de proteína. Conforme pode ser observado no gel de poliacrilamida 10% (figura 14 A) existe uma banda de aproximadamente 70 kDa que tem sua concentração aumentada conforme passa o tempo de expressão. Quando analisamos as bandas de massa menor, é possível verificar que a concentração aplicada no gel é aproximadamente a mesma em cada poço, já que é possível verificar que as bandas possuem a mesma espessura. Com o resultado pode se concluir que a NTPDase-1 é bem expressa em todos os tempos de 1-4 horas, mas a maior concentração de recombinante está presente na expressão por duas horas.

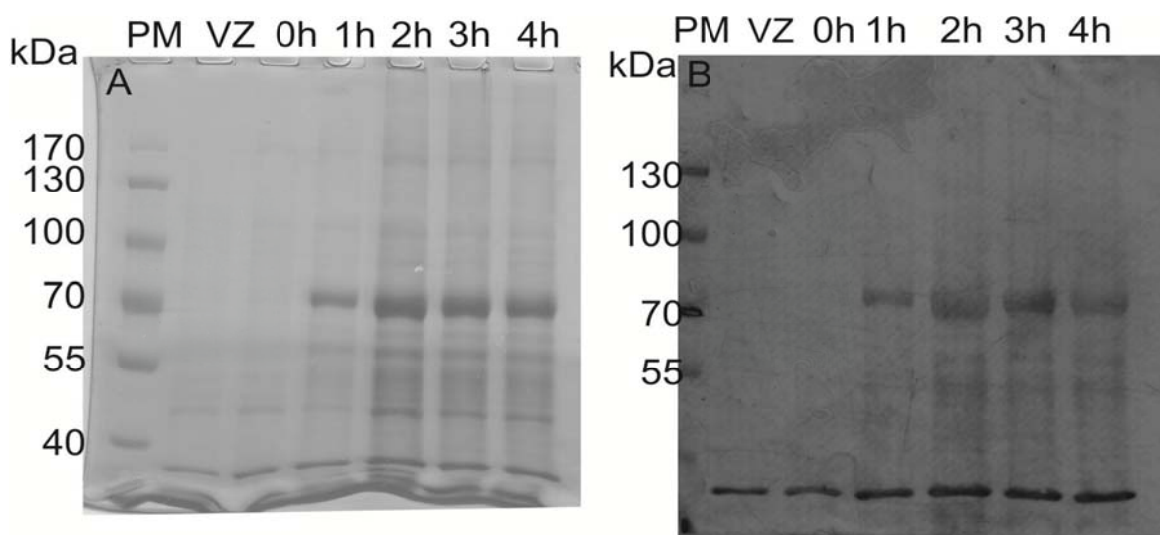


Figura 14: Confirmação do tempo de expressão da NTPDase-1 de *L. infantum chagasi*. A) SDS-PAGE 10%. Foi aplicado extrato parcial de *E. coli* transformada com vetor vazio induzido por 1 hora (VZ), tempo zero de indução da *L. i* NTPDase-1 (0h), tempo de 1 hora (1h), tempo de 2 horas (2h), tempo de 3 horas (3h), tempo de 4 horas (4h) . O marcador de massa molecular (PM) usado neste experimento foi o Prestained Protein Ladder Fermentas SM0671. O gel foi corado por Comassie Blue. B) Western blotting feito a partir do blotting feito com replicata do gel ao lado. Para reconhecer a proteína recombinante foi usado anti-His monoclonal (Sigma) na diluição 1:1000 e como anticorpo secundário o anti-IgG de camundongo (Sigma) conjugado com peroxidase (1:20000). O western foi revelado com o substrato descrito no item material e métodos.

O próximo passo foi avaliar se a proteína expressa estava presente na fração insolúvel e ou na fração solúvel do extrato de *E. coli*. Os corpos de inclusão são agregados de proteínas que são formados em ensaio de super expressão em bactérias, o que faz com que as proteínas recombinantes fiquem na fração insolúvel do extrato e para uma posterior purificação, este precipitado precisa ser solubilizado

com tampão com altas concentrações de uréia (8M) ou cloreto de guanidina (6M). Esta solubilização desencadeia desnaturação parcial ou total da proteína recombinante que depois precisa passar por um processo de re-enovelamento para que se possa obter uma enzima ativa. Muitos trabalhos com enzimas desta família expressa em bactéria obtiveram as proteínas recombinantes ativas a partir dos corpos de inclusão (Ivanenkov *et al.*, 2003; Murphy-Piedmonte *et al.*, 2005; Zebisch e Strater, 2007), mas caso a proteína recombinante seja encontrada na fração solúvel, pode-se eliminar as etapas de solubilização e renaturação, o que pode gerar uma proteína recombinante purificada com maior atividade e também resultados de atividade mais consistentes, além de diminuir o trabalho e o custo experimental.

Baseando no resultado apresentado na figura 14, já é possível determinar que a proteína está presente nos corpos de inclusão (já que o “western” foi feito com precipitado do lisado de *E. coli*), mas para determinar se a proteína recombinante estava presente na fração solúvel foi feito um “western blotting” (figura 15 C) com as duas frações e como anticorpo primário foi usado o anticorpo monoclonal anti-His (seguindo o mesmo protocolo anterior). Foram aplicados 18 µg da fração solúvel, aproximadamente 1µg das lavagens feitas com tampão contendo 2 M de uréia e 4,8 µg dos corpos de inclusão. Os valores de concentração de proteína não são os mesmos porque neste experimento foi aplicado o volume máximo de cada amostra que o gel suportava para tentar detectar a L. i NTPDase-1. Com este “western” foi possível concluir que, nas condições usadas para expressão, a proteína recombinante está presente quase que exclusivamente nos corpos de inclusão. Dessa maneira, não é possível ter certeza absoluta, porque a fração solúvel pode conter concentrações baixas da recombinante que estão além do limite de detecção da técnica.

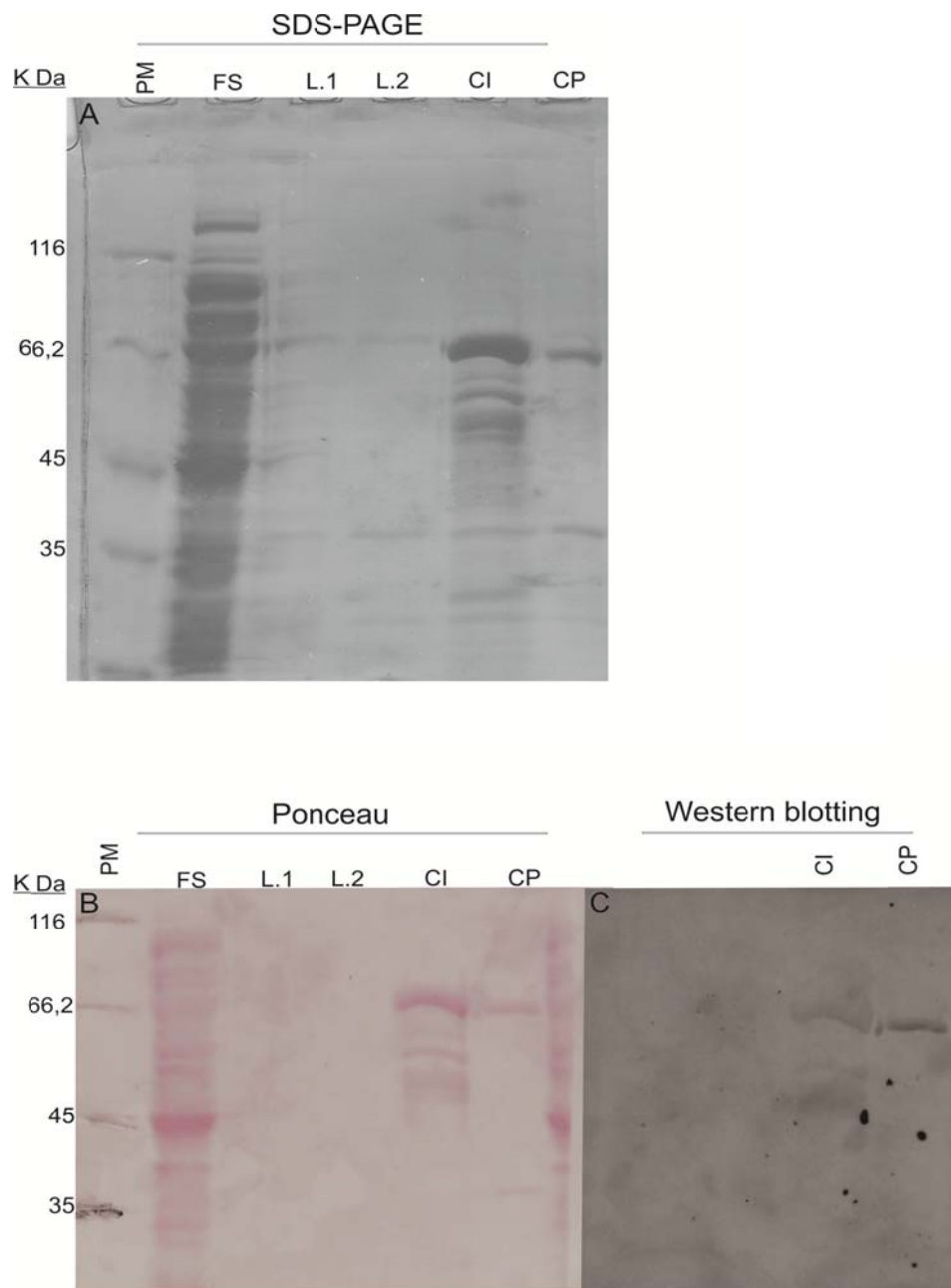


Figura 15: Determinação da solubilidade da NTPDase-1 de *L. infantum chagasi* recombinante. A) SDS-PAGE 10%. Foi aplicado fração solúvel do extrato de *E. coli* induzido por 2 horas (FS), sobrenadante da primeira e segunda lavagem dos corpos de inclusão com tampão contendo 2 M de uréia (L.1 e L.2), corpos de inclusão contendo a L. i NTPDase-1 (CI), controle positivo T. c NTPDase-1 (CP). O marcador de massa molecular (PM) usado neste experimento foi o Prestained Protein Ladder Fermentas SM0431. O gel foi corado por Comassie Blue. B) Membrana de nitrocelulose após o blotting, corada com ponceau S. C) Western blotting feito a partir do gel acima. Para reconhecer a proteína recombinante foi usado o anti-His monoclonal (Sigma) na diluição 1:6000 e como anticorpo secundário foi usado o anti-IgG de camundongo conjugado com FitC (1:8000). O resultado foi observado em foto documentador de fluorescência FLA 5100 (Fujifilm®).

Determinado o tempo de indução que apresenta maior concentração da proteína recombinante e em qual fração esta enzima se encontra, passamos para o próximo passo que seria a purificação da enzima recombinante. Com intuito de obter boa quantidade de recombinante pura foram feitas induções em volumes maiores para obtenção da quantidade suficiente dos corpos de inclusão para purificação em cromatografia líquida.

Como citado anteriormente, o vetor pET 21b fusiona uma cauda de 6 histidinas na porção C-terminal da proteína recombinante. Esta cauda de histidina permite uma purificação por afinidade e para isso foi usada uma coluna com resina Ni Sepharose. As purificações usadas para os testes seguintes foram feitas então em coluna de afinidade (Histrap FF crude 1mL) fabricada pela GE Healthcare. Estas colunas foram acopladas ao sistema de "Fast protein liquid chromatography" (FPLC) Akta purifier (GE), e foram feitos alguns testes de purificação. Em resumo, para estes testes foram usados dois tampões: um com 5 mM de imidazol, que foi acoplado à bomba "A" do sistema e outro contendo 250 mM de imidazol acoplado a bomba "B" do sistema. As amostras previamente preparadas (o que inclui renaturação por diluição da concentração de uréia usada na solubilização de 8 M para 2M) foram aplicadas em um looping que suporta o volume de 10 mL. No primeiro teste foi feita uma eluição em gradiente crescente de B. Neste experimento não foi obtida uma grande concentração de proteína, mas permitiu determinar a região onde a proteína recombinante começa a ser eluída. Então foi feita a adaptação para a purificação ocorrer em 3 passos (figura 16 A), no primeiro a amostra foi injetada, no segundo a coluna é lavada com uma concentração de imidazol de 25mM (10% de tampão B) e no terceiro a amostra foi eluída com 250 mM de imidazol, sendo coletadas frações de 1,2 mL de cada amostra. O resultado desta purificação foi usado para análise em SDS-PAGE verificando o resultado da purificação (figura 16 B).

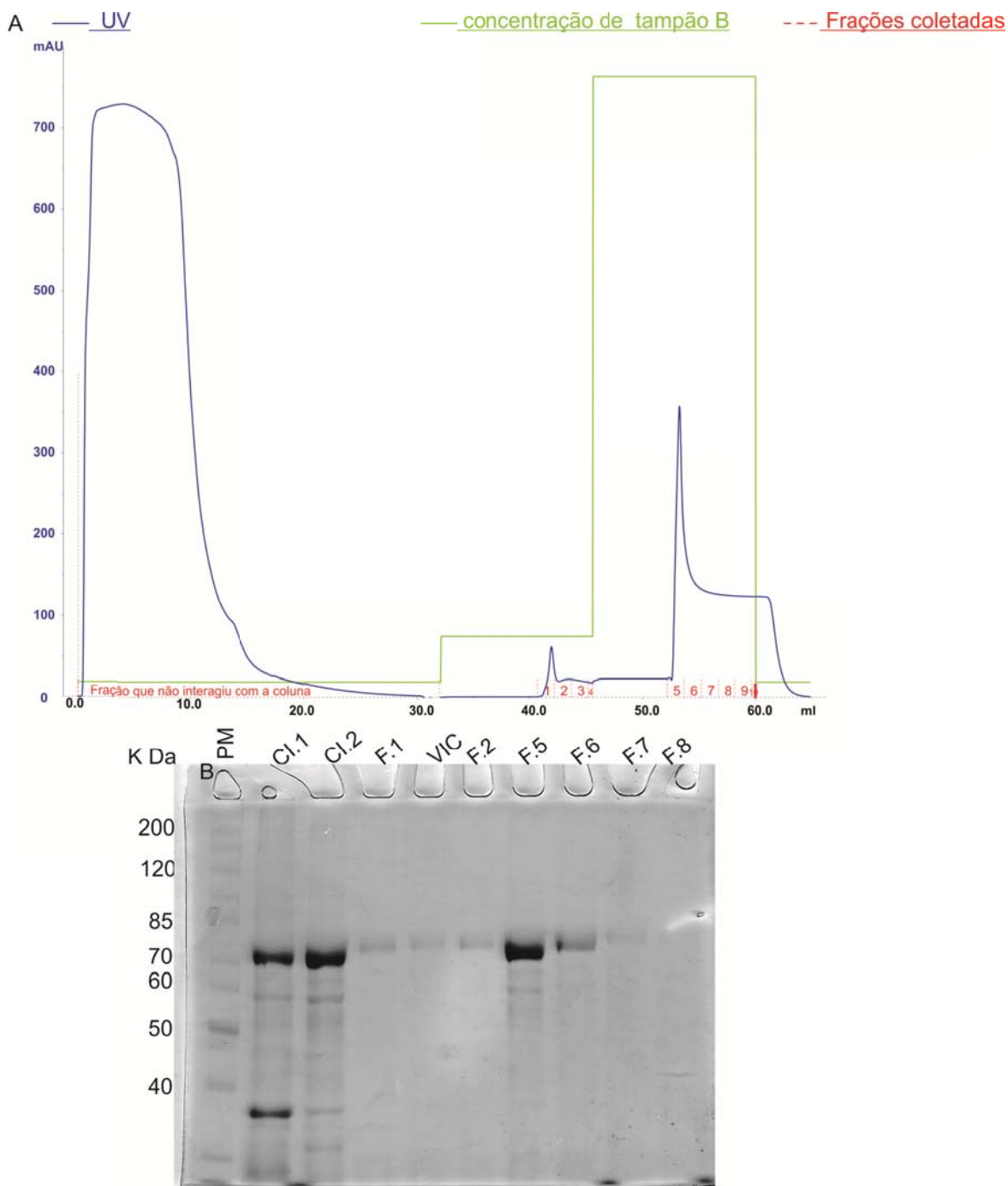


Figura 16: Purificação da *L. i* NTPDase-1 recombinante. A) Cromatograma contendo dados de absorção em UV 280 nm (linha azul) e concentração do tampão B com 250 mM de imidazol (linha verde). B) SDS-PAGE 10%. Foi aplicada amostras dos corpos de inclusão antes das lavagens com tampão com 2 M de uréia (CI.1), os corpos de inclusão após todas as etapas de clareamento, esta é a amostra antes de passar na coluna (CI.2); primeira fração coletada (F.1), fração que não interagiu com a coluna (VIC), segunda fração coletada (F.2), a quinta fração coletada (F.5), a sexta fração coletada (F.6), a sétima fração coletada (F.7) e a oitava fração coletada (F.8). O gel foi corado por Comassie Blue. O marcador de massa molecular (PM) usado neste experimento foi o Prestained Protein Ladder Fermentas SM0661.

Como pode ser verificado no gel e no cromatograma, existe uma perda considerável de proteína que não interage com a coluna. Outro fato é que ocorreu uma perda considerável de proteína no processo de lavagem da coluna com tampão

com 25 mM de imidazol, no entanto a proteína eluída fração 6 apresentou poucos contaminantes. Não foi possível diminuir a concentração de imidazol na lavagem. Testou-se o aumento para 30 mM, a fim de aumentar a pureza o que diminuiu a concentração da proteína, mas resultou em uma amostra muito mais pura. Análise feita com base no resultado gerado por eletroforese capilar feita no Bioanalyzer (Agilent Technologies) demonstra que o rendimento da purificação é por volta de $1,88 \pm 0,9$ % (tabela 5) de toda L. i NTPDase-1 contida na amostra aplicada no FPLC, sendo este rendimento muito baixo. Este dado é bem evidente, já que na figura 16 B é possível observar uma banda com a massa aproximada de 70 kDa na amostra correspondente ao volume que não interagiu com a coluna, levando em consideração que o volume aplicado no gel é em geral de 30 μ L e que esta amostra tem um volume total de 40 mL. Pode-se concluir que o dado gerado pelo Bioanalyzer está correto.

Para melhorar este rendimento seria preciso testar alterações no protocolo de indução, como por exemplo fazer uma indução em temperatura mais baixa, assim conseguindo proteína solúvel ou mesmo fazer mudanças nos tampões usados na purificação, como adição de uréia nos tampões usados no FPLC. No entanto, mesmo tendo um baixo rendimento na purificação, foi possível obter uma proteína muito pura e ativa.

Tabela 5: Rendimento da purificação da L. i NTPDase-1

Amostras	Concentração L. i NTPDases ng/ul	Concentração total de proteína em ng	% da L. i NTPDase-1 purificada	% média / Desv. P
Corpos de Inclusão amostra 1	207,4	2488800	0,851816	1,88 \pm 0,902
L. i NTPDase-1 purificação1	5,3	21200		
Corpos de Inclusão amostra 2	152,7	1832400	2,532198	
L. i NTPDase-1 purificação 2	11,6	46400		
Corpos de Inclusão amostra 3	128,2	1538400	2,26209	
L. i NTPDase-1 purificação 3	8,7	34800		

Com a obtenção da L. i NTPDase-1 recombinante pura, antes dos ensaios enzimáticos, a recombinante foi usada pra imunizar uma coelha de aproximadamente 3 meses, para assim obter o soro que contém anticorpos anti-L.i NTPDase-1. Após as imunizações foi feita a titulação do soro imune por “Dot-Elisa” (figura 17 A). Este teste foi feito em duplicada para o soro pré-imune e para o controle positivo (anti-T. c NTPDase-1) e em quadruplicata para o soro imune. Como antígeno foi usado 0,5 µg de recombinante purificada. As diluições variaram de 1:50-1:102400, sendo feita diluição seriada dos soros.

O soro pré-imune mostrou reconhecimento inespecífico bem definido até a diluição 1: 400 e o soro imune apresentou reconhecimento com intensidade semelhante do soro pré-imune a diluição 1:51200, sendo esta diluição o título do anti-L. i NTPDase-1. Observou-se também que o soro anti-T. c NTPDase-1 usado como controle positivo reconheceu a L. i NTPDase-1 na diluição 1:3200 o que indica que é possível o reconhecimento específico com estes soros usando-se diluições específicas para tal.

Para confirmar se o soro anti-L.i NTPDase-1 reconheceria a enzima em extrato de *Leishmania* foi feito um “western blotting” com extrato de *L. braziliensis* e *L. infantum chagasi*. Neste “western” ocorreram marcações correspondente a NTPDase-1 e 2, mas a marcação ficou muito fraca e impossibilitou a digitalização deste dado. Este teste foi repetido, mas não foi obtido um bom extrato (figura 17 B) que permitisse comprovar o primeiro resultado. No entanto, é muito improvável que a marcação do primeiro teste tenha sido inespecífica, já que nos extratos degradados não ocorreu nenhuma sombra de marcação (figura 17 C). No “western blotting” (figura 17 C), é possível observar que o anti-L. i NTPDase-1 (1:30000) apresenta um bom reconhecimento da proteína purificada, o que reforça o resultado da titulação (figura 17 A).

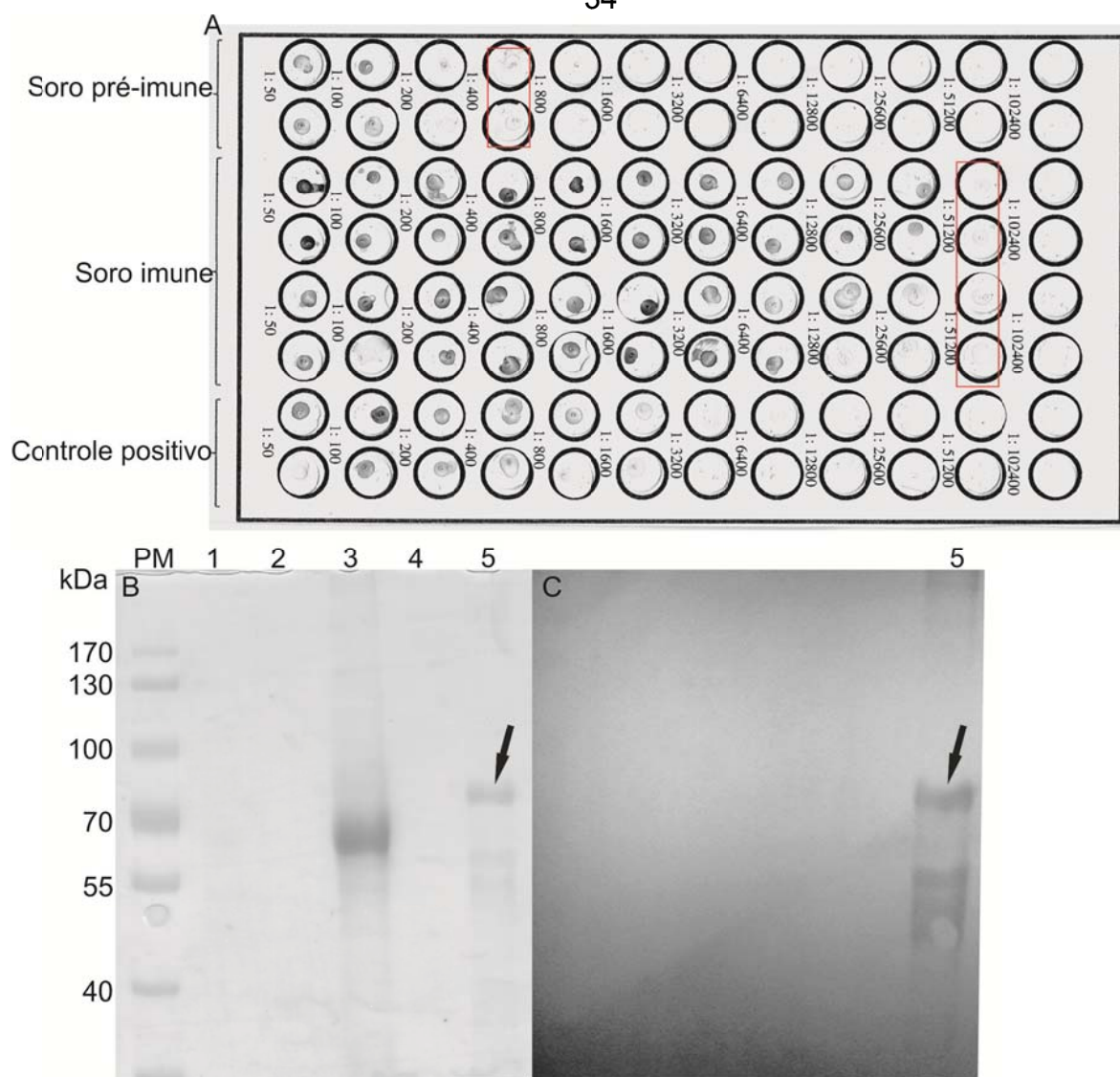


Figura 17: Titulação do soro policlonal anti-L.i NTPDase-1 e reconhecimento da proteína recombinante purificada A) Teste de titulação do anti-L.i NTPDase-1 feito por “Dot-Elisa”, os discos foram sensibilizados com 0,5 µg de recombinante purificada, foi feita diluição seriada do anti-L.i NTPDase-1, como secundário foi usado o anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição 1:2000, a revelação do “Dot-Elisa” seguiu os mesmos procedimentos usados no “western blotting” B) SDS-PAGE 10%. Na canaleta 1 foi aplicado extrato *L. braziliensis* (11 µg); canaleta 3, extrato de *L. infantum chagasi* (11 µg); canaleta 5, 0,5 µg de L. i NTPDase-1 recombinante purificada (seta preta). O gel foi corado por “Comassie Blue”. O marcador de massa molecular (PM) usado neste experimento foi o Prestained Protein Ladder Fermentas SM0661. C) “Western blotting” feito a partir do blotting da duplicata do gel ao lado. Para marcar a recombinante foi usado o anti-L. i NTPDase-1 policlonal (1:30000) e como anticorpo secundário foi usado o anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:10000), o “western” foi revelado com o substrato descrito no material e métodos. A seta preta indica o reconhecimento da L. i NTPDase-1 recombinante.

As amostras de L. i NTPDase-1 recombinante também foram usadas em diversos ensaios enzimáticos. Neste trabalho irei apresentar apenas os teste de preferência de

substrato e o ensaio de pH de atividade máxima. Mesmo sendo apenas dois dados (substrato e pH) não quer dizer que foram poucos experimentos, para chegar nos resultados finais que serão apresentados foram feitos mais de 16 experimentos, sendo que mais da metade dos experimentos foram feitos nos ensaios de pH. Este grande número de experimentos se deve ao fato de que em alguns experimentos as grandezas dos resultados variam muito e isso contribui para que os experimentos tenham um desvio padrão elevado, mas é importante ressaltar que o perfil dos resultados são sempre semelhantes quando a enzima está ativa.

Em muitos ensaios as enzimas purificadas não apresentaram atividade o que sugere que está ocorrendo um problema no re-enovelamento destas enzimas. A possibilidade de formação de oligômeros que interferisse na atividade da enzima foi descartada, pois em dois ensaios de atividade para GTP com ou sem adição de DTT (5 e 10 mM foram testadas as duas concentrações de DTT, e em nenhuma delas foi verificado alteração na atividade enzimática) (figura 18). Se estivesse ocorrendo formação de oligômeros era esperado que na presença de DTT ocorresse uma alteração na atividade enzimática, devido à disponibilização de mais monômeros ativos, como mostrado por Raphael de Souza Vasconcelos para a NTPDase-2 de *L. Infantum chagasi* (Os dados apresentados sobre a L. i NTPDase-2 foram retirados da dissertação de mestrado do Raphael S. Vasconcellos, defendida em 2010).

Desta forma, é possível sugerir que a enzima purificada esteja em monômeros e outra possibilidade interessante é que a atividade enzimática não é dependente de nenhuma ponte dissulfeto acessível ao DTT na proteína purificada. Este experimento reforça a idéia de que os problemas nos ensaios enzimáticos são consequência de problemas no re-enovelamento.

Em diversos trabalhos com enzimas desta família expressa em sistema bacteriano são encontradas nos corpos de inclusão e precisam ser parcialmente desnaturadas para a solubilização destes corpos de inclusão e para obter um re-enovelamento mais eficiente, diferentes trabalhos apresentam diferentes soluções (Ivanenkov *et al.*, 2003; Murphy-Piedmonte *et al.*, 2005; Zebisch e Strater, 2007). Recentemente nosso grupo adquiriu dois reagentes (glutathiona reduzida e glutathiona oxidada) para tentar reproduzir o método usado por (Ivanenkov *et al.*, 2003) em seu estudo com a NTPDase-6 de humano e este mesmo método foi usado por (Murphy-Piedmonte *et al.*, 2005) para o estudo com a NTPDase-5 de humano o que sugere uma eficiência neste sentido. É esperado que fazendo um re-enovelamento mais

controlado seja possível obter uma enzima com um padrão de atividade mais constante. Outra forma de melhorar esta atividade enzimática já foi comentada anteriormente que seria uma expressão em temperaturas mais baixas, o que possibilitaria a purificação da enzima na fração solúvel, assim evitando os passos de desnaturação e re-enovelamento.

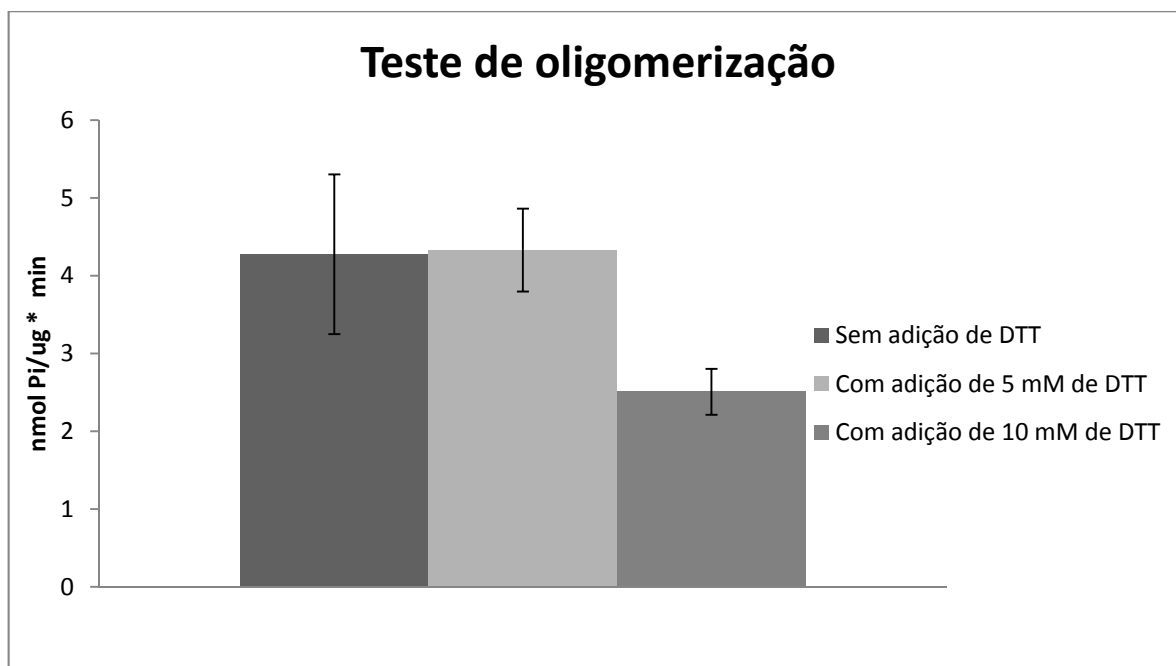


Figura 18: Teste de influência do agente redutor DTT na atividade nucleotidásica da NTPDase-1 purificada. Ensaio enzimático na presença e ausência de DTT (5 e 10 mM), este gráfico contém o resultado de 2 experimentos onde foi feita a reação de atividade na presença 1,5 mM de GTP, o tampão de atividade está descrito em materiais e métodos. As barras de erros representam os valores de erro padrão dos experimentos.

Para determinar a preferência por substrato foram feitos vários experimentos na presença de ATP, ADP, AMP, GTP, GDP, UTP e UDP e em todos os experimentos a enzima apresentou atividade apenas para GTP (tabela 6). Porém não podemos descartar a possibilidade de que em outras condições esta enzima apresente atividade para outros nucleotídeos.

A especificidade por GTP demonstra um dado novo e diferente para enzimas desta família, pois até o momento não existe nenhuma publicação que apresente uma E-NTPDase tão específica. Outro grande entrave sobre esta especificidade é o fato de não ter na literatura nada sobre a participação do GTP como molécula sinalizadora extracelular, já que nas predições foi sugerida a possibilidade desta

enzima ser secretada na forma solúvel, ou seja, esta enzima estaria hidrolisando GTP extracelular.

O que têm sido demonstrado na literatura para enzimas desta família que possuem preferência por nucleotídeos de guanina é a sua participação em mecanismos de glicosilação de proteínas em leveduras (Abeijon *et al.*, 1993; Berninsone *et al.*, 1995; Gao *et al.*, 1999). Estas enzimas de levedura estão presentes no complexo de golgi e ainda não foi determinado a localização exata da L.i NTPDase-1 no parasito: as análises de bioinformática sugerem que esta enzima seja secretada na forma solúvel. Outra grande diferença é que as enzimas de levedura apresentam atividade para outros nucleotídeos, o que não ocorre neste caso, e a participação principal das enzimas de levedura no mecanismo de glicosilação se deve ao fato delas hidrolisarem GDP a GMP e o GMP ser necessário para o mecanismo de captação de açúcar do citosol, de onde sai GMP e entra GDP-manose. Caso não ocorra a hidrólise do GDP, a via de glicosilação é obstruída por falta de açúcar e também pelo fato do GDP ser um inibidor das enzimas da via de glicosilação (Berninsone *et al.*, 1994). Este fato sugere que, possivelmente, a L.i NTPDase-1 não participa da via de glicosilação, já que ela hidrolisa somente GTP.

Tabela 6: Teste de preferência de substrato, ensaios feitos com 1,5 mM de substrato

Substrato	nmol Pi/ug *min	Nº de experimentos realizados
ATP	0	6
ADP	0	6
AMP	0	6
GTP	4,62 ± 0,64	3
GDP	0	6
UTP	0	6
UDP	0	6

* Cada dado experimental se refere a média de dados obtidos em triplicata para uma purificação independente da outra, sendo então cada experimento o resultado desta análise.

Após a determinação da preferência de substrato foi feito o ensaio de pH (figura 19) para determinar em qual faixa de pH a L.i NTPDase-1 apresenta a maior

atividade. O resultado deste experimento revelou que esta enzima apresenta uma tendência de atividade máxima em pH ácido de 5,5-6,0. Com base neste resultado pode-se especular onde esta enzima está agindo, além dos possíveis mecanismos tradicionalmente discutidos, mesmo sem saber qual a possível importância do GTP.

Atividade em diferentes faixas de pH

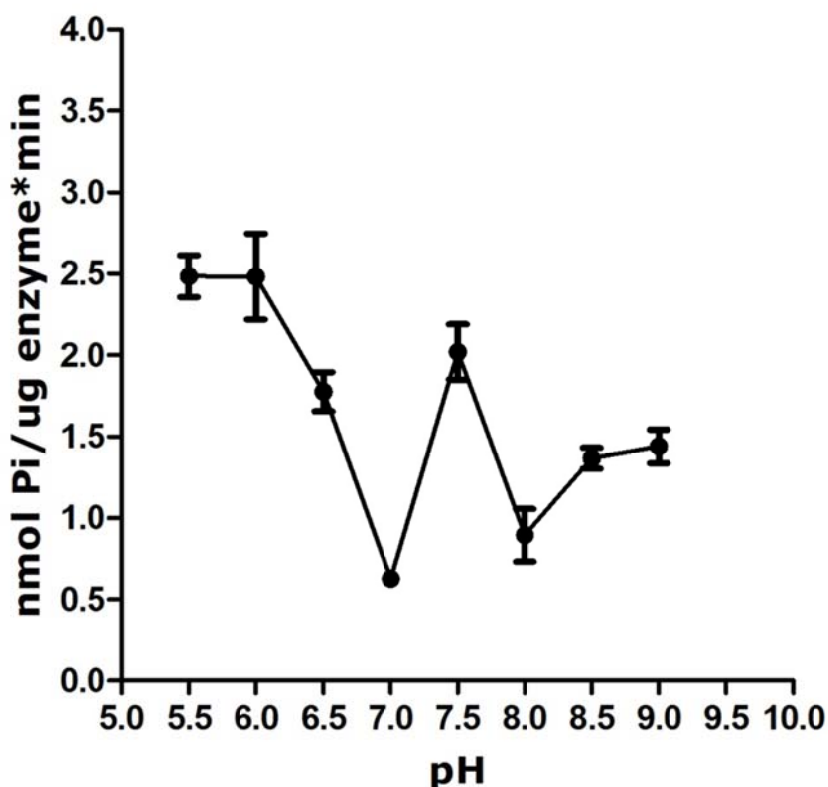


Figura 19: Avaliação da atividade de hidrólise de GTP em diferentes faixas de pH. Ensaio enzimático em diferentes faixas de pH, este teste foi feito com 1,5 mM de GTP e o pontos de variação do pH foram de 0,5, variando de 5,5-9,0. As barras de erros representam os valores de erro padrão dos experimentos.

Em trabalho com *Lutzomyia longipalpis* demonstrou que o pH da parte abdominal do sistema digestivo deste flebotômio varia conforme passa o tempo após o repasto sanguíneo, sendo que o pH é alcalino logo após a alimentação e vai caindo com o passar do tempo, enquanto que o pH da parte torácica se mantém constante na faixa 5,5-6 (Santos *et al.*, 2008). Conforme hipótese de (Gontijo *et al.*, 1998), após o repasto sanguíneo o pH da parte abdominal do sistema digestivo do flebotômio é alcalino e ao mesmo tempo esta porção do sistema digestivo está

repleta de nutrientes. Para *Leishmania* este ambiente seria ideal para proliferação. Com o passar do tempo os nutrientes contidos no sangue ingerido são digeridos e, ao mesmo tempo, o pH do sistema digestivo vai diminuindo. A falta de nutrientes e a acidificação do ambiente favorecem a metaciclogênese. Por consequência, as *Leishmania* passam de formas promastigotas procíclicas para metacíclicas. Desta forma, existe uma dependência de acidificação do ambiente para que os parasitos passem de formas procíclicas para metacíclicas e este processo de acidificação ocorre naturalmente em flebotomínios. Podemos então supor que a L. i NTPDase-1 pode ter sua expressão aumentada neste período e que esta enzima pode estar ativa e participar do mecanismo de metaciclogênese, já que ela apresenta uma atividade maior em pH ácido (que corresponde ao momento em que ocorre uma redução da disponibilidade de nutrientes no sistema digestivo do flebotomínio). Outro fato que favorece esta especulação é que GTPases de outras famílias de enzima influenciam na proliferação e modificação celular, como as rho GTPases (Guo *et al.*, 2009; Smits *et al.*, 2010) que são importantes no desenvolvimento de células de camundongos. No entanto as enzimas da família rho são enzimas intracelulares, o que ainda precisa ser analisado para a L. i NTPDase-1.

Outra possibilidade de ação da L.i NTPDase poderia ser no interior do vacúolo parasitóforo, que também pode apresentar um pH ácido no seu interior. Pode ser que esta enzima seja secretada neste ambiente e desencadeie algum tipo de resposta. Uma possibilidade seria a ação desta enzima sobre as p47 GTPases. Esta família de proteínas está associada à eliminação de patógenos intracelulares mediando uma ruptura do vacúolo parasitóforo (Taylor *et al.*, 2004; Khaminets *et al.*, 2011). Para que ocorra a ação destas GTPases relacionadas com imunidade (IRG) a célula precisa ser ativada por interferon gama e estas proteínas precisam se ligar a GTP (ponto onde a NTPDase-1 poderiam estar agindo). A ação destas p47 tem sido demonstrada para camundongos no controle de infecção causada por *Toxoplasma gondii* (Steinfeldt *et al.*, 2011) e este mecanismo ainda não demonstrado para humanos. No entanto os cães possuem genes de p47 e este genes parecem apresentar uma expressão induzida por interferon o que sugere que este mecanismo pode ser ativo em cães (Bekpen *et al.*, 2005).

Para comprovar uma ou outra hipótese acima são necessários diversos experimentos inclusive “Knockout” ou super-expressão do gene da L.i NTPDase-1 e verificação se os parasitos apresentariam alterações em alguma destas

situações. Outra possibilidade é aprofundar no estudo bioquímico fazendo uma busca de inibidores específicos para esta enzima e avaliar o efeito biológico da inibição desta enzima, ou mesmo o uso de anticorpos específicos.

Tendo em mãos todos os resultados até aqui apresentados a enzima possivelmente sendo secretada, possuindo atividade elevada em pH ácido e especificidade por GTP, e sabendo que a acidificação do ambiente possui uma implicação direta na metaciclobose, seria interessante se fazer uma super expressão da L.iNTPDase-1 em *Leishmania* para poder verificar as alterações desencadeadas por esta enzima. Como este é um experimento mais complexo, resolvemos montar um experimento para tentar obter indícios de que a primeira hipótese possa ou não ser viável.

A idéia do experimento foi crescer *Leishmania* em meio de grace (segundo o protocolo de cultivo padrão) e após um período do início da cultura, os parasitos receberiam tratamento com adição de uma concentração fixa de L. i NTPDase-1 recombinante. Inicialmente a idéia seria usar *L. infantum chagasi* para este experimento, já que o gene foi isolado desta espécie, mas optamos por usar *L. braziliensis*, porque o seu cultivo já estava melhor estabelecido no laboratório. O tratamento, foi decidido que o tratamento seria feito após 48 horas do início do cultivo. Foi feito, um controle do experimento sem tratamento e outro com adição do mesmo tampão (tampão de atividade enzimática) usado para armazenar a enzima; o terceiro tratamento foi a adição apenas da enzima; o quarto tratamento foi adicionar enzima mais GTP; o quinto tratamento foi feito com a adição apenas do GTP e o sexto tratamento aumentando a quantidade da enzima usada no terceiro e quarto tratamento, mantendo a concentração de GTP usada nos quarto e quinto tratamento. Como não existe nada na literatura que poderia auxiliar na decisão de quais concentrações usar em cada tratamento, foi decidido usar uma concentração de enzima próxima à que era usada nos ensaio enzimáticos (foi usada aproximadamente a metade no poço com menor concentração e no poço com maior concentração teria o dobro de enzima usada nos experimento de atividade). Para determinar a concentração de enzima, leva-se em consideração o volume de amostra mais tampão que seria adicionado nos poços, já que se fosse adicionado um volume muito grande de enzima poderia ocorrer alterações no meio de cultura. O volume de tampão (controle) usado em cada experimento foi o mesmo volume usado no tratamento com a enzima. Desta forma, o experimento

seguiu o seguinte procedimento: o cultivo foi iniciado com 1×10^5 *Leishmanias*/mL. 48 horas após o início do cultivo, cada poço da placa recebeu um tratamento e 48 horas após o tratamento foi feita a análise do resultado. Para analisar os resultados deste tratamento foram feitas filmagens dos diferentes poços, para assim verificar a mobilidade das células, tendo em vista que as formas metacíclicas apresentam uma maior mobilidade do que as formas procíclicas e é visto que em culturas ricas em metacíclicas aparece um número maior de células individuais. Após 4 dias de cultivo, foram feitas contagens do total de células e depois desta contagem as células foram submetidas a centrifugação em gradiente de ficoll para enriquecimento de formas metacíclicas. As células obtidas após o gradiente foram contadas e o total de células recuperadas foi estipulado.

O gradiente de ficoll não pode ser usado para garantir com certeza que a metaciclogênese está sendo alterada, já que este não é um experimento específico para se obter promastigotas metacíclica isoladas e pode sofrer vários tipos de interferências (variação na diluição do ficoll, agitação do tubo onde foi montado o gradiente e até mesmo alterações morfológicas na *Leishmania*) que podem contribuir para uma análise equivocada. No entanto este método é mais fácil e rápido para mostrar indícios se realmente a enzima pode agir no mecanismo de metaciclogênese e com isso, verificar a viabilidade de se fazer um experimento mais complexo para confirmar o efeito.

Para fazer o cálculo do número total de células e poder fazer uma comparação entre os diferentes tratamentos foi estipulado que o número total de células encontrado no poço sem tratamento, seria 100 % e posteriormente foram feitos cálculos normalizando os dados com base no poço sem tratamento, que foi considerado o índice 1 do experimento. Foi usada como linha de corte o índice, onde se espera que tratamentos que causem algum efeito demonstrem contagens acima desta linha. A mesma análise foi feita para as contagens pós gradiente de ficoll. Deve se levar em conta que o total de células obtidas antes do gradiente é muito maior que o total de células obtidas após o gradiente. As tabelas com as contagens foram anexadas para que possam ser observados os dados brutos (anexo 2).

Uma conclusão que pode ser obtida deste experimento é que os tratamentos não interferiram na proliferação das células, já que não ocorre uma variação significativa no número de células antes do gradiente de ficoll (Figura 20 A).

Analisando o vídeo feito de cada poço das culturas onde é possível verificar uma alteração na mobilidade apresentada por *L. braziliensis* nos diferentes tratamentos, observa-se que no poço tratado com enzima ocorre uma maior movimentação dos parasitos quando comparado aos dois controles, sendo um indício que a enzima possa estar agindo no mecanismo de metaciclo gênese. Em análise de contagem de células recuperadas após o gradiente de ficoll é possível observar que ocorre uma variação entre os diferentes tratamentos, sendo que existe uma tendência de maior recuperação quando o tratamento é feito apenas com a enzima (figura 20 B). Quando foi feita a adição de GTP ocorreu uma redução no número de células totais obtidas após o gradiente. No entanto é visto que o tratamento com tampão desencadeou uma alteração semelhante ao observado para o tratamento com a enzima. Levando em consideração que no poço tratado com enzima existe o mesmo volume de tampão, pode se pensar então que o efeito observado no poço tratado com enzima seja decorrente do tampão e não da enzima. Entretanto, no vídeo feito do poço tratado apenas com tampão não é observada uma alteração na mobilidade dos parasitos. De qualquer forma, é preciso fazer outros experimentos mais específicos para determinar o quão exato estão os dados obtidos pelo teste de gradiente de ficoll.

Por fim, desconsiderando o dado do poço tratado com tampão, este resultado sugere que, de alguma forma a enzima pode estar interferindo na metaciclo gênese e que esta interferência pode ser dependente da atividade, pois quando é adicionado o GTP ocorre uma redução na metaciclo gênese. Apesar de saber que a adição do GTP pode ser considerada uma suplementação do meio e que talvez o efeito da adição do GTP esteja relacionado com nutrição das células, existe também a possibilidade de que, na presença de GTP, a enzima não interagir com as células ou acarretar em uma modificação conformacional e levar a supressão do efeito antes observado no tratamento sem o GTP. Por outro lado se o resultado do poço tratado com tampão estiver correto, possivelmente o efeito da enzima e GTP seria justamente o oposto, inibindo a metaciclo gênese, já que nos poços onde se tem tratamento de enzima mais substrato ocorreu uma redução na metaciclo gênese, sendo que nestes poços o tampão está presente também, pode-se pensar que a enzima mais substrato estariam inibido o efeito do tampão.

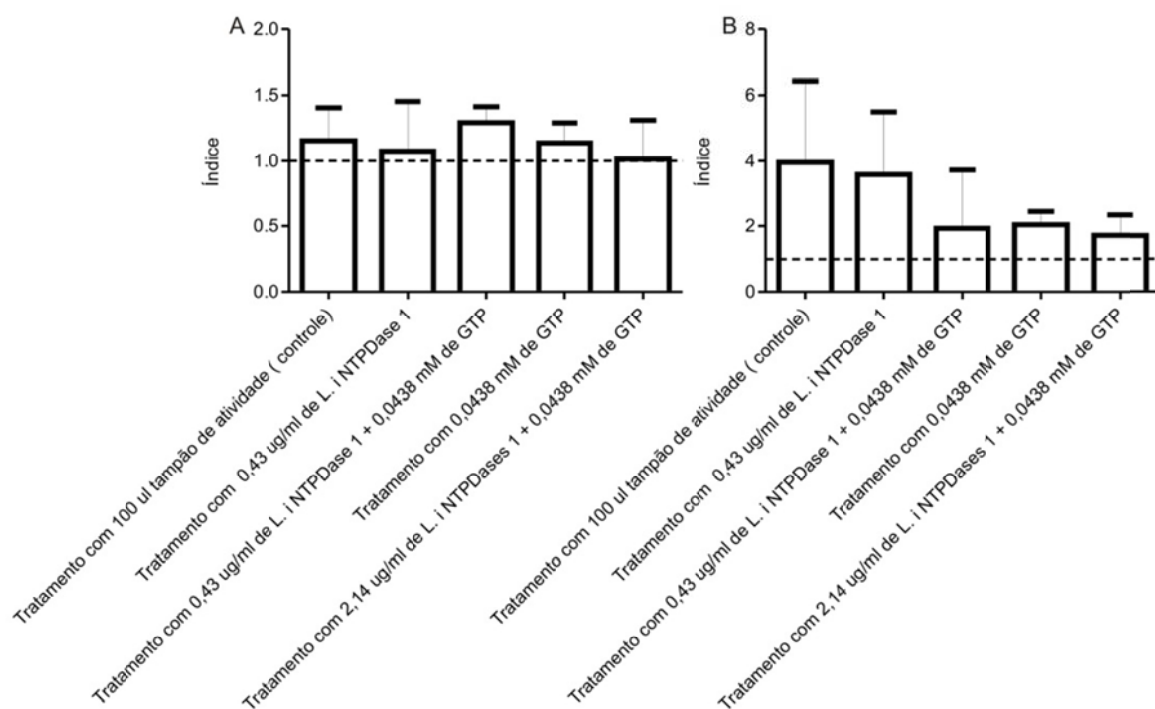


Figura 20: Dados preliminares do efeito dos diferentes tratamentos em culturas axênicas de *L. braziliensis*. A) Interferência dos diferentes tratamentos no crescimento da *L. braziliensis*. B) Interferência dos tratamentos e na metacicloogênese de promastigotas de *L. braziliensis*. O índice 1 (linha tracejada), representa os valores obtidos para o controle do experimento (sem tratamento), assim todos valores acima ou abaixo da linha pode ser considerado como efeito do tratamento.

6. CONCLUSÕES

No presente estudo foi possível fazer diversas análises comparativas entre as E-NTPDases de *Leishmania* e *Trypanosoma* (quando é dito todas E-NTPDases de *Leishmania* e *Trypanosoma* é uma referência às enzimas das espécies estudadas neste trabalho). Dentro destas análises foi possível verificar:

- As NTPDases-1 (mais próximas no agrupamento) estão mais correlacionadas entre si enquanto e as NTPDases-2 também estão mais correlacionadas entre si, portanto as isoformas são mais distantemente relacionadas.
- Todas as NTPDase-1 compartilham uma possível ponte de dissulfeto exclusiva.
- As NTPDases-1 de *Leishmania* são possivelmente secretadas, enquanto que as isoformas de *Trypanosoma* são possivelmente proteínas de membrana.
- As NTPDases-1 de *Leishmania* compartilham pelo menos um sítio de N-glicosilação conservado, o mesmo pode ser dito para as NTPDases de *Trypanosoma*.
- As NTPDases-1 de *Leishmania* compartilham uma ponte dissulfeto conservada que não existe nas de tripanosoma, sendo que as cisteínas que compõem esta ponte dissulfeto são correspondentes às cisteínas (C244-C264) da NTPDase de *L. pneumophila* que participam de uma ponte dissulfeto descrita no trabalho (Vivian *et al.*, 2010).
- As NTPDases-2 parecem ser proteínas ancoradas a membrana, todas compartilham uma ponte dissulfeto predita.
- As NTPDases-2 de *Leishmania* apresentam um único sítio de N-glicosilação conservado.
- A T. brNTPDase-2 pode estar presente na mitocôndria, neste caso esta seria a primeira vez que uma E-NTPDase estaria localizada em mitocôndria.

A comparação de características bioquímicas apresenta grande discrepância entre as NTPDases:

- A L. m NTPDase-2 apresenta capacidade de hidrólise de dois nucleotídeos (GDP e UTP) que a L.i NTPDase-2 não é capaz de hidrolisar.
- A L. i NTPDases-1 apresenta especificidade para GTP, o que não foi observado na L. i NTPDase-2.

Para o estudo de expressão heteróloga da L.i NTPDase-1 foi possível concluir:

- Foi possível expressar a enzima em sua forma solúvel em vetor de expressão de sistema bacteriano. A enzima foi expressa e purificada com sucesso, no entanto é preciso melhorar a etapa de purificação para obter um melhor rendimento em proteína ativa.

A proteína recombinante apresentou atividade nucleotídica, o que indica que mesmo removendo o porção correspondente ao peptídeo sinal obtivemos uma proteína ativa.

- A atividade não parece ser dependente de nenhuma ponte dissulfeto acessível na proteína enovelada, já que em testes na presença de DTT não ocorreram alterações significativas da atividade enzimática.
- A enzima apresenta apenas atividade GTPásica. Esta especificidade não é condizente com o nome da enzima anotada no GeneBank(guanosine diphosphatase), sendo necessário a modificação para Guanosine Triphosphatase (GTPase)
- A enzima apresentou atividade GTPásica maior em pH ácido (5,5-6).
- Sugere-se a participação da enzima no processo de metacicloênese de *Leishmania braziliensis*.

7. PERSPECTIVAS

Os estudos sobre E-NTPDases de parasitos mais especificamente de *Leishmania*, ainda estão em um estágio inicial. Para que seja possível obter informações sobre o real papel destas enzimas na biologia destes parasitos é preciso um longo estudo bioquímico e biológico das mesmas. Dentro deste contexto, o presente trabalho apresenta dados superficiais sobre a caracterização e possível função da L.i NTPDase-1. Desta forma, um estudo mais aprofundado sobre as características bioquímicas e a função biológica desta enzima se faz necessário.

É preciso avaliar a dependência de cátion o que poderia trazer grandes informações sobre em que momento esta enzima poderia estar agindo na célula com maior intensidade. É preciso determinar o K_m para GTP, bem como fazer a análise de inibidores. Dentro do estudo de função é preciso confirmar os dados obtidos nos experimentos com *L. braziliensis* e verificar se este efeito ocorre também em *L. infantum chagasi* e para isto é preciso fazer um estudo mais específico neste sentido, já que o gradiente de ficoll pode causar um viés na análise e como foi observado um dado contraditório no tratamento com tampão, um experimento específico para isolamento e contagem de formas metacíclica se faz necessário. Mesmo que se comprove o efeito da L. i NTPDase-1 na cultura de *Leishmania* é preciso confirmar a localização desta enzima na célula para assim poder se afirmar com maior propriedade que o efeito ocorre naturalmente nestas espécies.

Também é preciso fazer experimento para obter melhores rendimentos na purificação. Esta melhoria pode ser feita por alteração pontual no experimento, onde teria de se tentar obter uma maior solubilidade da recombinante obtida dos corpos de inclusão ou mesmo fazer uma alteração extensa em todo o processo de expressão, visando a obtenção da enzima na forma solúvel. Para isso, teria de se mudar o protocolo de expressão, alterando a temperatura e ou o meio de cultura usado, já que, fazendo estas alterações, pode se obter um menor nível de expressão que acarreta em uma maior solubilidade, evitando ou diminuindo a formação de corpos de inclusão. Estas melhorias são cruciais para a continuação do trabalho.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeijon, C., *et al.* Guanosine diphosphatase is required for protein and sphingolipid glycosylation in the Golgi lumen of *Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol, v.122, n.2, Jul, p.307-23. 1993.

Ashford, D. A., *et al.* Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. Am J Trop Med Hyg, v.59, n.1, Jul, p.53-7. 1998.

Baneth, G., *et al.* Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. Trends Parasitol, v.24, n.7, Jul, p.324-30. 2008.

Bekpen, C., *et al.* The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage. Genome Biol, v.6, n.11, p.R92. 2005.

Ben Yebdri, F., *et al.* Concomitant activation of P2Y(2) and P2Y(6) receptors on monocytes is required for TLR1/2-induced neutrophil migration by regulating IL-8 secretion. Eur J Immunol, v.39, n.10, Oct, p.2885-94. 2009.

Bendtsen, J. D., *et al.* Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. J Mol Biol, v.340, n.4, Jul 16, p.783-95. 2004.

Bern, C., *et al.* Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis, v.2, n.10, p.e313. 2008.

Berninsone, P., *et al.* Regulation of yeast Golgi glycosylation. Guanosine diphosphatase functions as a homodimer in the membrane. J Biol Chem, v.270, n.24, Jun 16, p.14564-7. 1995.

_____. The Golgi guanosine diphosphatase is required for transport of GDP-mannose into the lumen of *Saccharomyces cerevisiae* Golgi vesicles. J Biol Chem, v.269, n.1, Jan 7, p.207-11. 1994.

Berredo-Pinho, M., *et al.* A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. Arch Biochem Biophys, v.391, n.1, Jul 1, p.16-24. 2001.

Bisaggio, D. F., *et al.* Ecto-ATPase activity on the surface of *Trypanosoma cruzi* and its possible role in the parasite-host cell interaction. Parasitol Res, v.91, n.4, Oct, p.273-82. 2003.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

Burnstock, G. Purinergic nerves. Pharmacol Rev, v.24, n.3, Sep, p.509-81. 1972.

_____. Purine and pyrimidine receptors. Cell Mol Life Sci, v.64, n.12, Jun, p.1471-83. 2007.

Chaves, S. P., *et al.* Modulation of P2X(7) purinergic receptor in macrophages by *Leishmania amazonensis* and its role in parasite elimination. Microbes Infect, v.11, n.10-11, Sep, p.842-9. 2009.

Chen, Y., *et al.* ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. Science, v.314, n.5806, Dec 15, p.1792-5. 2006.

Cheng, J., *et al.* Large-scale prediction of disulphide bridges using kernel methods, two-dimensional recursive neural networks, and weighted graph matching. Proteins, v.62, n.3, Mar 15, p.617-29. 2006.

Coutinho-Silva, R., *et al.* The role of P2 receptors in controlling infections by intracellular pathogens. Purinergic Signal, v.3, n.1-2, Mar, p.83-90. 2007.

D'alessio, C., *et al.* Nucleoside diphosphatase and glycosyltransferase activities can localize to different subcellular compartments in *Schizosaccharomyces pombe*. J Biol Chem, v.278, n.25, Jun 20, p.22379-87. 2003.

De Aguiar Matos, J. A., *et al.* Characterisation of an ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. Int J Parasitol, v.31, n.8, Jun, p.770-5. 2001.

De Almeida Marques-Da-Silva, E., *et al.* Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. Microbes Infect, v.10, n.8, Jul, p.850-7. 2008.

Ekman, P. e O. Jager. Quantification of subnanomolar amounts of phosphate bound to seryl and threonyl residues in phosphoproteins using alkaline hydrolysis and malachite green. Anal Biochem, v.214, n.1, Oct, p.138-41. 1993.

Emanuelsson, O., *et al.* Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. J Mol Biol, v.300, n.4, Jul 21, p.1005-16. 2000.

Fernandes, E. C., *et al.* A metallo phosphatase activity present on the surface of *Trypanosoma brucei* procyclic forms. Vet Parasitol, v.118, n.1-2, Dec 1, p.19-28. 2003.

Ferreira Ede, C., *et al.* Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. Vet Parasitol, v.146, n.3-4, May 31, p.235-41. 2007.

Gao, X. D., *et al.* YND1, a homologue of GDA1, encodes membrane-bound apyrase required for Golgi N- and O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, v.274, n.30, Jul 23, p.21450-6. 1999.

Gontijo, N. F., *et al.* *Lutzomyia longipalpis*: pH in the gut, digestive glycosidases, and some speculations upon *Leishmania* development. Exp Parasitol, v.90, n.3, Nov, p.212-9. 1998.

Grace, T. D. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. Nature, v.195, Aug 25, p.788-9. 1962.

Guo, F., *et al.* Rho GTPase Cdc42 is essential for B-lymphocyte development and activation. Blood, v.114, n.14, Oct 1, p.2909-16. 2009.

Gupta, R., *et al.* Scanning the available Dictyostelium discoideum proteome for O-linked GlcNAc glycosylation sites using neural networks. Glycobiology, v.9, n.10, Oct, p.1009-22. 1999.

Herrero, A. B., *et al.* The Golgi GDPase of the fungal pathogen Candida albicans affects morphogenesis, glycosylation, and cell wall properties. Eukaryot Cell, v.1, n.3, Jun, p.420-31. 2002.

Huelsenbeck, J. P. e F. Ronquist. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics, v.17, n.8, Aug, p.754-5. 2001.

Ivanenkov, V. V., *et al.* Bacterial expression, characterization, and disulfide bond determination of soluble human NTPDase6 (CD39L2) nucleotidase: implications for structure and function. Biochemistry, v.42, n.40, Oct 14, p.11726-35. 2003.

Khaminets, A., *et al.* Coordinated loading of IRG resistance GTPases on to the Toxoplasma gondii parasitophorous vacuole. Cell Microbiol, v.12, n.7, Jul, p.939-61. 2011.

Knowles, A. F. e A. K. Nagy. Inhibition of an ecto-ATP-diphosphohydrolase by azide. Eur J Biochem, v.262, n.2, Jun, p.349-57. 1999.

Kronlage, M., *et al.* Autocrine purinergic receptor signaling is essential for macrophage chemotaxis. Sci Signal, v.3, n.132, p.ra55. 2010.

Kukulski, F., *et al.* Extracellular ATP and P2 receptors are required for IL-8 to induce neutrophil migration. Cytokine, v.46, n.2, May, p.166-70. 2009.

_____. Extracellular nucleotides mediate LPS-induced neutrophil migration in vitro and in vivo. J Leukoc Biol, v.81, n.5, May, p.1269-75. 2007.

Kumar, S., *et al.* MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. Comput Appl Biosci, v.10, n.2, Apr, p.189-91. 1994.

Larkin, M. A., *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics, v.23, n.21, Nov 1, p.2947-8. 2007.

Lazarowski, E. R., *et al.* Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. Mol Pharmacol, v.64, n.4, Oct, p.785-95. 2003.

Levesque, S. A., *et al.* NTPDase1 governs P2X7-dependent functions in murine macrophages. Eur J Immunol, v.40, n.5, May, p.1473-85. 2010.

Lopez-Avalos, M. D., *et al.* The UDPase activity of the *Kluyveromyces lactis* Golgi GDPase has a role in uridine nucleotide sugar transport into Golgi vesicles. Glycobiology, v.11, n.5, May, p.413-22. 2001.

Miro, G., *et al.* Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. Trends Parasitol, v.24, n.8, Aug, p.371-7. 2008.

Murphy-Piedmonte, D. M., *et al.* Bacterial expression, folding, purification and characterization of soluble NTPDase5 (CD39L4) ecto-nucleotidase. Biochim Biophys Acta, v.1747, n.2, Mar 14, p.251-9. 2005.

Nakaar, V., *et al.* Basis for substrate specificity of the *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. Mol Biochem Parasitol, v.97, n.1-2, Nov 30, p.209-20. 1998.

Palmer, I. e P. T. Wingfield. Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*. Curr Protoc Protein Sci, v.Chapter 6, Nov, p.Unit 6 3. 2004.

Paranhos-Silva, M., *et al.* Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for American visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. Acta Trop, v.69, n.1, Mar, p.75-83. 1998.

Pinheiro, C. M., *et al.* *Leishmania amazonensis*: Biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. Exp Parasitol, v.114, n.1, Sep, p.16-25. 2006.

Placido, R., *et al.* P2X(7) purinergic receptors and extracellular ATP mediate apoptosis of human monocytes/macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* reducing the intracellular bacterial viability. Cell Immunol, v.244, n.1, Nov, p.10-8. 2006.

Plesner, L. Ecto-ATPases: identities and functions. Int Rev Cytol, v.158, p.141-214. 1995.

Queiroz, P. V., *et al.* Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. Res Vet Sci, v.86, n.2, Apr, p.267-73. 2009.

Rezende-Soares, F. A., *et al.* Cytochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes and identification of an antigenic and catalytically active isoform. Parasitology, v.137, n.5, Apr, p.773-83. 2010.

Robson, S. C., *et al.* The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. Purinergic Signal, v.2, n.2, Jun, p.409-30. 2006.

Romero, G. A. e M. Boelaert. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. PLoS Negl Trop Dis, v.4, n.1, p.e584. 2010.

Sambrook, J. e D. W. Russell. Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001

Sansom, F. M., *et al.* Enzymatic properties of an ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase from *Legionella pneumophila*: substrate specificity and requirement for virulence. J Biol Chem, v.283, n.19, May 9, p.12909-18. 2008.

_____. Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions. Microbiol Mol Biol Rev, v.72, n.4, Dec, p.765-81, Table of Contents. 2008.

Santos, R. F., *et al.* Influence of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase Activity on *Trypanosoma cruzi* Infectivity and Virulence. PLoS Negl Trop Dis, v.3, n.3, p.e387. 2009.

Santos, V. C., *et al.* The physiology of the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): pH in different physiological conditions and mechanisms involved in its control. J Exp Biol, v.211, n.Pt 17, Sep, p.2792-8. 2008.

Saúde, M. D. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. v.3 rd, p.1-122. 2006.

Sharma, U. e S. Singh. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. J Vector Borne Dis, v.45, n.4, Dec, p.255-72. 2008.

Shi, J. D., *et al.* Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1). J Biol Chem, v.276, n.20, May 18, p.17474-8. 2001.

Smits, K., *et al.* Rho GTPase Cdc42 is essential for human T-cell development. Haematologica, v.95, n.3, Mar, p.367-75. 2010.

Steinfeldt, T., *et al.* Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*. PLoS Biol, v.8, n.12, p.e1000576. 2011.

Tamura, K., *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol, v.24, n.8, Aug, p.1596-9. 2007.

Taylor, G. A., *et al.* p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. Nat Rev Immunol, v.4, n.2, Feb, p.100-9. 2004.

Thompson, J. D., *et al.* The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res, v.25, n.24, Dec 15, p.4876-82. 1997.

Uccelletti, D., *et al.* The apyrase Kiynd1p of *Kluyveromyces lactis* affects glycosylation, secretion, and cell wall properties. FEMS Yeast Res, v.7, n.5, Aug, p.731-9. 2007.

Vivian, J. P., *et al.* Crystal structure of a *Legionella pneumophila* ecto -triphosphate diphosphohydrolase, a structural and functional homolog of the eukaryotic NTPDases. Structure, v.18, n.2, Feb 10, p.228-38. 2010.

Vowels, J. J. e G. S. Payne. A role for the luminal domain in Golgi localization of the *Saccharomyces cerevisiae* guanosine diphosphatase. Mol Biol Cell, v.9, n.6, Jun, p.1351-65. 1998.

Wang, T. F. e G. Guidotti. Golgi localization and functional expression of human uridine diphosphatase. J Biol Chem, v.273, n.18, May 1, p.11392-9. 1998.

Wewers, M. D. e A. Sarkar. P2X(7) receptor and macrophage function. Purinergic Signal, v.5, n.2, Jun, p.189-95. 2009.

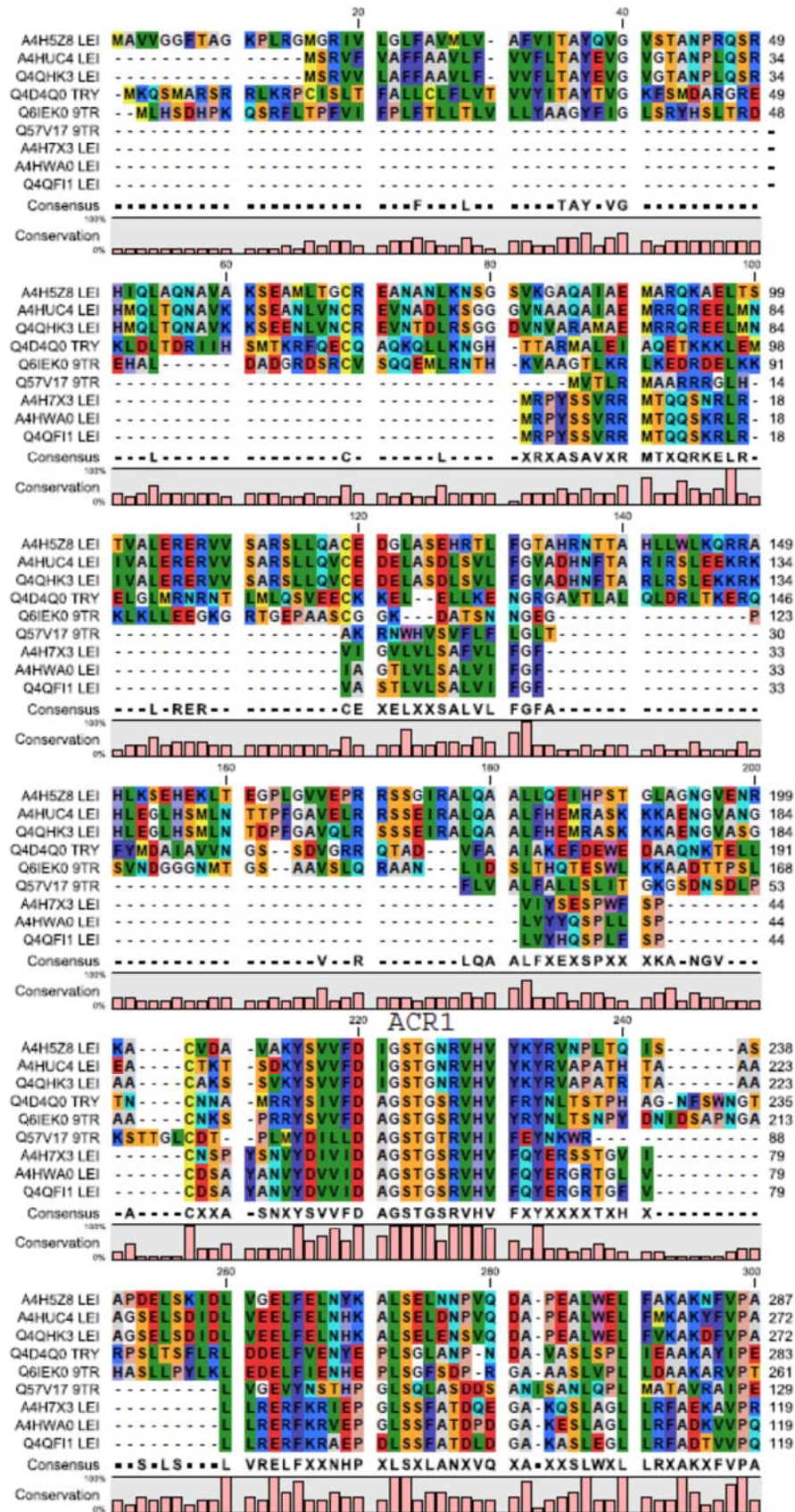
Yegutkin, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. Biochim Biophys Acta, v.1783, n.5, May, p.673-94. 2008.

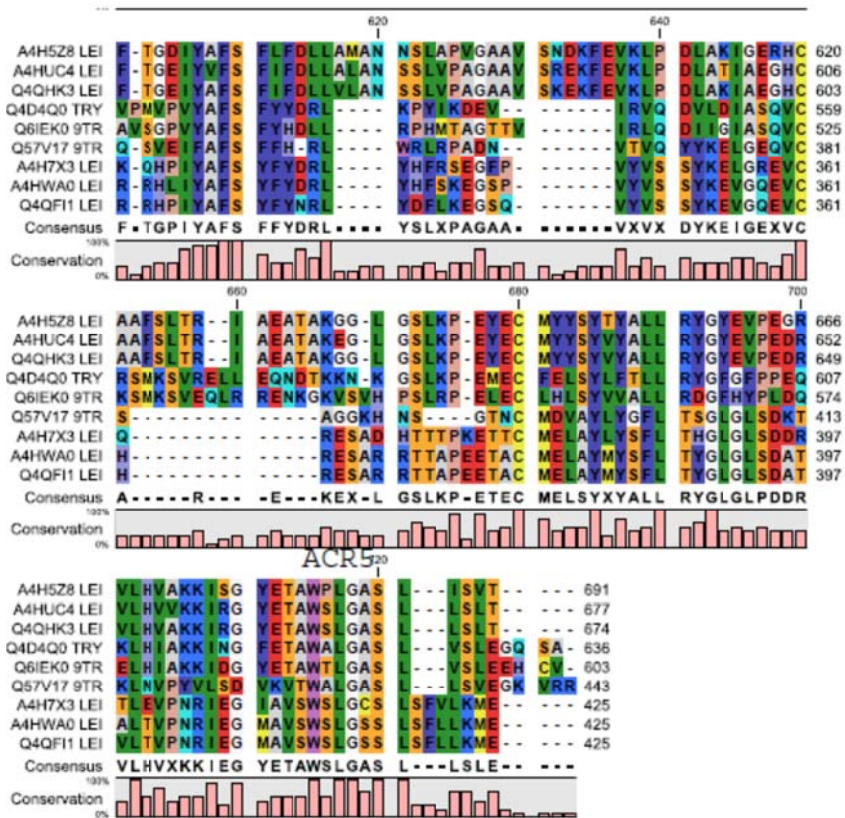
Zebisch, M. e N. Strater. Characterization of Rat NTPDase1, -2, and -3 ectodomains refolded from bacterial inclusion bodies. Biochemistry, v.46, n.42, Oct 23, p.11945-56. 2007.

_____. Structural insight into signal conversion and inactivation by NTPDase2 in purinergic signaling. Proc Natl Acad Sci U S A, v.105, n.19, May 13, p.6882-7. 2008.

Zimmermann, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, v.362, n.4-5, Nov, p.299-309. 2000.

9. ANEXO 1





10. ANEXO 2

contagem de Leishmanias antes e depois do gradiente de ficoll dia 07-12-201		
Antes do Gradiente		
Ensaio	n° por ml	n° total de células
Tratamento com 100 ul tampão de atividade (controle)	$5,45 \times 10^7$	$1,09 \times 10^8$
Tratamento com 0,43 µg/ml	$5,05 \times 10^7$	$1,01 \times 10^8$
Tratamento com 0,43 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	$5,76 \times 10^7$	$1,15 \times 10^8$
Tratamento com 0,0438 mM de GTP	$6,075 \times 10^7$	$1,21 \times 10^8$
Tratamento com 2,14 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	$6,775 \times 10^7$	$1,35 \times 10^8$
Sem tratamento	$4,98 \times 10^7$	$9,96 \times 10^7$

contagem de Leishmanias antes e depois do gradiente de ficoll dia 07-12-201	
Antes do Gradiente	
Ensaio	% do crescimento das células
Tratamento com 100 ul tampão de atividade (controle)	109,437751
Tratamento com 0,43 µg/ml	101,4056225
Tratamento com 0,43 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	115,4618474
Tratamento com 0,0438 mM de GTP	121,4859438
Tratamento com 2,14 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	135,5421687
Sem tratamento	100

contagem de Leishmanias antes e depois do gradiente de ficoll dia 07-12-201		
Depois do Gradiente de ficoll		
Ensaio	n° por ml	n° total de células
Tratamento com 200 ul tampão de atividade (controle)	$8,25 \times 10^6$	$2,64 \times 10^6$
Tratamento com 0,43 µg/ml	$6,10 \times 10^6$	$1,95 \times 10^6$
Tratamento com 0,43 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	$1,10 \times 10^6$	$3,5 \times 10^5$
Tratamento com 0,0438 mM de GTP	$8,5 \times 10^5$	$2,72 \times 10^5$
Tratamento com 2,14 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	$3,7 \times 10^6$	$1,18 \times 10^6$

contagem de Leishmanias antes e depois do gradiente de ficoll dia 18-12-201		
Antes do Gradiente		
Ensaio	n° por ml	n° total de células
Tratamento com 100 ul tampão de atividade (controle)	4,4 x 10 ⁷	8,8 x 10 ⁷
Tratamento com 0,43 µg/ml	4,55 x 10 ⁷	9,10 x 10 ⁷
Tratamento com 0,43 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	4,25 x 10 ⁷	8,5 x 10 ⁷
Tratamento com 0,0438 mM de GTP	3,8 x 10 ⁷	7,6 x 10 ⁷
Tratamento com 2,14 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	2,65 x 10 ⁷	5,3 x 10 ⁷
Sem tratamento	3,075 x 10 ⁷	6,15 x 10 ⁷

contagem de Leishmanias antes e depois do gradiente de ficoll dia 18-12-201	
Antes do Gradiente	
Ensaio	% do crescimento das células
Tratamento com 100 ul tampão de atividade (controle)	143,0894309
Tratamento com 0,43 µg/ml	147,9674797
Tratamento com 0,43 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	138,2113821
Tratamento com 0,0438 mM de GTP	123,5772358
Tratamento com 2,14 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	86,17886179
Sem tratamento	100

contagem de Leishmanias antes e depois do gradiente de ficoll dia 18-12-201		
Depois do Gradiente de ficoll		
Ensaio	n° por ml	n° total de células
Tratamento com 200 ul tampão de atividade (controle)	2,56 x 10 ⁶	2,56 x 10 ⁶
Tratamento com 0,43 µg/ml	2,3 x 10 ⁵	2,3 x 10 ⁵
Tratamento com 0,43 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	6,6 x 10 ⁶	6,6 x 10 ⁶
Tratamento com 0,0438 mM de GTP	1,18 x 10 ⁶	1,18 x 10 ⁶
Tratamento com 2,14 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	2,2 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁵
Sem tratamento	4,7 x 10 ⁵	4,7 x 10 ⁵

contagem de Leishmanias antes e depois do gradiente de ficoll dia 18-12-201	
depois do Gradiente	
Ensaio	% do crescimento das células
Tratamento com 100 ul tampão de atividade (controle)	544,6808511
Tratamento com 0,43 µg/ml	48,93617021
Tratamento com 0,43 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	1404,255319
Tratamento com 0,0438 mM de GTP	251,0638298
Tratamento com 2,14 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	46,80851064
Sem tratamento	100

contagem de Leishmanias antes e depois do gradiente de ficoll dia 22-12-201		
Antes do Gradiente		
Ensaio	n° por ml	n° total de células
Tratamento com 100 ul tampão de atividade (controle)	$3,6 \times 10^7$	$7,2 \times 10^7$
Tratamento com 0,43 µg/ml	$2,8 \times 10^7$	$5,6 \times 10^7$
Tratamento com 0,43 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	$5,17 \times 10^7$	$1,034 \times 10^8$
Tratamento com 0,0438 mM de GTP	$3,7 \times 10^7$	$7,4 \times 10^7$
Tratamento com 0,853 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	$3,17 \times 10^7$	$6,34 \times 10^7$
Sem tratamento	$3,85 \times 10^7$	$7,7 \times 10^7$

contagem de Leishmanias antes e depois do gradiente de ficoll dia 22-12-201	
Antes do Gradiente	
Ensaio	% do crescimento das células
Tratamento com 100 ul tampão de atividade (controle)	93,50649351
Tratamento com 0,43 µg/ml	72,72727273
Tratamento com 0,43 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	134,2857143
Tratamento com 0,0438 mM de GTP	96,1038961
Tratamento com 2,14 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	82,33766234
Sem tratamento	100

contagem de Leishmanias antes e depois do gradiente de ficoll dia 22-12-201		
Depois do Gradiente de ficoll		
Ensaio	n° por ml	n° total de células
Tratamento com 200 ul tampão de atividade (controle)	$2,2 \times 10^5$	$5,5 \times 10^5$
Tratamento com 0,43 µg/ml	$1,96 \times 10^6$	$3,92 \times 10^6$
Tratamento com 0,43 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	$5,9 \times 10^5$	$2,95 \times 10^6$
Tratamento com 0,0438 mM de GTP	$6,8 \times 10^5$	$1,36 \times 10^6$
Tratamento com 0,853 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	4×10^5	$8,4 \times 10^5$
Sem tratamento	$3,7 \times 10^5$	$7,4 \times 10^5$

contagem de Leishmanias antes e depois do gradiente de ficoll dia 22-12-201	
depois do Gradiente	
Ensaio	% do crescimento das células
Tratamento com 100 ul tampão de atividade (controle)	74,32432432
Tratamento com 0,43 µg/ml	529,7297297
Tratamento com 0,43 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	398,6486486
Tratamento com 0,0438 mM de GTP	183,7837838
Tratamento com 2,14 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	113,5135135
Sem tratamento	100

contagem de Leishmanias antes e depois do gradiente de ficoll dia 01-01-2011 primeira placa		
Antes do Gradiente		
Ensaio	n° por ml	n° total de células
Tratamento com 100 ul tampão de atividade (controle)	3×10^5	6×10^5
Tratamento com 0,43 µg/ml	$2,5 \times 10^5$	5×10^5
Tratamento com 0,43 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	3×10^5	6×10^5
Tratamento com 0,0438 mM de GTP	3×10^5	6×10^5
Tratamento com 2,14 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	3×10^5	6×10^5
Sem tratamento	5×10^4	1×10^5

contagem de Leishmanias antes e depois do gradiente de ficoll dia 01-01-11	
Antes do Gradiente	
Ensaio	% do crescimento das células
Tratamento com 100 ul tampão de atividade (controle)	600
Tratamento com 0,43 µg/ml	500
Tratamento com 0,43 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	600
Tratamento com 0,0438 mM de GTP	600
Tratamento com 2,14 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	600
Sem tratamento	100

contagem de Leishmanias antes e depois do gradiente de ficoll dia 01-01-2011		
Depois do Gradiente de ficoll		
Ensaio	n° por ml	n° total de células
Tratamento com 200 ul tampão de atividade (controle)	$1,05 \times 10^5$	$3,15 \times 10^4$
Tratamento com 0,43 µg/ml	$1,1 \times 10^5$	$4,4 \times 10^4$
Tratamento com 0,43 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	$1,35 \times 10^5$	$3,17 \times 10^4$
Tratamento com 0,0438 mM de GTP	$1,9 \times 10^5$	$5,13 \times 10^4$
Tratamento com 0,853 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	$2,25 \times 10^5$	$4,73 \times 10^4$
Sem tratamento	$1,25 \times 10^5$	$2,88 \times 10^4$

contagem de Leishmanias antes e depois do gradiente de ficoll dia 01-01-11	
depois do Gradiente	
Ensaio	% do crescimento das células
Tratamento com 100 ul tampão de atividade (controle)	109,375
Tratamento com 0,43 µg/ml	152,7777778
Tratamento com 0,43 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	110,0694444
Tratamento com 0,0438 mM de GTP	178,125
Tratamento com 2,14 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	164,2361111
Sem tratamento	100

Análises dos dados acima

% de células antes de fazer o gradiente de ficoll		
Ensaio	média dos índices de crescimento das células	Desv. Padrão
Tratamento com 100 ul tampão de atividade (controle)	1,153445585	0,253137255
Tratamento com 0,43 µg/ml	1,073667916	0,379726723
Tratamento com 0,43 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	1,293196479	0,121606617
Tratamento com 0,0438 mM de GTP	1,137223586	0,152938236
Tratamento com 2,14 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	1,013528976	0,296710026
Sem tratameto	1	
% de células após de fazer o gradiente de ficoll		
Ensaio	média dos índices de crescimento das células	Desv. Padrão
Tratamento com 100 ul tampão de atividade (controle)	3,954379719	2,478156559
Tratamento com 0,43 µg/ml	3,585508896	1,908422549
Tratamento com 0,43 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	1,930942031	1,791078793
Tratamento com 0,0438 mM de GTP	2,043242045	0,405764696
Tratamento com 2,14 µg/ml + 0,0438 mM de GTP	1,718842835	0,62546551
Sem tratamento	1	