

RAPHAEL DE SOUZA VASCONCELLOS

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA
NUCLEOSÍDEO TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASE-2 (NTPDase-2) DE
*Leishmania infantum chagasi***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

RAPHAEL DE SOUZA VASCONCELLOS

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA
NUCLEOSÍDEO TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASE-2 (NTPDase-2) DE
*Leishmania infantum chagasi***

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

APROVADA: 26 de Julho de 2010.

Dra. Ethel Fernandes de Oliveira
Peternelli

Prof. Dr. Ricardo De Marco

Profa. Dra. Juliana Rocha Lopes Soares
Ramos

Prof. Dr. Eduardo de Almeida Marques da
Silva

Profa. Dra. Juliana Lopes Rangel
Fietto
(Orientadora)

Aos meus pais Adriana e Josias, às minhas irmãs Carolina e Cecília e à minha esposa Christiane.

Amo muito vocês.

“Porque as suas coisas invisíveis, desde a criação do mundo, tanto o seu eterno poder, como a sua divindade, se entendem, e claramente se vêem pelas coisas que estão criadas, para que elas fiquem inescusáveis...”

Romanos 1-20

iii

AGRADECIMENTOS

A Deus por conceder mais uma de muitas vitórias.

À minha esposa que esteve ao meu lado em todos os dias dessa jornada sem medir esforços.

À minha família por ter me apoiado até aqui.

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

À minha orientadora Juliana Lopes Rangel Fietto pela confiança que depositou em mim.

Ao professor Leandro Licursi de Oliveira pela ajuda e boa vontade em nos atender sempre que precisamos.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos amigos do LIMA que conviveram e compartilharam experiências todos os dias.

Ao Sr. Valdir pela convivência e pela boa vontade em nos atender.

À Tonielli por ter contribuído de várias formas para a realização desse projeto.

À Monique e ao Tchatchá por estarem conosco mesmo nos momentos difíceis.

A todos que estiveram por perto e contribuíram de alguma forma.

Muito obrigado!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 LEISHMANIOSE.....	3
2.2 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA	5
2.3 NTPDASES	9
3. OBJETIVOS	12
3.1 OBJETIVO GERAL	12
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1 MODELAGEM DA LCNTPDASE	13
4.2 CLONAGEM DO ECTODOMÍNIO DA LCNTPDASE	13
4.3 PREPARO DE CÉLULAS BL21(DE3)RIL COMPETENTES	16
4.4 PRODUÇÃO DA LCNTPDASE-2	17
4.5 PURIFICAÇÃO DOS CORPOS DE INCLUSÃO	18
4.6 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-LCNTPDASE	19
4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA	20
4.8 ANÁLISES DE WESTERN BLOTTING E SDS-PAGE	20
4.9 MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	20
4.10 ESTUDO DO ESTADO DE OLIGOMERIZAÇÃO	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1 DETERMINAÇÃO DO MODELO TRIDIMENSIONAL	22
5.2 CLONAGEM E EXPRESSÃO DO DOMÍNIO EXTRACELULAR DA LCNTPDASE	26

5.3	PRODUÇÃO DE SORO CONTENDO ANTICORPOS ANTI-LcNTPDASE RECOMBINANTE	29
5.4	ANÁLISE DA PREFERÊNCIA PELO SUBSTRATO	31
5.5	INFLUÊNCIA DO PH NA ATIVIDADE NUCLEOTIDÁSICA	33
5.6	TESTE DE INIBIDORES DE NUCLEOTIDASES SOBRE A ATIVIDADE UDPÁSICA DA LcNTPDASE-2	34
5.7	ESTUDO DO ESTADO DE OLIGOMERIZAÇÃO DA LcNTPDASE-2 PURIFICADA DE CORPOS DE INCLUSÃO	36
6.	CONCLUSÕES	40
7.	REFERÊNCIAS	41
8.	ANEXOS	50

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Distribuição dos casos de leishmaniose visceral autóctone segundo município, em 2002.	1
Figura 2: Mapa do vetor pET21b(+).	15
Figura 3: Alinhamento das LcNTPDase, Lp1NTPDase e RnNTPDase2.	1
Figura 4: Modelo tridimensional da LcNTPDase de <i>L. chagasi</i>	1
Figura 5: Gráfico de Ramachandran da modelagem da LcNTPDase-2.	1
Figura 6: Passos da clonagem do gene da LcNTPDase-2.	1
Figura 7: SDS-PAGE 10% do teste de indução da LcNTPDase-2 em diferentes concentrações de IPTG no tempo de uma hora.	1
Figura 8: Teste de indução da LcNTPDase-2 em diferentes tempos.	1
Figura 9: Purificação da LcNTPDase-2.	1
Figura 10: Avaliação da produção de anticorpos anti-LcNTPDase-2 no soro de coelho imunizado.	1
Figura 11: Análise da especificidade do soro imune anti-LcNTPDase-2.	1
Figura 12: Análise da linearidade da atividade UDPásica da LcNTPDase-2.	1
Figura 13 Atividade UDPásica da LcNTPDase-2 na dependência do pH.	1
Figura 14 Ensaio de atividade UDPásica da LcNTPDase na presença de inibidores. ...	1
Figura 15: Análise do estado de oligomerização da LcNTPDase-2 purificada de corpos de inclusão.	1
Figura 16: SDS-PAGE 10% corado com prata das amostras coletadas após a cromatografia de exclusão molecular.	1
Figura 17: Atividade enzimática dos picos da exclusão molecular.	1

RESUMO

VASCONCELLOS, Raphael de Souza, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2010. **Expressão heteróloga e caracterização bioquímica da nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase-2 (NTPDase-2) de *Leishmania infantum chagasi***. Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto. Coorientadores: Leandro Licursi de Oliveira e Márcia Rogéria de Almeida Lamego.

A leishmaniose visceral é uma doença grave, responsável por cerca de 57 mil mortes por ano em todo o mundo, sendo a *Leishmania chagasi* o agente etiológico da leishmaniose visceral no novo mundo. Os parasitos do gênero *Leishmania* fazem parte da família Tripanosomatidae, a qual se mostra incapaz de sintetizar purinas pela síntese *de novo*. Acredita-se que as nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases) participem do processo de captação de purinas, parte da via de salvação realizada por esses parasitos, e até mesmo modulem as respostas do sistema imune, pela hidrólise de nucleotídeos envolvidos com a sinalização purinérgica. Neste trabalho foi realizada a expressão heteróloga em sistema pET21b(+) e caracterização enzimática de uma NTPDase mapeada no genoma da espécie *Leishmania chagasi*, aqui denominada de LcNTPDase-2 por existir um outro parálogo (LcNTPDase-1), mais similar à isoforma TcNTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi*. A enzima recombinante LcNTPDase-2 mostrou uma preferência pelos nucleotídeos GTP, UDP e ADP quando na presença de magnésio, e foi inativa na ausência deste íon e presença do cofator cálcio. Ensaio de atividade UDPásica na dependência de pH mostraram que a faixa de pH onde a enzima possui maior atividade está entre 7,0 e 8,0. Os compostos ARL 67156, suramina, molibdato de amônio, azida sódica e gadolínio foram testados como inibidores da atividade UDPásica, apresentando uma inibição de 97% na presença de 300 μ M de Gadolínio e 58% com 3 μ M molibdadato de amônio. Ensaio para o estudo da atividade em função da presença de monômeros ou oligômeros também foram realizados e a enzima mostrou-se mais ativa quando na forma de monômeros. Grandes agregados protéicos foram observados e não exibiram atividade enzimática, porém, após a adição de 10 mM de DTT a

enzima mostrou uma recuperação pequena da atividade. Existem fortes indícios de que haja uma correlação entre essa família de proteína e a virulência de alguns parasitos, como ocorre com *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

VASCONCELLOS, Raphael de Souza, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2010. **Heterologous expression and biochemical characterization of *Leishmania infantum chagasi* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase-2)**. Adviser: Juliana Lopes Rangel Fietto. Co-advisers: Leandro Licursi de Oliveira and Márcia Rogéria de Almeida Lamego.

Visceral leishmaniasis is a severe disease, responsible for about 57.000 deaths per year all over the world, having *Leishmania chagasi* as the etiological agent in the New World. Protozoa of the genus *Leishmania* belong to the Trypanosomatidae family, which is incapable of synthesizing the purine ring. It is believed that the nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) might play a role in purine salvage pathway, and even modulate the host immune system by hydrolysis of nucleotides involved with purinergic signalling. In this work we performed the heterologous expression in pET21b(+) and enzymatic characterization of a NTPDase mapped on *Leishmania chagasi* genome, here named LcNTPDase-2 because a paralog (LcNTPDase-1), more similar to the isoform TcNTPDase-1 of *Trypanosoma cruzi*. The recombinant enzyme LcNTPDase-2 showed a preference for GTP, UDP e ADP in presence of magnesium, and had no activity in absence of magnesium and presence of calcium. UDPase activity assays in dependence of pH showed that the activity was enhanced at 7,0 e 8,0. The compounds ARL 67156, suramin, ammonium molybdate, sodium azide and gadolinium, were tested as UDPase activity inhibitors and presented 97% inhibition in presence of gadolinium at 300 μ M and 58% in presence of ammonium molybdate at 3 μ M. We also performed assays to study the activity as a function of the presence of oligomers or monomers, where only the last one was active. Large protein aggregates were observed, but only showed activity in the presence of DTT at 10mM. There is strong evidence that exist a correlation between this family of proteins and the virulence of some parasites, such as with *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi*.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença grave, e tem a *Leishmania chagasi* como principal agente etiológico no novo mundo. A LV apresenta uma incidência de 500 mil casos por ano, sendo 60% no subcontinente Indiano (Índia, Bangladesh e Nepal), principalmente entre as populações mais pobres em áreas rurais, e tem sido considerada um problema de saúde pública emergente devido ao seu aparecimento nos grandes centros urbanos. O desenvolvimento de novas estratégias para o controle dessa parasitose se faz cada vez mais necessário, uma vez que 57 mil pessoas morrem a cada ano vítimas de leishmaniose (WHO, 2008).

Estudos sugerem a participação das nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDases) na virulência e aquisição de purinas por parasitos, como na Doença de Chagas (Santos *et al.*, 2009), Toxoplasmose (Asai *et al.*, 1995) e Leishmaniose (De Almeida Marques-Da-Silva *et al.*, 2008). Os parasitos do gênero *Leishmania* são incapazes de realizar a biossíntese *de novo* de nucleotídeos de purinas e necessitam de uma via de salvação para satisfazer suas necessidades deste nucleotídeo (Marr *et al.*, 1978). Diversos estudos têm relacionado a importância do metabolismo de nucleotídeos extracelulares com o estabelecimento da infecção por *Leishmania* sp (Berredo-Pinho *et al.*, 2001; Maioli *et al.*, 2004; De Almeida Marques-Da-Silva *et al.*, 2008; De Souza *et al.*, 2010).

As NTPDases são ectonucleotidases importantes descritas, na sua maioria, como proteínas de membrana localizadas externamente ou secretadas na forma solúvel, sendo caracterizadas por terem cinco regiões conservadas de apirase (ACR1 a ACR5), e possuírem a habilidade de degradar nucleotídeos tri e difosfatados (NTPs e NDPs) até a forma monofosfatada. Os nucleotídeos monofosfatados podem então servir como substrato para as ecto-5'-nucleotidases, que promovem a liberação das nucleobases como a adenosina (Vasconcelos *et al.*, 1996; Grinthal *et al.*, 2004).

As NTPDases possuem um papel importante em endoparasitas, desativando respostas do hospedeiro envolvidas com sinalização por nucleotídeos, usualmente ATP ou ADP (Sansom, Robson *et al.*, 2008). Como os nucleotídeos estão presentes em altas concentrações no interior das células e em baixas concentrações no exterior, seu aumento no espaço extracelular pode ser interpretado como sinal de injúria (La Sala *et al.*, 2003). Além disso, estas enzimas exercem um papel sobre a inflamação e a resposta imune mediada por ATP e ADP extracelular (Mizumoto *et al.*, 2002).

Estudos anteriores do nosso grupo e seqüências depositadas no GenBank demonstram a presença de membros desta família de proteína em outros tripanossomatídeos, como *Trypanosoma cruzi* (Fietto *et al.*, 2004), dois genes codificantes de NTPDases em *Leishmania major* (GI – 68125368, isoforma menor e GI – 68124641, isoforma maior), três em *L. chagasi* (GI – 146081775 e GI – 134068433, ambos isoforma menor e GI – 146079011, isoforma maior) e dois em *Leishmania braziliensis* (GI – 134060473, isoforma menor e GI – 134059793, isoforma maior).

Como forma de estudar a capacidade nucleotidásica das NTPDases de *Leishmania*, neste trabalho nós expressamos e caracterizamos a enzima que foi denominada de LcNTPDase-2 de *L. chagasi*, sendo este um passo importante para a elucidação da função desta proteína na infecção por *Leishmania* e para o desenho racional de novas drogas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEISHMANIOSE

A leishmaniose encontra-se espalhada por 22 países do novo mundo e 66 nações do velho mundo, tendo sido encontrada inicialmente no sudeste da Ásia, leste da África e Brasil (WHO, 2008). A infecção em humanos é observada em 16 países da Europa, incluindo França, Itália, Grécia, Malta, Espanha e Portugal (WHO, 2008). São estimados 500 mil novos casos de leishmaniose visceral e mais de 50 mil mortes por ano, números que são somente superados pela malária (Chappuis *et al.*, 2007).

O gênero *Leishmania* pertence à ordem Kinetoplastidae e a família Trypanosomatidae e pelo menos 20 espécies de *Leishmania* são transmitidas pela picada das fêmeas de mais de 30 espécies de flebotomíneos, sendo transmitida por insetos do gênero *Phlebotomus* no velho mundo e *Lutzomya* no novo mundo (Desjeux, 1996; Kamhawi, 2006). A diversidade de formas clínicas mostra a complexidade da doença: A leishmaniose visceral (LV) é considerada a forma mais grave, e pode ser fatal quando não tratada; A leishmaniose mucocutânea (LMC) pode causar mutilações em regiões de mucosa; A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é caracterizada pela longa duração sendo geralmente insensível às drogas disponíveis (Desjeux, 2004).

A LV é causada principalmente por duas espécies de *Leishmania*: *Leishmania donovani* no velho mundo e *Leishmania infantum*, no novo mundo. Atualmente, *L. chagasi* é considerado sinônimo de *L. infantum*, sendo que alguns autores a denominam *L. infantum chagasi*, como aqui será mencionada (Shaw, 2006). A LV afeta geralmente as comunidades mais pobres em áreas rurais, e é caracterizada por ser uma zoonose que acomete as vísceras com alterações patológicas importantes como esplenomegalia, hepatomegalia e alterações na medula óssea (Ministério da Saúde, 2006). A crescente expansão da leishmaniose no mundo se deve ao aumento de diversos fatores,

como: migração, desmatamento, urbanização e hospedeiros humanos susceptíveis a infecção como imunossuprimidos e desnutridos.

Os dados epidemiológicos de 1996 a 2006 revelam a periurbanização e a urbanização da leishmaniose visceral, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA), destacando-se em 2006 as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (Ministério da Saúde, 2006). As áreas de transmissão da doença no Brasil estão representadas na Figura 1.

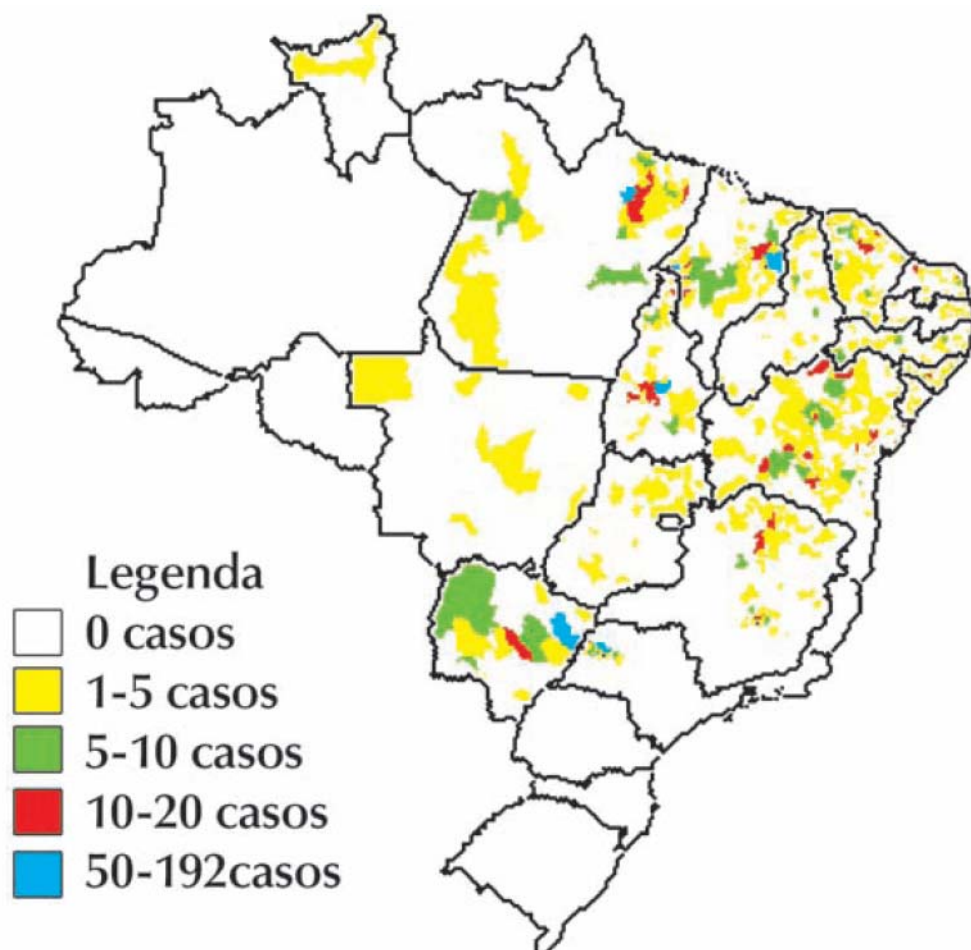


Figura 1: Distribuição dos casos de leishmaniose visceral autóctone segundo município, em 2002. Fonte: Manual de Vigilância e Controle da Leishmania Visceral, Ministério da Saúde, 2006.

O ambiente característico de ocorrência da LV é aquele onde há um baixo nível socioeconômico, prevalente em grande parte no meio rural e na periferia dos grandes centros. Porém, nos últimos anos essa estrutura vem se modificando, especialmente na região Sudeste e Centro-Oeste, onde a LV já se encontra urbanizada (Ministério da Saúde, 2006). Um forte ponto a ser combatido é o controle da infecção em animais como o cão, atualmente considerado o principal reservatório dos parasitos, sendo de grande importância epidemiológica devido à sua proximidade com o homem, contribuindo enormemente para o processo de manutenção da leishmaniose.

Os parasitos alternam entre as formas denominadas amastigotas, intracelulares no hospedeiro vertebrado, e promastigotas, extracelulares no hospedeiro invertebrado. A infecção do vetor é iniciada quando o mesmo se alimenta de sangue contendo macrófagos infectados com a forma amastigota. O parasito se aloja no intestino e a partir daí começa uma série de estádios de desenvolvimentos específicos. Cada um desses estádios é caracterizado por mudanças morfológicas e funcionais destinadas a garantir sua sobrevivência dentro do hospedeiro invertebrado. Fora do hospedeiro vertebrado, seu ciclo de vida fica restrito ao trato digestivo do flebotomíneo. O hospedeiro vertebrado é infectado quando as formas promastigotas metacíclicas são inoculadas pelas fêmeas dos flebotomídeos durante o repasto sanguíneo. Após a internalização em macrófagos, as formas promastigotas são encontradas no vacúolo parasitóforo, onde se transformam nas formas arredondadas amastigotas, concluindo o ciclo de vida natural destes parasitos (Kamhawi, 2006).

2.2 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA

Em 1929 Lohmann, Fiske e Subbarow descobriram o ATP (Fiske *et al.*, 1929). No mesmo ano, Drury e Szent-Gyögyi mostraram que extratos de músculo cardíaco, cérebro, rim e baço exerciam efeitos profundos, como redução na frequência cardíaca, dilatação de vasos sanguíneos coronarianos e inibição da atividade da musculatura lisa do intestino (Drury *et al.*, 1929). Em

1931 as purinas também demonstraram ter ações fora do sistema cardiovascular, mostrando serem capazes de promover contrações na musculatura do útero e intestino (Bennet *et al.*, 1931). Outros estudos confirmaram que nucleotídeos e nucleosídeos de purinas eram capazes de exercer ações vasodilatadoras nas coronárias (Bennet *et al.*, 1931; Winbury *et al.*, 1953).

Em 1972, houve a grande descoberta do ATP como neurotransmissor em nervos não-adrenérgicos e não-colinérgicos (NANC) (Burnstock, 1972). Alguns experimentos de Burnstock em intestino e bexiga mostraram que o ATP era um dos neurotransmissores liberados por nervos distintos dos colinérgicos ou noradrenérgicos.

Os purinoceptores foram definidos em 1976 (Burnstock, 1976), e dois anos depois foram classificados em 2 tipos (P1 e P2) e 4 subtipos. Os receptores P1 foram clonados e denominados de A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 sendo sensíveis a adenosina e inosina (Burnstock, 1976). Em 1985 os receptores P2, sensíveis a ATP, ADP, UTP e UDP, foram subdivididos em P2X e P2Y (Burnstock *et al.*, 1985). Em 1993 e 1994 os receptores P2Y e P2X foram clonados e caracterizados como sendo acoplados a proteína G ou como canais iônicos, respectivamente (Lustig *et al.*, 1993; Valera *et al.*, 1994).

O efeito funcional desencadeado por cada subtipo de receptor P1 dependerá da proteína G acoplada em cada um deles. Os receptores A_1 e A_3 são acoplados à adenilato ciclase através da subunidade α da proteína $G_{i/o}$. Estes dois receptores quando ativados possuem uma ação inibidora sob a atividade da adenilato ciclase. Já os receptores A_2 possuem uma ação inversa, estimulando a adenilato ciclase através da proteína G_s . Os receptores A_{2B} em humanos também podem estar acoplados à proteína $G_{q/11}$, agindo na regulação da atividade da fosfolipase C (Burnstock, 2007).

Os receptores tipo canal P2X podem possuir de 379 a 595 resíduos de aminoácidos (sendo $P2X_7$ o maior e $P2X_6$ o menor) (Collo *et al.*, 1996). Este tipo de receptor pode ser encontrado em células de mamíferos, como neurônios, células musculares, epiteliais, ósseas e células do sistema imune.

Ambas as extremidades N- e C-terminais do receptor estão voltadas para o meio intracelular (Collo *et al.*, 1996). O mecanismo de transporte envolvido na liberação de ATP ainda não é bem conhecido. Porém, há evidências da liberação de ATP por exocitose de vesículas nos nervos (Burnstock, 2006). Para os tecidos não-neuronais vários mecanismos tem sido propostos, como a participação de transportadores ABC, hemi-canais de conexina ou panexina ou a possibilidade de canais iônicos voltagem-dependente, bem como a liberação vesicular (Burnstock, 2006).

Cada região transmembrana desempenha uma função diferente. A primeira transmembrana está relacionada com abertura e fechamento do canal e a segunda envolve o poro iônico (Jacobson *et al.*, 2002). A maior parte do receptor está voltada para o meio extracelular, onde estão os sítios de ligação para agonistas que, quando reconhecidos pelo receptor, causam a abertura do canal catiônico não seletivo (Burnstock, 2007).

Em estudos com receptores recombinantes foi demonstrado que sua atividade pode ser regulada por uma proteína G acoplada a outro receptor, como os P2X de neurônios que são regulados por proteínas G de receptores de serotonina (Nakazawa *et al.*, 1994). O P2X₁ tem sua atividade influenciada por receptores como P2Y₁, P2Y₂, mGluR1a (receptor de glutamato) e 5-HT_{2A} (receptor de serotonina) (Roberts *et al.*, 2006). Após a ativação de uma proteína G por qualquer um destes receptores, ocorre a ativação de PKC que fosforila o receptor na região N-terminal que, por sua vez, desencadeia o controle do canal (Vial *et al.*, 2004). Outra característica interessante é que o receptor P2X₃ é fosforilado por uma ecto-PKC, o que sugere mais uma forma de regular a função deste receptor de modo específico (Wirkner *et al.*, 2005). Considerando que um mesmo agonista pode ativar vários receptores, esta seria uma forma da célula garantir qual o receptor deve ser ativado em um dado momento.

Da mesma forma que em outros canais iônicos, a unidade funcional dos receptores P2X é formada por proteínas oligoméricas, podendo ser homodiméricas (P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₇) ou heterodiméricas (P2X_{1/2}, P2X_{1/4}, P2X_{1/5}, P2X_{2/3}, P2X_{2/6}, P2X_{4/6}, P2X_{4/7}) (Fu *et al.*, 2009).

Dentre os receptores P2X, o P2X₇ é o receptor predominantemente expresso em células imunológicas, e sua ativação é dependente de altas concentrações de ATP, estimulando a liberação de IL-1 β e respostas inflamatórias. A ativação dele também está envolvida na indução de TGF- β 1 em uma via dependente de PKC e MAPK (Wang *et al.*, 2003).

Os receptores P2Y são compostos por sete domínios transmembrana e podem possuir de 308-377 resíduos de aminoácidos, sendo a extremidade N-terminal voltada para o meio extracelular e a C-terminal voltada para o meio intracelular. São aceitos como receptores funcionais, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄ (Von Kugelgen, 2006). A primeira seqüência identificada destes receptores foi a do P2Y₁, sendo utilizados estudos de similaridade estrutural com a rodopsina (interação com proteína G), para possibilitar a identificação dos aminoácidos carregados positivamente nas regiões transmembrana 3, 6 e 7, que poderiam estar envolvidos na interação com ATP (Van Rhee *et al.*, 1995). Existem outras proteínas homólogas ao P2Y (P2Y₅, P2Y₇, P2Y₉ e P2Y₁₀), mas elas não possuem a funcionalidade deste receptor (Ralevic *et al.*, 1998). Diferentemente do P2X, o receptor P2Y está presente na célula na forma de monômeros e sempre acoplado a proteína G. Outra característica interessante destes receptores é que seus genes não possuem íntrons na região codificante, com exceção do receptor P2Y₁₁. Os receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ e P2Y₆, estão associados ao aumento de IP₃ e cálcio intracelular. Já o receptor P2Y₁₁, quando ativado por ATP, causa um aumento de IP₃ e α AMP, mas quando ativado por UTP, desencadeia uma mobilização de cálcio sem aumentar as concentrações de IP₃ e α AMP (Abbracchio *et al.*, 1998).

Um efeito importante da ativação dos receptores P2Y por ADP é a agregação plaquetária, sendo que o processo de agregação ocorre através de ativação de vários receptores, inclusive P2X₁ (North, 2002; Von Kugelgen, 2006). Portanto, não significa que P2Y seja o único a participar desta sinalização, mas aparentemente é o principal. Estes receptores também estão relacionados com a proliferação de macrófagos, principalmente os receptores mais específicos para nucleotídeos de uracila, como P2Y₂, P2Y₄ e P2Y₆. O

receptor P2Y₂ em neutrófilos está também, aparentemente, ligado a processos de degranulação e produção de superóxidos (Seifert *et al.*, 1989).

Devido ao importante papel do ATP no meio intracelular, houve certa resistência ao conceito de que ele exerceria um papel extracelular, pensando que as células não liberariam uma molécula tão fundamental para sua fisiologia, e que seu tamanho e carga não permitiriam uma simples difusão através da membrana (Chaudry, 1982). No entanto, logo foi demonstrado que os nucleotídeos eram capazes de exercer efeitos extracelulares importantes em diferentes órgãos e tecidos. Nucleotídeos de purinas e pirimidinas são importantes reguladores de diversas funções celulares. Alterações na fisiologia da sinalização purinérgica podem resultar no desenvolvimento de uma variedade de patologias, inclusive do sistema imune (Abbracchio *et al.*, 1998).

2.3 NTPDASES

As NTPDases são ectonucleotidases descritas na sua maioria como proteínas de membrana localizadas externamente ou secretadas na forma solúvel, sendo caracterizadas por terem cinco regiões conservadas de apirase (ACR1 a ACR5), e possuírem a habilidade de degradar nucleotídeos tri e difosfatados (NTPs e NDPs) até a forma monofosfatada (Herbert Zimmermann, 2001; Robson *et al.*, 2006). Os nucleotídeos monofosfatados podem então servir como substrato para a ecto-5'-nucleotidase, que promove a liberação de nucleobases como a adenosina (Herbert Zimmermann, 2001). Acredita-se que as principais funções dessas enzimas sejam produzir nucleobases para rota de salvação de purinas e controlar a concentração extracelular dos nucleotídeos e seus metabólitos, controlando de forma indireta processos ativados por estas moléculas, como controle de processos inflamatórios e reações imunes (Vasconcelos *et al.*, 1996; Grinthal *et al.*, 2004).

A concentração extracelular de adenosina, AMP, ADP e ATP, depende da sua liberação pela célula e sua degradação, que é regulada por várias

enzimas que medeiam a hidrólise de nucleosídeos trifosfatados a nucleosídeos no espaço extracelular. As reações iniciais são realizadas por NTPDases e ecto-nucleotídeo fosfodiesterases.

Acredita-se que ecto-NTPDases possuam papel em endoparasitas, desativando respostas do hospedeiro envolvidas com sinalização por nucleotídeos extracelulares, especialmente ATP e ADP (Maioli *et al.*, 2004; Sansom, Robson *et al.*, 2008). Colaborando com esta hipótese, já está descrito na literatura que estas enzimas exercem um papel modulador sobre a inflamação e a resposta imune mediada por ATP e ADP extracelular em mamíferos (Mizumoto *et al.*, 2002). Diversos trabalhos mostram a importância das NTPDases na infecção causada por protozoários patogênicos, indicando uma correlação entre a atividade destas enzimas e a virulência (Berredo-Pinho *et al.*, 2001; De Almeida Marques-Da-Silva *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009). A infecção de camundongos C57BL/6 por *Leishmania amazonensis* é capaz de induzir um aumento na produção de citocinas antiinflamatórias, relacionado provavelmente à capacidade de gerar AMP, graças a atividade ATPásica, diminuindo a produção de citocinas inflamatórias e permitindo assim o estabelecimento da infecção (Maioli *et al.*, 2004). As NTPDases de *Leishmania* podem hidrolisar ATP e ADP (Maioli *et al.*, 2004; De Almeida Marques-Da-Silva *et al.*, 2008).

A fim de fornecer parâmetros para o melhor entendimento do mecanismo de virulência envolvendo a hidrólise de nucleotídeos na infecção por *Leishmania* e estudar uma forma de avaliar a participação das E-NTPDases na infecção por parasitos, nós buscamos a caracterização desta enzima, verificando a capacidade de hidrólise dos diferentes nucleotídeos envolvidos na sinalização celular. Neste sentido, a fim de determinar a participação da LcNTPDase-2 na hidrólise de nucleotídeos em *L. infantum chagasi* nós expressamos essa proteína de forma heteróloga em sistema bacteriano e realizamos caracterizações bioquímicas de preferência por substrato, dependência de cátion divalente, pH de atividade máxima e ação de possíveis inibidores.

Sendo as E-NTPDases moléculas envolvidas com a virulência e infecção em tripanosomatídeos, este é o primeiro passo para o desenho racional de drogas inibidoras da LcNTPDase-2, para que possam ser testadas como quimioterápicos para o tratamento da LV.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar bioquimicamente a LcNTPDase-2 de *L. infantum chagasi* expressa em sistema bacteriano.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar um modelo tridimensional para a LcNTPDase-2, baseado nas proteínas da mesma família com estrutura já resolvida.
- Clonar a LcNTPDase-2 em sistema de expressão bacteriano.
- Expressar e purificar a LcNTPDase-2 produzida em sistema de expressão bacteriano pET21b(+).
- Produzir anticorpo policlonal anti-LcNTPDase-2 para uso em ensaios posteriores.
- Caracterizar a enzima bioquimicamente, em função da dependência de pH, cofator, e preferência por substrato.
- Testar possíveis inibidores de NTPDases e outras ATPases.
- Medir a atividade enzimática em função do estado de oligomerização da proteína.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Infectologia Molecular Animal – LIMA, situado no Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária – BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa – UFV – MG.

4.1 MODELAGEM DA LCNTPDASE

A modelagem foi feita por homologia por intermédio do programa MODELLER 9v7 (Sali *et al.*, 1995). O *template* foi a proteína RnNTPDase-2 de *Rattus norvegicus* número de acesso Y11835, com 29% de identidade. Foram gerados 100 modelos com 5 refinamentos de loop para cada modelo. O melhor modelo gerado pelo Procheck 3.2 (Laskowski *et al.*, 1993) teve seus loops refinados manualmente. O alinhamento foi realizado por meio do programa CLC Workbench 5.2, utilizando a configuração padrão do programa. A predição de estrutura secundária foi realizada com o PSIPRED. A predição de pontes de dissulfeto para a LcNTPDase-2 foi feita no servidor DIANNA 1.1 Web Server. Todos os programas, exceto o MODELLER e o Procheck, foram utilizados com as configurações padrão.

4.2 CLONAGEM DO ECTODOMÍNIO DA LCNTPDASE

Os clones contendo a ORF completa da LcNTPDase-2 de *Leishmania infantum chagasi* M2682 foram produzidos previamente e armazenados a -80°C. Um alinhamento com todas as isoformas de apirases de *Leishmania* pode ser observado no anexo 1. A predição de peptídeo sinal foi realizada com o programa Signal-P (Bendtsen *et al.*, 2004) e mostrou uma provável transmembrana N-terminal seguida de um sítio de clivagem entre os

aminoácidos G31 e F32, porém, com uma curva de hidrofobicidade que se estendia até o aminoácido P40. A confirmação da região hidrofóbica foi feita utilizando-se o TMAP (Milpetz *et al.*, 1995), que mostrou um segmento transmembrana do aminoácido L17 ao L40. Após as análises, os resíduos entre L41 e E425 foram classificados como pertencendo ao ectodomínio. Para a clonagem baseada em PCR dentro do vetor pET21b(+) (Novagen®) (figura 2), os seguintes *primers* foram desenhados: 5'-agtagctagcatgctgctctcccca-3' e 5'-agctcgagttccatcttgagcaggaa-3'. As regiões flangeadoras ao ectodomínio (negrito) 5' de ambos os primers possuem sítios de restrição para as endonucleases *NheI* e *XhoI* (sublinhado). O amplicon de 1278pb foi digerido com as mesmas enzimas de restrição que o vetor. O fragmento final, após a digestão e adição dos sítios de restrição, cauda de hexa-histidina e algumas bases a mais acrescentadas pelo vetor possuía 1191pb. Este fragmento foi purificado do gel de agarose 1% com o kit PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen), bem como o vetor, de acordo com as especificações do fabricante, e ressuspenso em 30 µL de água ultrapura estéril. Para reduzir a perda de DNA durante a eluição, a água foi aquecida a 70°C.

Para a escolha dos sítios de restrição, nós pesquisamos nos programas contidos no WORKBENCH (<http://workbench.sdsc.edu>) por enzimas de restrição que não clivassem o gene da LcNTPDase-2 nem o vetor de clonagem expressão pET21b(+), e que pudessem ser adicionadas nas extremidades 5' dos oligonucleotídeos. Dessa forma, após a clonagem no vetor citado, as enzimas só clivariam a construção plasmídeo-vetor nas regiões flangeadas pelos sítios enzimáticos inseridos.

As reações de amplificação foram feitas para um volume final de 50 µL, utilizando 1 µL do DNA molde (DNA genômico com uma concentração inicial de aproximadamente 90ng/µL), 10pmol de cada oligonucleotídeo, 5µL do tampão de reação Pfu+MgSO₄ 10X (Promega) e água estéril completando o volume. As condições de amplificação consistiram de um passo inicial de desnaturação a 94°C/5min, 34 ciclos (94°C/30seg; 60°C/30seg e 72°C, 90seg), e o passo final de 72°C/5min. Cerca de 5 µL do produto de PCR, misturados a 1µL de tampão tipo IV (azul de Bromofenol) (Sambrook *et al.*, 1989), foram analisados por

O gel foi corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL (Sigma), visualizado e fotografado sob luz ultravioleta.

Bactérias DH5 α foram transformadas com a construção e armazenadas à -80°C com 10% de glicerol, até o momento da utilização. As colônias obtidas durante todo o experimento foram crescidas separadamente em 5 mL de meio LB/Ampicilina durante 16 horas a 37°C sob agitação a 180 rpm. O DNA plasmidial dessas colônias foi extraído utilizando-se o método de lise alcalina (Sambrook, 1989). Os *pellets* de DNA plasmidial foram ressuspensos em 30 µL de água ultrapura estéril.

Todos os ensaios de clivagem enzimática de DNA plasmidial foram realizados a 37°C por 2 horas contendo 1 µL de uma enzima de restrição (10 U/µL) e mais 2 horas contendo mais 1 µL (10 U/µL) da outra enzima de restrição. As reações foram realizadas da seguinte maneira: na primeira reação utilizou-se *NheI* com o tampão Tango na concentração de 1X e na segunda reação adicionou-se ao meio reacional a enzima *XhoI* e acrescentou-se mais 1X do mesmo tampão para finalizar uma concentração de 2X. Tanto as enzimas como o tampão utilizados foram adquiridos da empresa Fermentas® e os procedimentos seguidos de acordo com as especificações do fabricante. Os produtos das reações de digestão enzimática foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% utilizando o padrão de pares de base GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder (Fermentas). Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL (Sigma) e visualizado sob luz ultravioleta.

A confirmação da clonagem foi realizada por digestão com as mesmas endonucleases, PCR e seqüenciamento, realizado no laboratório de genômica da UFV.

4.3 PREPARO DE CÉLULAS BL21(DE3)RIL COMPETENTES

Para a produção de células competentes, as células foram inoculadas em 10mL de meio LB– Cloranfenicol e cresceram por 8h à 37° C sob agitação

a 200rpm. Uma alíquota de 100 μ L do pré-inóculo foi retirada e inoculada em 5mL de meio LB sem antibiótico para crescer por 16h a 37° C sob agitação a 200rpm. As células foram diluídas 1:100 em meio LB sem antibiótico e cresceram até atingir a DO₆₀₀ igual ou próxima a 0,3. Após este passo, a cultura foi transferida para tubos Falcon de 50mL e permaneceram no gelo por 5 minutos. Após uma centrifugação de 5 minutos a 3000 x g o pellet foi ressuspenso em 1/5 do volume original com tampão cálcio/glicerol (60mM de CaCl₂; 10mM de PIPES; 15% de glicerol) gelado. Esse passo foi repetido mais uma vez e a seguir as células permaneceram no gelo por 30 minutos. Depois de mais um passo de centrifugação de 5 minutos a 3000 x g, o *pellet* foi ressuspenso em tampão cálcio glicerol, gelado, com 1/40 do volume inicial aliquoteado e estocada a -80°C.

4.4 PRODUÇÃO DA LCNTPDASE-2

O meio de cultura utilizado para o procedimento de clonagem foi o Luria-Bertani (LB) 1% de bacto-triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl, pH 7,0, líquido ou sólido, para o crescimento de culturas bacterianas, a 37°C sob agitação de 180rpm. Quando necessário, foi adicionada aos meios solução de ampicilina em uma concentração final de 50 μ g/mL (Sambrook, 1989). Para a expressão heteróloga da proteína, foi utilizado o meio SOC (0,5% de extrato de levedura, 2% de triptona, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄, 20 mM de glicose) (Sambrook, 1989).

O plasmídeo recombinante foi purificado a partir de *minipreps* das células DH5 α (Sambrook et al., 1989) e células de *E. coli* BL21(DE3)RIL competentes foram transformadas para a expressão da proteína. O pré-inóculo foi cultivado em 5mL de meio LB contendo 50 μ g/mL de ampicilina (Sambrook et al., 1989) 16h a 37°C sob agitação. A cultura foi transferida para 0,5L de meio SOC e as células cresceram até atingir a DO₆₀₀ de 0,6. Para a indução da expressão, 0,2mM de IPTG foi adicionado e a indução foi realizada por uma

hora, a 37°C sob agitação a 180 rpm. Ao final da indução pellets de alíquotas de 100mL (Aproximadamente 0,9g de células) foram armazenados a -80°C.

4.5 PURIFICAÇÃO DOS CORPOS DE INCLUSÃO

A construção pET21b/LcNTPDase-2 foi utilizada para transformar bactérias *E. coli* BL21 (DE-3)RIL. Os clones confirmados foram testados quanto à expressão utilizando-se a concentração do indutor (IPTG) 1mM e testando-se o melhor tempo de indução, de 1h a 4h. As concentrações de IPTG também foram testadas (0,1mM; 0,2mM; 0,4mM; 0,6mM; 0,8mM; 1mM). Para isto foi usado meio SOC (0,5% de extrato de levedura, 2% de triptona, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄, 20 mM de glicose). As bactérias cresceram até atingir DO₆₀₀=0,6 a 37°C sob agitação de 180rpm sendo o indutor (IPTG) adicionado após esta etapa. Foram utilizadas as técnicas de SDS-PAGE 10% e Western-blotting para avaliação da expressão protéica.

A produção da proteína foi realizada utilizando-se um *pellet* equivalente a 100mL de células (aproximadamente 0,9g de célula) de *E. coli* BL21(DE-3)RIL induzidas por 1 horas com 0,2mM de IPTG. Aos *pellets* de indução de 100mL foram adicionados 4mL de tampão de lise, que continha os seguintes inibidores de proteases: aprotinina 1µg/mL, pepstatina A 1µg/mL e leupeptina 1µg/mL, além de 100mM de Tris pH 8,0, 300mM de NaCl e 1mg/mL de lisozima. Após 30 minutos a amostra foi sonicada em 6 ciclos de 10 segundos a 20 Hz e centrifugada a 12500 x g por 30 minutos. Os *pellets* contendo os corpos de inclusão foram separados e ressuspensos em 20mL de tampão de lavagem (50mM DE Tris pH 8,0; 500mM de NaCl; 10mM de β-mercaptoetanol; 2M de uréia), seguido de mais um passo de centrifugação a 12500g. Este passo foi repetido mais uma vez. O *pellet* restante, contendo uma concentração muito elevada da proteína de interesse insolúvel nos corpos de inclusão, foi solubilizado em 1mL de tampão contendo 50mM de Tris pH 8,0; 500mM de NaCl; 10mM de β-mercaptoetanol e 8M de uréia. A amostra permaneceu em

repouso por 15 minutos neste tampão e 19mL de tampão (50mM DE Tris pH 8,0 e 500mM de NaCl) foram adicionados lentamente para a renaturação da enzima. Após 24h deste último passo, os ensaios de atividade foram realizados.

4.6 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-LCNDTPDASE

Para a produção de anticorpos, um coelho, fêmea, adulta jovem, proveniente do biotério de criação de coelhos da Universidade Federal de Viçosa (UFV) foi utilizado. A LcNTPDase-2 de *Leishmania infantum chagasi* foi purificada em resina de níquel (Sigma Aldrich®) até a obtenção de 400 µg de proteína. Três imunizações foram realizadas. A primeira imunização foi feita com 100 µg de proteína previamente homogeneizada com adjuvante completo de Freund. Após 21 dias, a segunda imunização foi feita com 200 µg mais adjuvante completo. Após 15 dias, a terceira e última imunização foi feita com 100 µg de proteína mais adjuvante incompleto. O animal foi sacrificado após 7 dias da terceira imunização. Todas as imunizações foram realizadas em um volume total de 1mL e por via subcutânea.

Para a determinação do título do anticorpo, um "Dot Blot" foi realizado, com 2µg de proteína em membrana de nitrocelulose. Para o bloqueio, soro albumina bovina (BSA) na concentração de 0,3% diluído em PBS 1X com Tween 0,1% foi utilizado por trinta minutos. Após três lavagens de cinco minutos com PBS 1X com Tween 0,1%, os soros imune ou pré-imune foram adicionados e a incubação ocorreu por uma hora. Em seguida, três lavagens de cinco minutos com PBS 1X com Tween 0,1% foram realizadas para posterior incubação com o anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich®). A reação foi revelada com 0,1% de 3,3'-diaminobenzidina, 0,01% de H₂O₂, 1% de cloreto de níquel em Tris-HCl pH 7,6 até a visualização de precipitado marrom.

4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) padronizado para microplaca de acordo com as orientações do fabricante. Foi utilizado BSA para determinação da curva padrão. A dosagem foi conferida aplicando-se 1 µg de BSA e 1 µg de proteína no gel de SDS-PAGE 10% para comparação visual da intensidade das bandas.

4.8 ANÁLISES DE *WESTERN BLOTTING* E SDS-PAGE

As análises de Western Blotting e SDS-Page foram realizadas como previamente descrito (Sambrook et al., 1989). Para o Western Blotting, foi utilizado o anticorpo primário produzido em camundongo anti hexa-histidina (GE Healthcare[®]) na diluição de 1:6000 e anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com FITC (Sigma Aldrich[®]) na diluição de 1:8000. A incubação com a solução contendo o anticorpo primário foi feita por 2 horas sob leve agitação a temperatura ambiente. Em seguida foram feitas três lavagens com 20 mL de solução PBS 1X e 0,1% Tween e adicionado a solução contendo o anticorpo secundário que permaneceu em contato com a membrana por 2 horas. Finalmente realizou-se uma última lavagem com 20 mL de PBS 1X e 0,1% Tween para retirar o excesso de anticorpo secundário. O Western Blotting foi revelado por excitação do FITC a 472nm para visualização no equipamento FLA-5100 imaging system da FujiFilm.

4.9 MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática foi realizada por método microcolorimétrico de determinação de ortofosfato livre (Taussky *et al.*, 1953). A atividade foi feita em

tampão 50mM de Tris pH8,0; 50mM de HEPES pH8,0; 3mM de MgCl₂ ou CaCl₂; 116mM de NaCl ; 5,4mM de KCl e 2,5mM de nucleotídeo (Meyer-Fernandes *et al.*, 2004). Para determinação da dependência de pH, além desses reagentes, o tampão também continha 50mM de MES. A reação foi disparada com 1 µg de proteína e ocorreu por 30 minutos a 37°C, até que fosse parada com 0,1M de HCl. Para determinação de ortofosfato livre, foi utilizado o reagente colorimétrico (verde malaquita 0,2% e molibdato de amônio 10% 1:3, ambos ressuspensos em HCl 4M). O branco da reação continha todos os reagentes, exceto a proteína que foi adicionada após a parada da reação. Para determinação da dependência do pH, a reação foi realizada em tampão contendo 50mM de MES; 50mM de Tris; 50mM de HEPES; 3mM de MgCl₂; 116mM de NaCl; 5,4mM de KCl e 2,5mM de nucleotídeo. O pH foi ajustado para cada reação conforme indicado na figura 13. Os ensaios utilizando os inibidores foram realizados com as concentrações de 300 µM de ARL, 300 µM de cloreto de gadolínio, 100 µM de Suramina conforme o que foi testado para a NTPDase de *T. cruzi* (Santos *et al.*, 2009), 2 mM de azida sódica e 3 µM de molibdato de amônio como testado por Fietto (Fietto *et al.*, 2004).

4.10 ESTUDO DO ESTADO DE OLIGOMERIZAÇÃO

Para determinação do estado de oligomerização, foi utilizada a técnica de cromatografia por exclusão molecular foi utilizado empregando o equipamento Äkta Purifier (GE Healthcare®) com a coluna de exclusão molecular Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare®). Para a curva padrão foram utilizados 2mg/mL de blueextran (2000kDa), tireoglobulina (669kDa) e aldolase (158kDa); 7mg/mL de albumina (67kDa) e ovoalbumina (43kDa), 5mg/mL de catalase (232kDa); 3mg/mL de quimiotripsinogênio A (25kDa); 0,5mg/mL de ferritina (440kDa) e 1mg/mL de ribonuclease A (13,7kDa), para os quais foram feitas três corridas separadas, com fluxo de 0,5mL/min, de acordo com instruções do fabricante. O tampão de eluição foi o mesmo da atividade

enzimática. Foi utilizado 10mM de DTT quando indicado. A atividade UDPásica após a exclusão molecular foi feita em tampão pH 8,0 contendo 50mM de glicina 50mM de ácido acético, 50mM de MOPS; 3mM de MgCl₂; 116mM de NaCl ; 5,4mM de KCl e 2,5mM de UDP.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DO MODELO

A fim de entender um pouco sobre a estrutura da LcNTPDase-2, um alinhamento foi feito com as duas únicas NTPDases com estrutura resolvida, depositadas no banco de dados PDB (figura 3). As identidades com as proteínas RnNTPDase-2 de *Rattus norvegicus* (Zebisch et al., 2008) e Lp1NTPDase de *Legionella pneumophila* (Vivian et al., 2010) foram de 29% e 35%, respectivamente. A maior identidade entre a LcNTPDase2 e Lp1NTPDase se deve ao fato da enzima de *L. pneumophila* ser um pouco menor (393aa) do que a de *L. infantum chagasi* (425), uma vez que as ACRs são muito conservadas. Na figura 3 é possível observar como é semelhante a predição de estrutura secundária com as demais enzimas já resolvidas. A predição de estrutura secundária da LcNTPDase-2 foi realizada por intermédio do programa PSIPred, enquanto as demais foram retiradas da literatura (Zebisch et al., 2008; Vivian et al., 2010). Essa semelhança já era esperada, pois todas as proteínas pertencem a uma mesma família e, apesar da baixa identidade de aminoácidos, a homologia é grande com relação à estrutura.

Baseado na grande homologia estrutural entre a Lp1NTPDase e a RnNTPDase-2, no alinhamento com as três proteínas e nas identidades entre elas, foi feita uma modelagem por homologia com a LcNTPDase2. A modelagem múltipla com a Lp1NTPDase e a RnNTPDase-22 não foi satisfatória, pois menos de 90% dos aminoácidos ficaram dentro da área permitida no gráfico de Ramachandran. O mesmo aconteceu quando fizemos

essa modelagem somente com a Lp1NTPDase. O melhor resultado obtido foi com a RnNTPDase2, onde mais de 90% dos resíduos ficaram nas áreas permitidas (figuras 4 e 5). Apesar disso, alguns loops tiveram que ser modelados manualmente, pois alguns aminoácidos, além da glicina e da prolina, ficaram em regiões não permitidas.

Além da grande homologia estrutural existente entre a RnNTPDase-2 e a Lp1NTPDase, e das duas enzimas hidrolisarem bem o ATP, elas são capazes de utilizar tanto o cálcio quanto o magnésio como cofator, porém, a enzima de rato possui uma maior atividade na presença de cálcio, enquanto que a de *L. pneumophila* é mais ativa na presença de magnésio (Zebisch *et al.*, 2007; Sansom, Riedmaier *et al.*, 2008).

Algumas regiões conservadas de apirase (ACRs) apresentam diferenças discretas, porém, alguns resíduos são tão importantes que se sofrerem algum tipo de mutação podem levar a uma completa inativação da enzima. É o que acontece. por exemplo, quando ocorrem mutações no resíduo W384A na ACR5 da Lp1NTPDases, que leva a uma completa perda de atividade, o que pode ser atribuído ao fato deste resíduo estar envolvido na coordenação do cofator (Vivian *et al.*, 2010). Outro resíduo muito importante é o E165 (posição relativa a RnNTPDase2 de rato), que é 100% conservado entre as apirases e participa do posicionamento de uma molécula de água que faz o ataque nucleofílico ao fosfato terminal do nucleotídeo (Zebisch *et al.*, 2008).

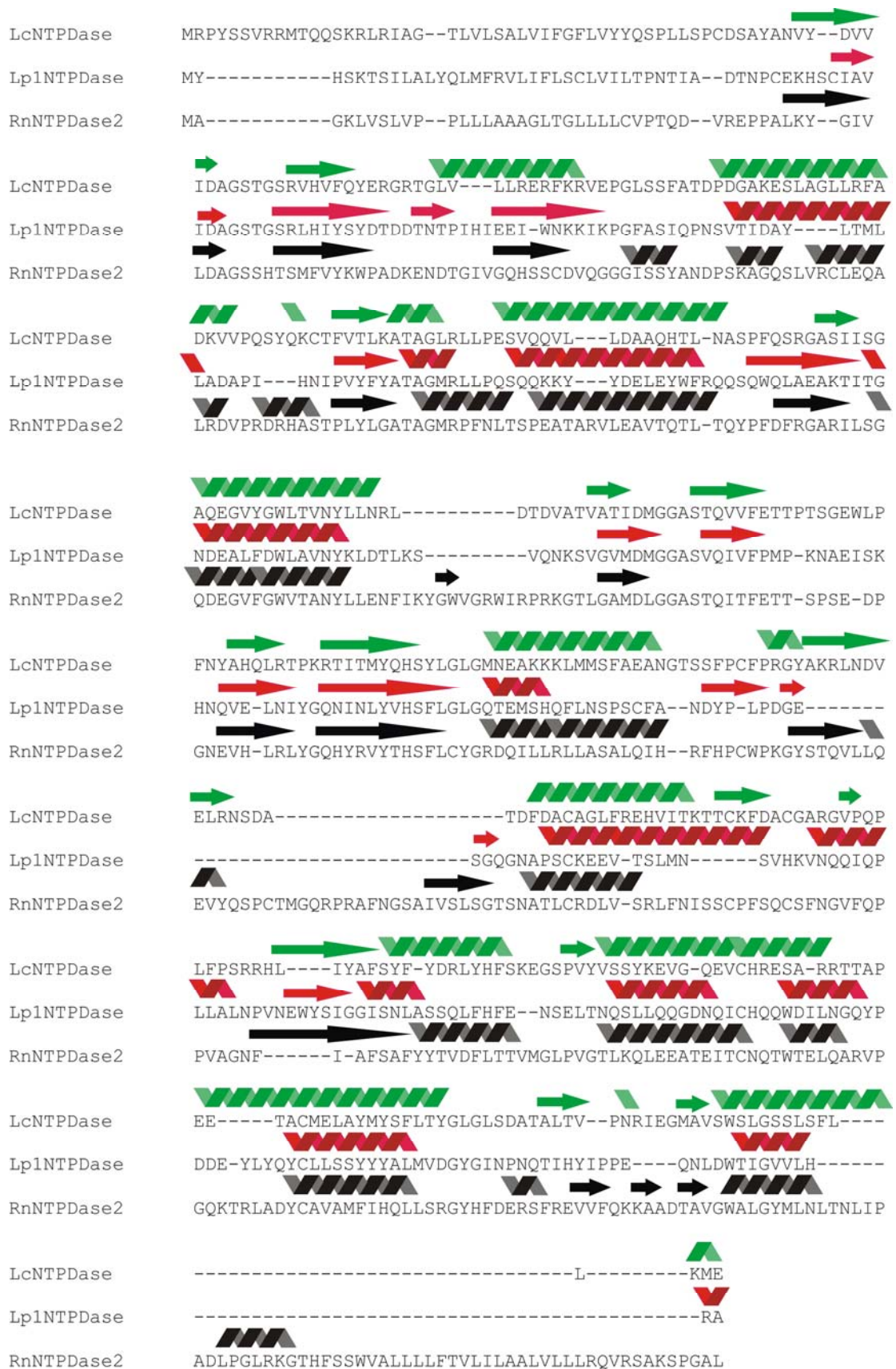


Figura 3: Alinhamento das LcNTPDase, Lp1NTPDase e RnNTPDase2. O alinhamento foi realizado pelo programa T-Coffee utilizando-se as configurações padrão. A predição de estrutura secundária da LcNTPDase-2 foi realizada através do PSIPred, enquanto que as demais foram retiradas da literatura.

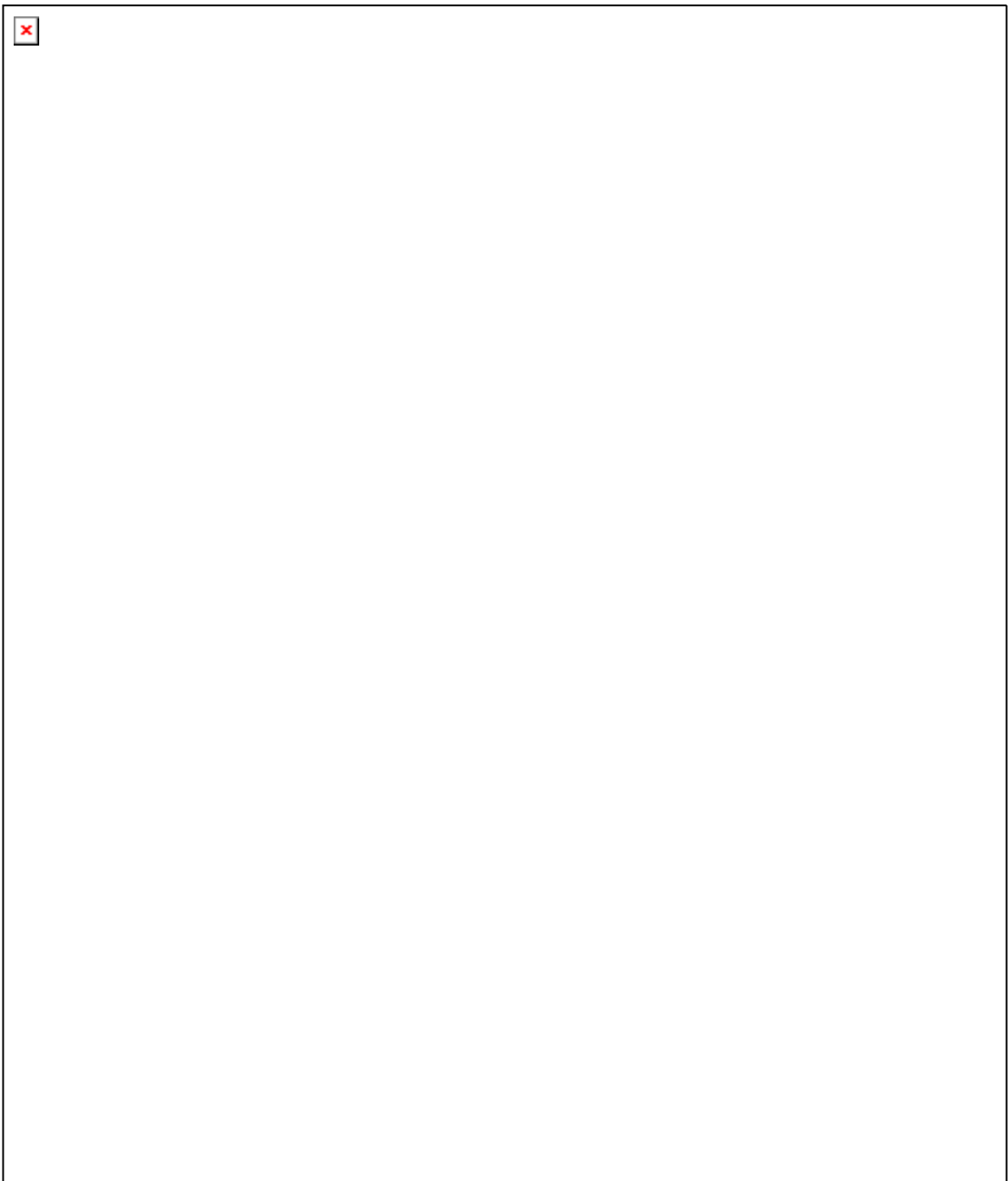


Figura 4: Modelo tridimensional da LcNTPDase de *L. chagasi*. Modelagem da NTPDase de *L. infantum chagasi*, evidenciando as regiões conservadas de apirases ACR1 (laranja), ACR2 (azul), ACR3 (amarelo) ACR4 (vermelho) e ACR5 (cinza) (A); Sobreposição do modelo de *L. infantum chagasi* (verde) com a estrutura resolvida da Lp1NTPDase de *L. pneumophila* (rosa) (B); Sobreposição do modelo de *L. infantum chagasi* (verde) com a estrutura resolvida da RnNTPDase 2 de *R. norvegicus* (azul) (C). Sobreposição na RnNTPDase 2 (azul) com a Lp1NTPDase (rosa) (D). As imagens foram geradas pelo programa PyMol. Somente a região solúvel da proteína foi modelada.

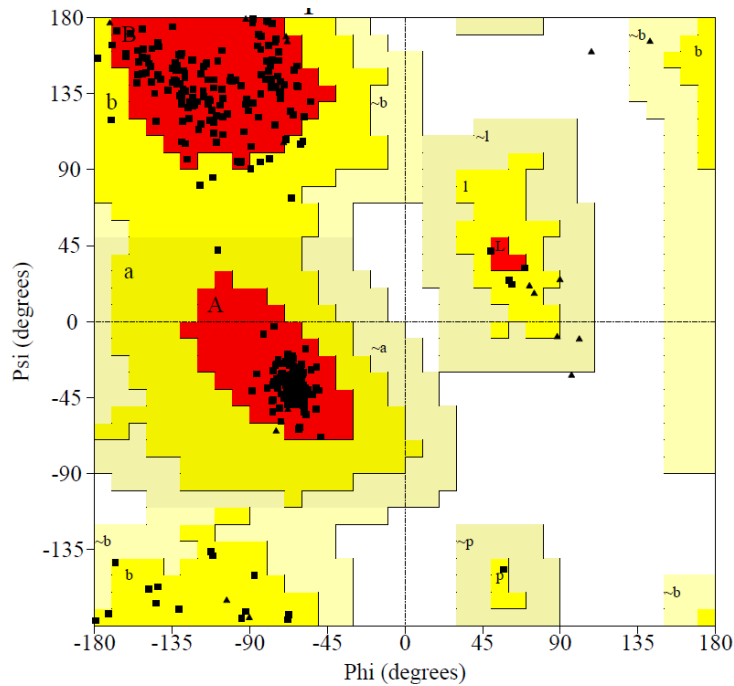


Figura 5: Gráfico de Ramachandran da modelagem da LcNTPDase-2. 92% dos resíduos se encontram em regiões favoráveis e 8% nas regiões permitidas. O gráfico foi gerado pelo programa Procheck.

5.2 CLONAGEM E EXPRESSÃO DO DOMÍNIO EXTRACELULAR DA LCNTPDASE

A fim de verificar a funcionalidade da LcNTPDase-2 como uma nucleotidase, a região solúvel da proteína foi clonada em vetor de expressão bacteriano pET21b(+) e a expressão foi realizada em células de *E. coli* BL21(DE3)RIL. O gene foi replicado por PCR (figura 6A) e o vetor vazio a ser utilizado na construção foi purificado, como descrito por Sambrook, 1989 (figura 6B). A clonagem foi confirmada por PCR (figura 6C), digestão (figura 6D) e seqüenciamento. Foi realizado um teste de expressão com diferentes concentrações do indutor IPTG (de 0,1 a 1mM). A proteína tinha um tamanho esperado de 45kDa e não foi observada variação da expressão da proteína em função da concentração de IPTG (figura 7). Dessa forma, a concentração de IPTG para indução da expressão da LcNTPDase-2 foi padronizada em 0,2mM de IPTG. Após isso, foi verificado o tempo de indução ideal para a superexpressão da proteína, variando de 1h a 4h de indução. Como pode ser visto na figura 8B, houve expressão da proteína recombinante e o melhor

tempo de indução foi o de uma hora. Após a confirmação da expressão, avaliamos o método de purificação parcial da LcNTPDase-2. Devido à superexpressão, a proteína precipitou na forma de corpos de inclusão. Para a solubilização e *refolding* da proteína prosseguimos de acordo com o protocolo previamente descrito em “Material e Métodos”. Após a purificação e eletroforese em gel de poliacrilamida, o gel foi corado com Coomassie ou prata (figura 9A e B), e na concentração em que a amostra final se encontra nenhuma outra banda pode ser observada, o que sugere uma relativa pureza da amostra. Para assegurar a qualidade da purificação, foi realizado uma coloração do gel com prata, e como esperado, nenhuma outra banda, além da de interesse, foi observada (figura 9C).

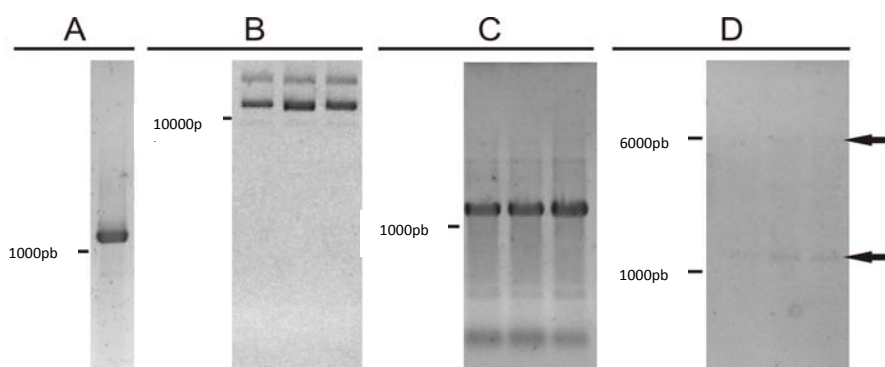


Figura 6: Passos da clonagem do gene da LcNTPDase-2. Todas as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%. A visualização das bandas foi feita sob luz ultravioleta. Reação de PCR para retirada da região codificante N-terminal (A); *Miniprep* das três colônias que foram isoladas contendo a construção (B), Reação de PCR para confirmação da clonagem do fragmento de 1191pb das três colônias isoladas(C); Reação de digestão para confirmação da clonagem (D)

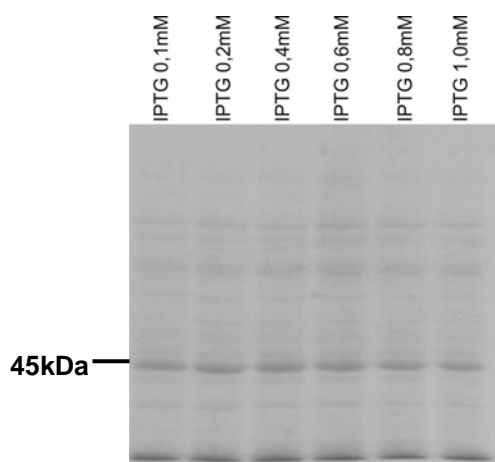


Figura 7: SDS-PAGE 10% do teste de indução da LcNTPDase-2 em diferentes concentrações de IPTG no tempo de uma hora. As concentrações testadas estão acima das canaletas. Foram aplicados 15µL de células na DO₆₀₀ de 3.

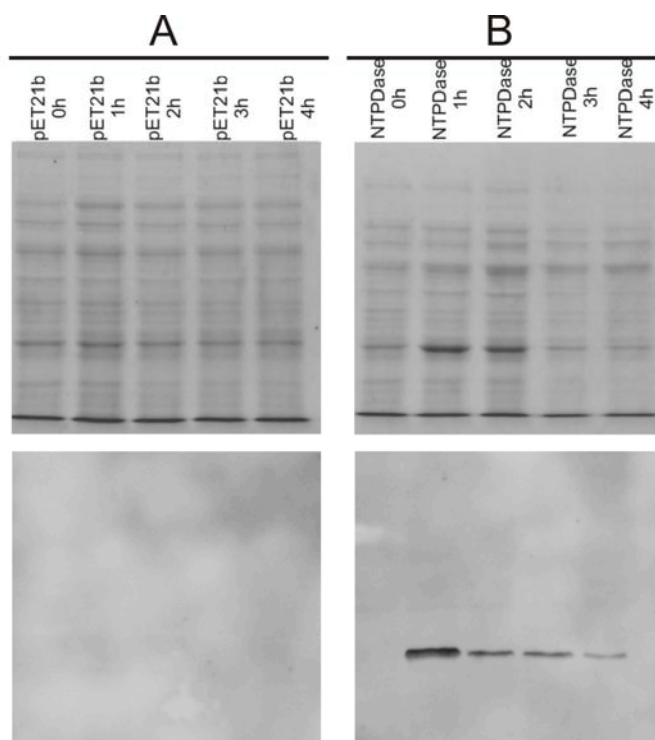


Figura 8: Teste de indução da LcNTPDase-2 em diferentes tempos. A figura mostra o gel SDS-PAGE 10% e *Western Blotting* dos extratos de células para o teste de tempo de indução a 37°C. Vetor vazio induzido (A); Vetor induzido contendo o inserto (B). Foram aplicados 15µL de células na DO₆₀₀ de 3. A indução foi realizada com 0,2mM de IPTG. O gel foi corado com Coomassie Blue. Para o *Western Blotting* foi utilizado como anticorpo primário anti-hexahistidina produzido em camundongo e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com FITC. A revelação foi feita no equipamento da Fujifilm Phosphorimager a 472nm com filtro azul.

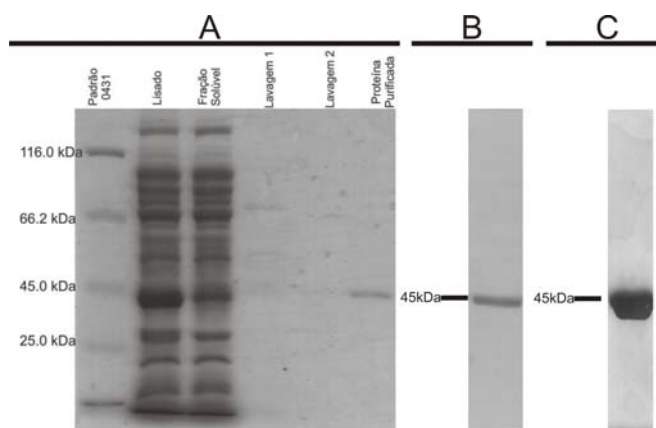


Figura 9: Purificação da LcNTPDase-2. A LcNTPDase-2 foi expressa por 1h com 0,2mM de IPTG. SDS-PAGE 10% corado com Coomassie Blue diferentes das etapas da purificação. O lisado corresponde à amostra induzida e submetida a lise. A fração solúvel corresponde às proteínas solúveis após a centrifugação do lisado. As lavagens correspondem ao sobrenadante dos passos de lavagem dos corpos de inclusão, e a proteína purificada corresponde aos corpos de inclusão solubilizados e purificados. (A); Proteína purificada corada com prata (1µg) (B); Proteína purificada em resina de níquel corada com prata (3µg) (C).

5.3 PRODUÇÃO DE SORO CONTENDO ANTICORPOS ANTI-LcNTPDASE RECOMBINANTE

A proteína solubilizada dos corpos de inclusão foi purificada em resina de níquel conforme descrito em “Material e Métodos” e foi usada para produção de soro policlonal anti-LcNTPDase-2. O soro foi produzido em uma coelha adulta, com duas imunizações com adjuvante completo e uma com adjuvante incompleto. Para a análise da produção de anticorpos específicos para a LcNTPDase-2 no soro da coelha, um “Dot Blot” foi realizado. O Dot Blot mostrou que a produção de anticorpos foi muito satisfatória, com títulos superiores a 1:160.000 quando comparados com o soro pré-imune, que não mostrou reatividade (figura 10). Para a verificação da especificidade do anticorpo, um Western blotting foi realizado utilizando o extrato celular de BL21(DE3)RIL com o vetor vazio (controle negativo), a construção com a LcNTPDase-2 ou uma outra construção com a NTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi*, proteína da mesma família da LcNTPDase-2, gentilmente cedida por Christiane Mariotini Moura. O soro imune foi capaz de reconhecer somente as apirases de *L. chagasi* e *T. cruzi* e não o extrato de BL21 com o vetor vazio (figura 11). Na canaleta em que se encontra a LcNTPDase-2 houve o reconhecimento de mais três bandas abaixo da banda de interesse e pode refletir degradação da proteína alvo, uma vez que todas as amostras eram de extratos de bactéria da mesma espécie e não houve o reconhecimento de outras bandas na amostra com o vetor vazio ou com a proteína de *T. cruzi*.



Figura 10: Avaliação da produção de anticorpos anti-LcNTPDase-2 no soro de coelho imunizado. “Dot Blotting” do soro imune (figura superior) e do pré-imune (figura inferior). Nesta análise, 2 μ g de proteína purificada por cromatografia de afinidade em resina de níquel foram imobilizadas em membrana de nitrocelulose. Foi utilizado como anticorpo primário o soro do coelho imunizado ou antes da imunização nas diluições indicadas. Como anticorpo secundário foi usado anti IgG de coelho produzido em cabra, conjugado com peroxidase.

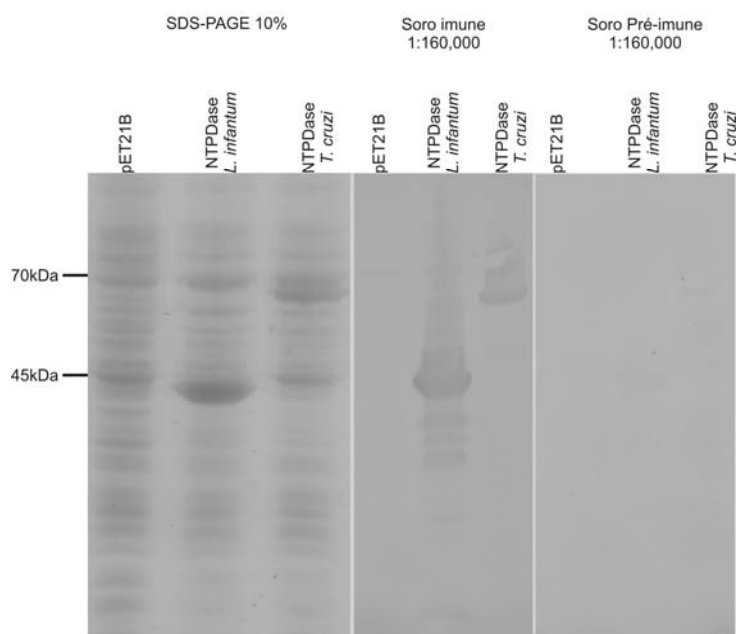


Figura 11: Análise da especificidade do soro imune anti-LcNTPDase-2. Amostras de extrato protéico de *E. coli* transformada com vetor vazio (pET21b), pET21b-LcNTPDase-2 e pET21b NTPDase de *T. cruzi* foram induzidos por 1h com 0,2mM de IPTG e analisadas por SDS-PAGE 10% corado com Coomassie Blue e Western blotting com soro imune e pré-imune(1:160,000). Como anticorpo secundário foi utilizado Anti IgG de coelho conjugado com FITC (1:8000) A revelação foi feita por fluorescência do FITC excitado à 472nm. Todas as canaletas possuem a mesma quantidade de células (DO₆₀₀=3).

5.4 ANÁLISE DA PREFERÊNCIA PELO SUBSTRATO

A LcNTPDase-2 dos corpos de inclusão purificada como descrito no item 4.5 de “Material e Métodos” e com o estado de pureza mostrado na figura 9B, foi analisada quanto à capacidade de hidrolisar nucleotídeos tri e difosfatados, característica da atividade de apirases desta família de proteínas. Os nucleotídeos ATP, ADP, GTP, GDP, UTP e UDP foram testados na presença de cálcio ou magnésio, já que as NTPDases são dependentes geralmente de um desses cátions divalentes. A enzima mostrou uma preferência absoluta pelo cofator magnésio, não mostrando nenhuma atividade quando na presença de cálcio (tabela 1). Além disso, houve uma preferência pelos substratos ADP, GTP, e UDP, sendo o GDP muito pouco hidrolisado, enquanto o ATP e o UTP não sofreram hidrólise detectável pela metodologia colorimétrica utilizada (tabela 1). A enzima mostrou uma atividade linear durante o período de uma hora, com $R = 0,9703$ (figura 12).

Tabela 1: Análise da preferência pelo substrato. A atividade enzimática foi realizada em tampão contendo 50mM de Tris pH8,0; 50mM de HEPES pH8,0; 3mM de $MgCl_2$ ou $CaCl_2$; 116mM de NaCl ; 5,4mM de KCl e 2,5mM do nucleotídeo indicado. A reação foi disparada com $1\mu g$ de proteína. Os desvios representam a média de três experimentos independentes.

Substrato	(nmol Pi/30min/ μg)
ATP Ca^{2+}	0.00 \pm 0.00
ATP Mg^{2+}	0.00 \pm 0.00
ADP Ca^{2+}	0.00 \pm 0.00
ADP Mg^{2+}	2.94 \pm 0.93
GTP Ca^{2+}	0.00 \pm 0.00
GTP Mg^{2+}	3.08 \pm 0.66
GDP Ca^{2+}	0.00 \pm 0.00
GDP Mg^{2+}	0.03 \pm 0.05
UTP Ca^{2+}	0.00 \pm 0.00
UTP Mg^{2+}	0.00 \pm 0.00
UDP Ca^{2+}	0.00 \pm 0.00
UDP Mg^{2+}	2.63 \pm 0.21

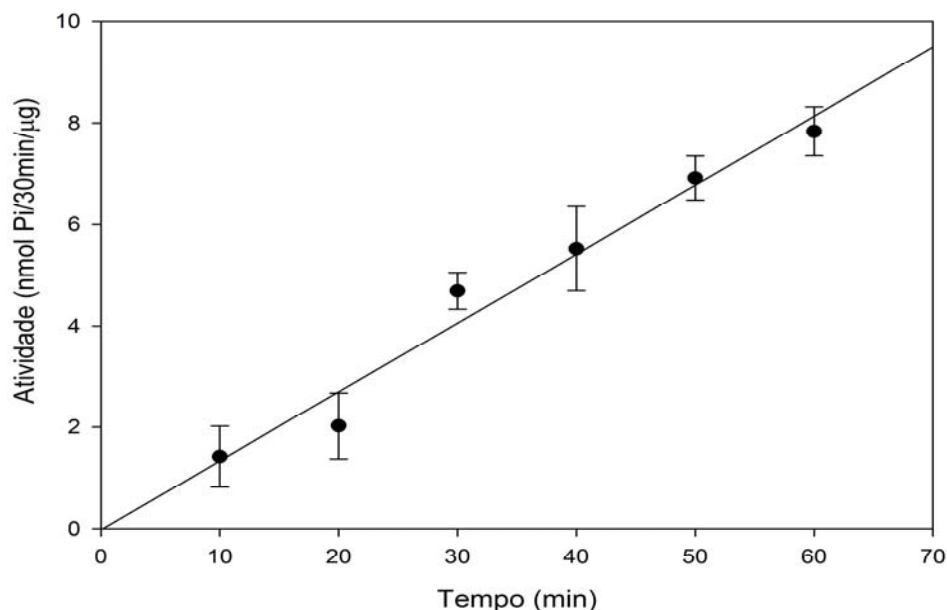


Figura 12: Análise da linearidade da atividade UDPásica da LcNTPDase-2. A reação foi realizada no mesmo tampão do ensaio de especificidade, tendo como substrato o UDP. Os desvios representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata. O método de dosagem de fosfato livre utilizado foi o verde malaquita.

Apesar da LcNTPDase-2 hidrolisar GTP, somente os nucleotídeos de ATP, ADP, UTP e UDP têm papel conhecido no processo de sinalização celular. É necessário o estudo do K_m para que possamos sugerir qual o tipo de receptor poderia ser ativado, porém, podemos supor que a hidrólise de ADP poderia impedir a ativação dos receptores P2Y₁, P2Y₁₂ e P2Y₁₃. Esses receptores P2 estão envolvidos com mediadores de inflamação TNF- α , IL-1 e IL-2. Além disso, a hidrólise do ADP forneceria substrato para a ecto-5'-nucleotidase, que hidrolisaria o AMP até adenosina. Os receptores A2 são ativados por adenosina, e quando ativados, possuem efeitos antiinflamatórios como a inibição de TNF- α , IL-6 e IL-8 (Abbracchio *et al.*, 1998). A diferença de resposta à infecção experimental por *Leishmania* já foi atribuída à capacidade de hidrolisar nucleotídeos, com uma diminuição na produção de interferon- γ e TNF nos linfonodos, menor proliferação de células do baço e dos centros germinativos (Maioli *et al.*, 2004). Sendo assim, a *L. infantum chagasi* poderia ter seu mecanismo de infecção facilitado por ser capaz de regular a inflamação através das NTPDases.

Além disso, esses parasitos são incapazes de sintetizar purinas, e se aproveitam da via de salvação para satisfazerem essa necessidade. Estudos com a NTPDase de *Toxoplasma gondii* mostraram que a inibição dessa enzima diminui a replicação desses parasitos e pode ter um importante efeito na proteção contra a infecção (Tan *et al.*, 2010).

5.5 INFLUÊNCIA DO PH NA ATIVIDADE NUCLEOTIDÁSICA

A fim de avaliar a influência do pH na atividade de hidrólise de nucleotídeos pela LcNTPDase-2, foi realizada a dosagem da atividade enzimática de UDP em diferentes faixas de pH, variando de 5,5 a 9,0. A figura 13 mostra como a atividade enzimática é afetada pelo pH. A LcNTPDase-2 expressa em sistema bacteriano possui um pH de atividade máxima entre 7,0 e 8,0, com pico de atividade próximo de 8,0. A atividade aumenta progressivamente até o valor de pH de 7,5 e depois começa a decrescer lentamente. Somente o nucleotídeo UDP foi utilizado nesse teste, pois a enzima mostrou-se incapaz de hidrolisar o mesmo nucleotídeo trifosfatado.

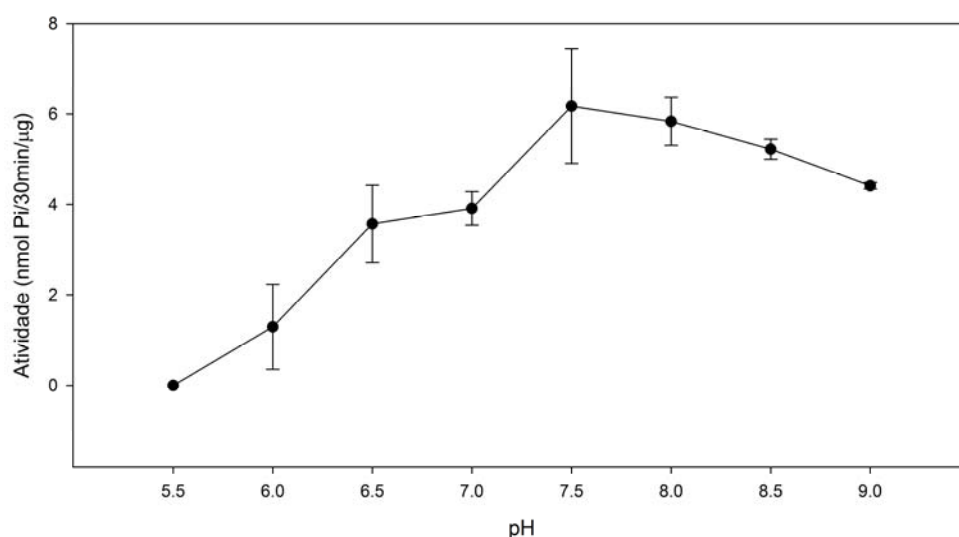


Figura 13 Atividade UDPásica da LcNTPDase-2 na dependência do pH. A reação foi realizada em tampão contendo 50mM de MES; 50mM de Tris; 50mM de HEPES; 3mM de MgCl₂; 116mM de NaCl; 5,4mM de KCl e 2,5mM de nucleotídeo. O pH foi ajustado para cada reação conforme indicado na figura. Os desvios representam a média de três experimentos independentes realizados

5.6 TESTE DE INIBIDORES DE NUCLEOTIDASES SOBRE A ATIVIDADE UDPÁSICA DA LCNTPDASE-2

Com o objetivo de demonstrar mais uma vez, de forma direta, que a LcNTPDase-2 é uma apirase genuína, nós procedemos com o teste de vários inibidores parciais tanto de E-NTPDases como de outras enzimas. Para este ensaio foram utilizados, ARL 67156 (6-N,N-Diethyl-b-c-dibromomethylene-D-adenosine-5-triphosphate), considerado inibidor seletivo de ecto-ATPase e capaz de inibir parcialmente a NTPDase-1 de *T. cruzi* (Crack et al., 1995; Santos et al., 2009); Gadolínio, um lantanídeo relacionado com a ação do ATP intra e extracelular e capaz de inibir a Ecto-NTPDase em órgão elétrico de *Torpedo* (Escalada et al., 2004); Suramina, um composto naftilurea polisulfonado que já foi demonstrado ser inibidor parcial da Ecto-ATPase e NTPDase-1 de *T. cruzi* (Bisaggio et al., 2003; Santos et al., 2009); Azida Sódica, inibidor de ATPase mitocondrial, mas também capaz de inibir parcialmente a ecto-ATPase de *T. cruzi* (Fietto et al., 2004) e Molibdato de Amônio, um inibidor da 5'-nucleotidase e de fosfatases ácidas (Gottlieb et al., 1983), nas concentrações indicadas na figura 14. Não houve inibição significativa na atividade UDPásica pela ação do ARL 67156 300 μ M ($p=0,134$), Suramina 100 μ M ($p=0,857$) e a Azida Sódica 2 μ M ($p=0,290$). Porém, os ensaios com a enzima na presença do Gadolínio 300 μ M e do Molibdato de Amônio 3 μ M apresentaram uma inibição de 97% ($p<0,001$) e 58,4% ($p=0,002$) respectivamente.

Para a enzima recombinante de *T. cruzi* o composto que apresenta a maior inibição é a suramina 100 μ M, enquanto que o gadolínio 300 μ M inibiu somente cerca de 20% (Santos, et al., 2009). É importante ressaltar que este experimento foi realizado com nucleotídeo de adenina, o que é o mais comum na literatura, enquanto que os nossos testes foram feitos com o nucleotídeo de uracila. Fato interessante foi a inibição pelo molibdato de amônio, que já foi mostrado na literatura como inibidor da 5'-nucleotidase (Gottlieb et al., 1983) ou ecto-fosfatases (Bakalara et al., 2000).

A inibição parcial da atividade enzimática na presença de molibdato de amônio foi uma surpresa, uma vez que até então não se sabia da capacidade desse composto em inibir alguma NTPDase. Para descartarmos a possibilidade de nossa preparação de proteína possuir qualquer tipo de fosfatase, foi realizado um ensaio com *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP), um substrato de fosfatases ácidas e alcalinas, para o qual não houve qualquer atividade detectável.

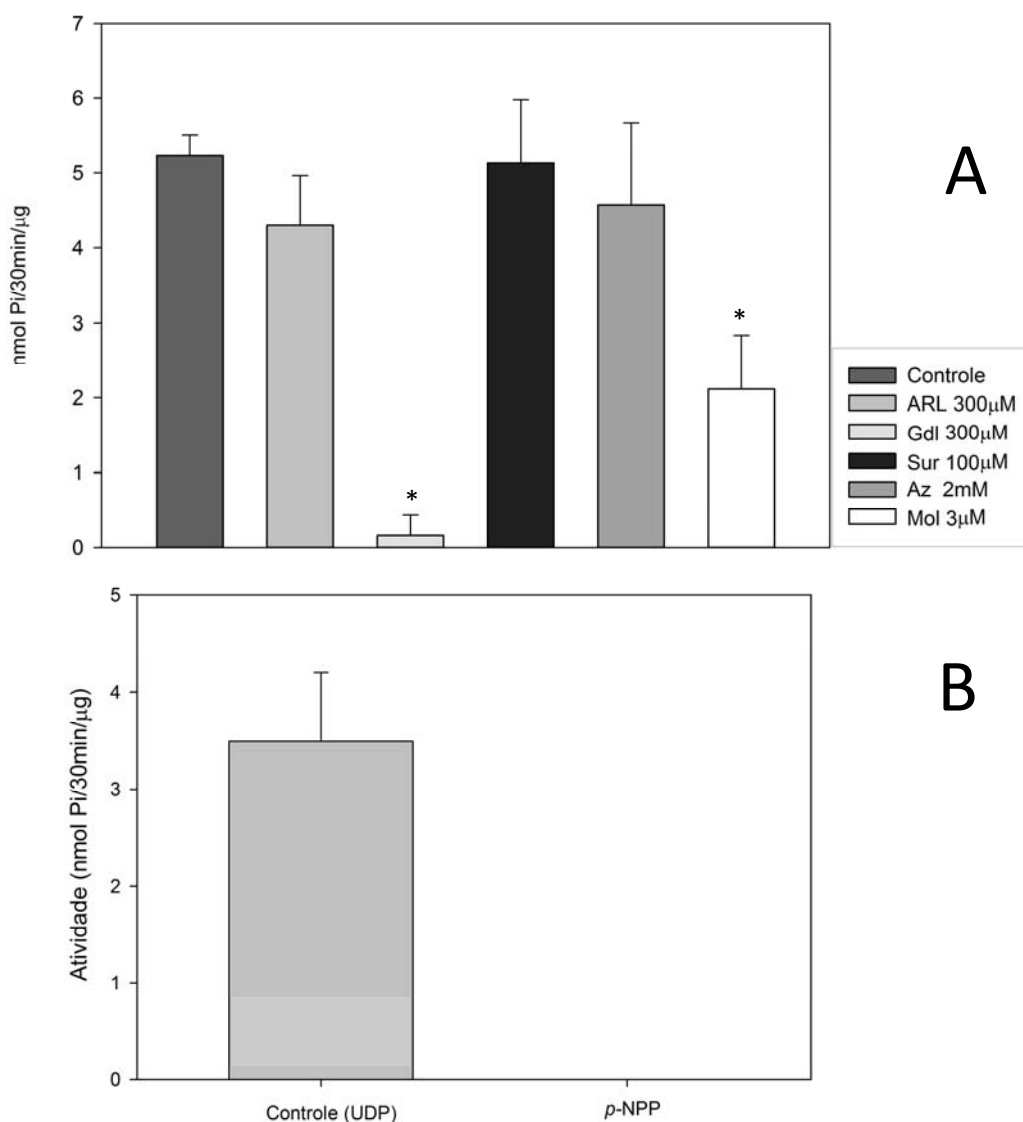


Figura 14 Ensaio de atividade UDPásica da LcNTPDase na presença de inibidores. ARL 67156 (ARL); Gadolínio (Gdl); Suramina (Sur); Azida sódica (Az); e Molibdato de Amônio (Mol) (A); Atividade enzimática tendo como substrato UDP (controle) e *p*-NPP(B). Os desvios representam a média de três experimentos independentes feitos em triplicata. Foi realizado o teste T para avaliar a significância dos dados.

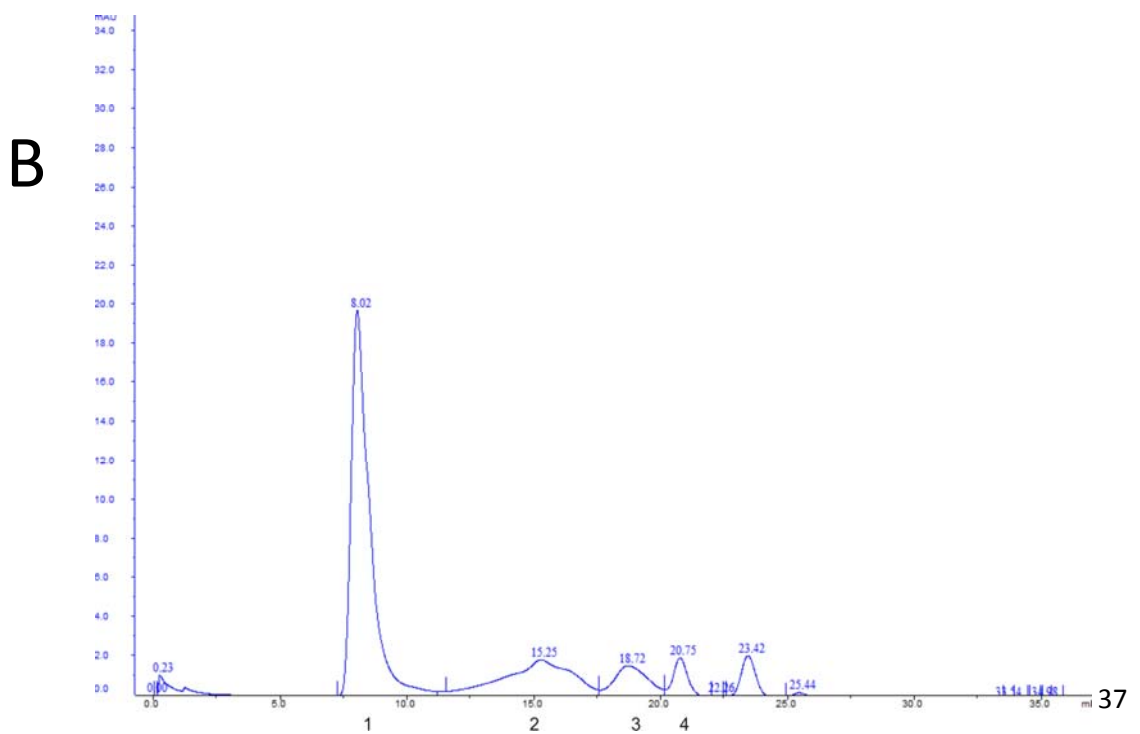
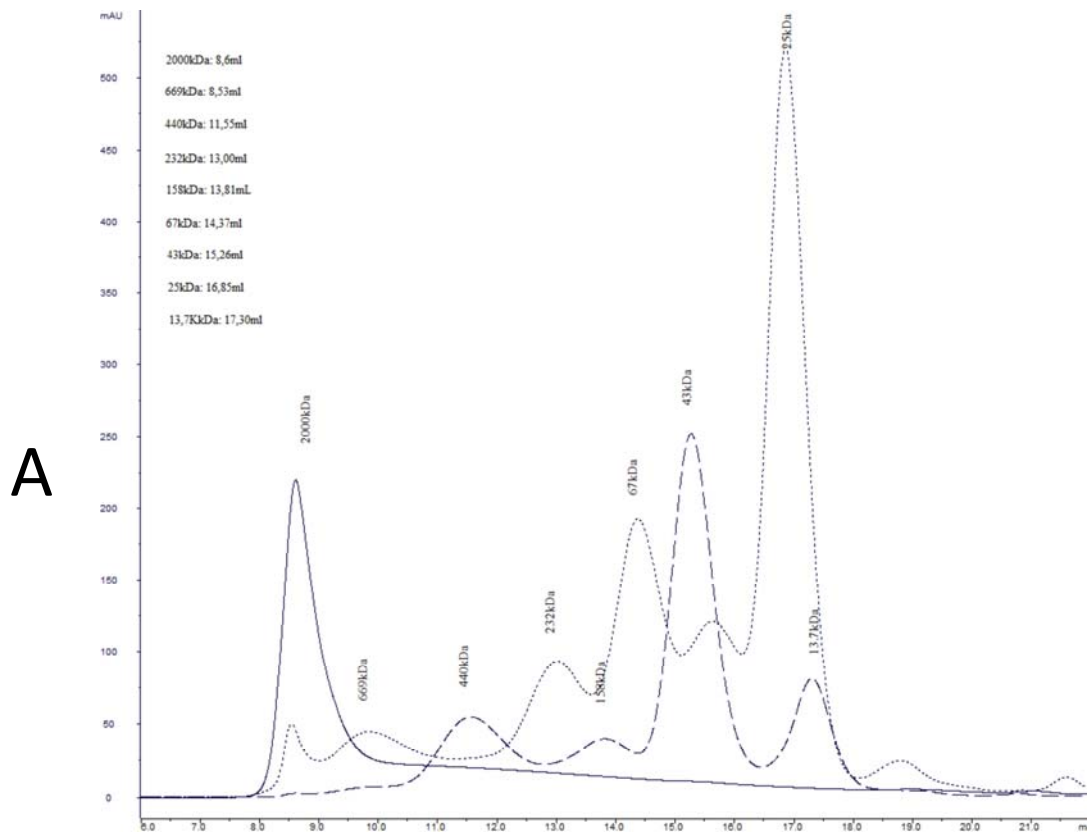
5.7 ESTUDO DO ESTADO DE OLIGOMERIZAÇÃO DA LcNTPDASE-2 PURIFICADA DE CORPOS DE INCLUSÃO

A proteína parcialmente purificada dos corpos de inclusão foi separada na coluna de exclusão molecular Superdex 200 10/300GL da GE Healthcare®. Para verificar a homogeneidade e o estado de oligomerização da LcNTPDase-2 foram avaliados os picos obtidos na exclusão molecular. O primeiro pico (pico 1), que apresentou a maior concentração de proteína, possuía aproximadamente 600kDa e poderia ser um oligômero ou um agregado protéico. O pico seguinte (pico 2) apresentou-se exatamente do tamanho do monômero, de 45kDa (figura 15). No total, quatro picos foram observados, sendo que dois (picos 3 e 4) apresentaram tamanho inferior ao do monômero (menos de 13kDa) e um deles (pico 2) apresentou o tamanho do monômero. O SDS-PAGE, mesmo corado com prata, não conseguiu detectar a proteína nos picos 2, 3 e 4. Os métodos de concentração de proteína utilizados não foram suficientes para visualizar a proteína no gel e não foi possível dosar a concentração protéica pelo método de Bradford (figura 16).

Foram realizados ensaios de atividade UDPásica em microplaca e a atividade ocorreu por 30 minutos em um volume de 80 μ L, sendo que após a adição do nucleotídeo e do tampão, o volume final é completado com água, descontando-se o volume de proteína. Com a concentração de proteína extremamente baixa, nós completamos o volume para 80 μ L com a amostra.

A fim de verificar quais os picos seriam referentes a proteína LcNTPDase-2 em sua forma ativa, os picos 1, 2, 3 e 4 foram analisados quanto a atividade UDPásica. Mesmo com a amostra extremamente diluída foi possível ver uma atividade muito alta no pico 2, pois a quantidade de proteína na amostra foi indetectável pelo método de Bradford, e mesmo assim, a atividade foi similar ao que temos com 1 μ g de proteína (figura 17). O pico 1 não apresentou atividade devido ao estado de oligomerização. Com o intuito de desfazer esse oligômero, nós adicionamos 10mM de DTT na reação, e houve

uma aumento na atividade. Esse resultado sugere que a enzima possui maior atividade na forma de monômero e sua atividade pode ser ainda muito maior, uma vez que não houve qualquer controle nas reações de especificidade e sobre qual natureza estrutural da LcNTPDase-2 estaria em maior concentração nas reações até então realizadas.



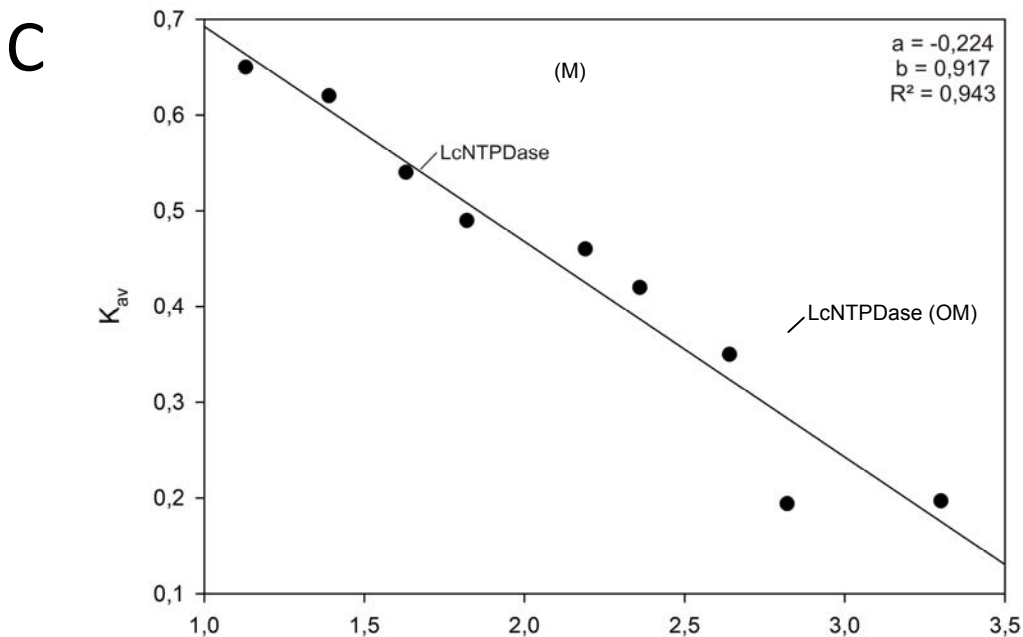


Figura 15: Análise do estado de oligomerização da LcNTPDase-2 purificada de corpos de inclusão. Perfil cromatográfico das proteínas bludextran (2000kDa), tireoglobulina (669kDa) e aldolase (158kDa); 7mg/mL de albumina (67kDa) e ovoalbumina (43kDa), 5mg/mL de catalase (232kDa); 3mg/mL de quimiotripsinogênio A (25kDa); 0,5mg/mL de ferritina (440kDa) e 1mg/mL de ribonuclease A (13,7kDa) usadas na curva padrão (A); Perfil dos picos obtidos com a LcNTPDase-2 parcialmente purificada (B); Curva padrão obtida a partir das informações obtidas com a figura A, evidenciando a proteína monomérica (LcNTPDase M) e oligomérica (LcNTPDase OM) (C).

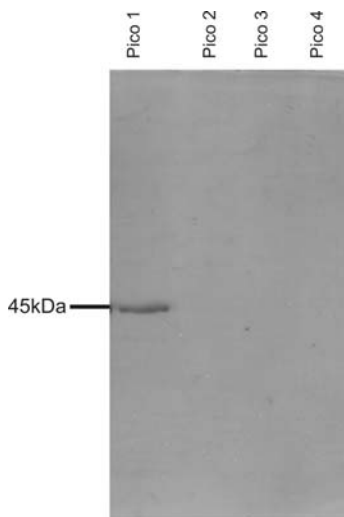


Figura 16: SDS-PAGE 10% corado com prata das amostras coletadas após a cromatografia de exclusão molecular.

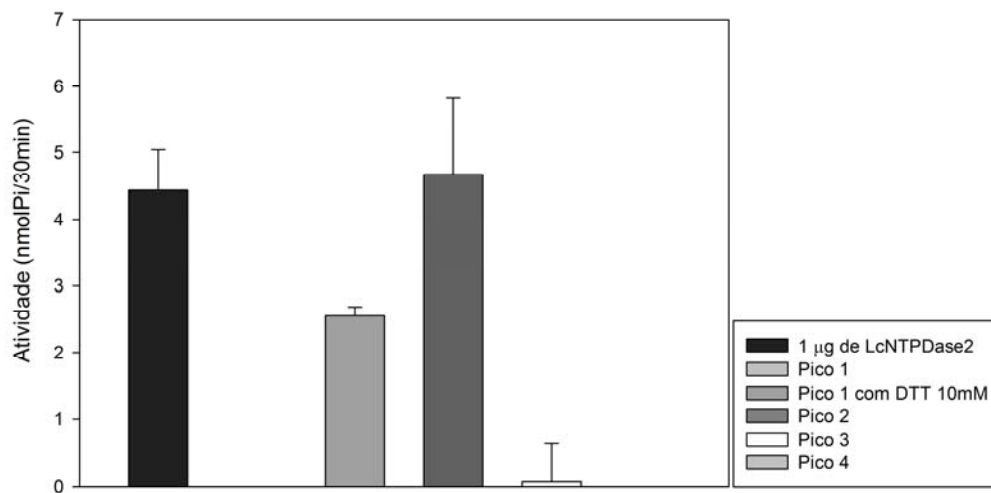


Figura 17: Atividade enzimática dos picos da exclusão molecular. A atividade foi realizada em tampão pH8,0 contendo 50mM de glicina 50mM de ácido acético, 50mM de MOPS; 3mM de MgCl₂; 116mM de NaCl ; 5,4mM de KCl e 2,5mM de UDP. A quantidade de proteína adicionada para atividade dos picos 1, 2, 3 e 4 foi indetectável.

6. CONCLUSÕES

A LcNTPDase-2 realmente é uma apirase, com suas cinco regiões conservadas e hidrolisa tanto nucleotídeos tri quanto difosfatados. Nas condições utilizadas para a produção dessa proteína, ela mostrou preferir como substrato ADP, GTP e UDP. Devido à importância dos nucleotídeos de Adenina e Uracila na sinalização purinérgica, e de acordo com a preferência desta enzima, pode ser que ela module o sistema imune do hospedeiro por diminuição da resposta inflamatória. Uma novidade neste experimento foi a inibição da atividade por molibdato de amônio, até então tido como inibidor de fosfatases ácidas e alcalinas. Além disso, essa proteína mostrou-se mais ativa na forma de monômero, podendo ser que os oligômeros sejam somente grandes agregados protéicos.

As NTPDases têm se mostrado como enzimas importantes na virulência e na replicação de parasitos. O estudo dessa família de proteínas pode ajudar a desenvolver novas abordagens nas terapias já existentes, ou até mesmo se tornar uma nova terapia. O estudo da estrutura cristalográfica irá auxiliar no desenho racional de novas drogas e no melhor entendimento de como essas enzimas funcionam.

7. REFERÊNCIAS

Abbracchio, M. P. e G. Burnstock. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol*, v.78, n.2, Oct, p.113-45. 1998.

Asai, T., S. Miura, L. D. Sibley, H. Okabayashi e T. Takeuchi. Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem*, v.270, n.19, May 12, p.11391-7. 1995.

Bakalara, N., X. Santarelli, C. Davis e T. Baltz. Purification, cloning, and characterization of an acidic ectoprotein phosphatase differentially expressed in the infectious bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem*, v.275, n.12, Mar 24, p.8863-71. 2000.

Bendtsen, J. D., H. Nielsen, G. Von Heijne e S. Brunak. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, v.340, n.4, Jul 16, p.783-95. 2004.

Bennet, D. W. e A. N. Drury. Further observations relating to the physiological activity of adenine compounds. *J Physiol*, v.72, n.3, Jul 6, p.288-320. 1931.

Berreto-Pinho, M., C. E. Peres-Sampaio, P. P. Chrispim, R. Belmont-Firpo, A. P. Lemos, A. Martiny, M. A. Vannier-Santos e J. R. Meyer-Fernandes. 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., C. E. Peres-Sampaio, J. R. Meyer-Fernandes e T. Souto-Padron. 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.

Burnstock, G. Purinergic receptors. *J Theor Biol*, v.62, n.2, Oct 21, p.491-503. 1976.

Burnstock, G. Purinergic signalling--an overview. *Novartis Found Symp*, v.276, p.26-48; discussion 48-57, 275-81. 2006.

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

Burnstock, G. e C. Kennedy. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol*, v.16, n.5, p.433-40. 1985.

Chappuis, F., S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R. W. Peeling, J. Alvar e M. Boelaert. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*, v.5, n.11, Nov, p.873-82. 2007.

Chaudry, I. H. Does ATP cross the cell plasma membrane. *Yale J Biol Med*, v.55, n.1, Jan-Feb, p.1-10. 1982.

Collo, G., R. A. North, E. Kawashima, E. Merlo-Pich, S. Neidhart, A. Surprenant e G. Buell. Cloning OF P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J Neurosci*, v.16, n.8, Apr 15, p.2495-507. 1996.

Crack, B. E., C. E. Pollard, M. W. Beukers, S. M. Roberts, S. F. Hunt, A. H. Ingall, K. C. Mckechnie, I. J. Ap e P. Leff. Pharmacological and biochemical

analysis of FPL 67156, a novel, selective inhibitor of ecto-ATPase. *Br J Pharmacol*, v.114, n.2, Jan, p.475-81. 1995.

De Almeida Marques-Da-Silva, E., J. C. De Oliveira, A. B. Figueiredo, D. De Souza Lima Junior, C. M. Carneiro, J. L. Rangel Fietto e L. C. Crocco Afonso. Extracellular nucleotide metabolism in Leishmania: influence of adenosine in the establishment of infection. *Microbes Infect*, v.10, n.8, Jul, p.850-7. 2008.

De Souza, M. C., E. A. De Assis, R. S. Gomes, A. Marques Da Silva Ede, M. N. Melo, J. L. Fietto e L. C. Afonso. The influence of ecto-nucleotidases on Leishmania amazonensis infection and immune response in C57B/6 mice. *Acta Trop*, v.115, n.3, Sep, p.262-9. 2010.

Desjeux, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol*, v.14, n.5, Sep-Oct, p.417-23. 1996.

Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v.27, n.5, Sep, p.305-18. 2004.

Drury, A. N. e A. Szent-Gyorgyi. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol*, v.68, n.3, Nov 25, p.213-37. 1929.

Escalada, A., P. Navarro, E. Ros, J. Aleu, C. Solsona e M. Martin-Satue. Gadolinium inhibition of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity in Torpedo electric organ. *Neurochem Res*, v.29, n.9, Sep, p.1711-4. 2004.

Fietto, J. L., R. Demarco, I. P. Nascimento, I. M. Castro, T. M. Carvalho, W. De Souza, M. T. Bahia, M. J. Alves e S. Verjovski-Almeida. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of Trypanosoma cruzi. *Biochem Biophys Res Commun*, v.316, n.2, Apr 2, p.454-60. 2004.

Fiske, C. H. e Y. Subbarow. Phosphorus Compounds of Muscle and Liver. *Science*, v.70, n.1816, Oct 18, p.381-2. 1929.

Fu, J., Q. Yu, W. Guo, C. He, G. Burnstock e Z. Xiang. P2X receptors are expressed on neurons containing luteinizing hormone-releasing hormone in the mouse hypothalamus. *Neurosci Lett*, v.458, n.1, Jul 10, p.32-6. 2009.

Gottlieb, M. e D. M. Dwyer. Evidence for distinct 5'- and 3'-nucleotidase activities in the surface membrane fraction of *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol*, v.7, n.4, Apr, p.303-17. 1983.

Grinthal, A. e G. Guidotti. Dynamic motions of CD39 transmembrane domains regulate and are regulated by the enzymatic active site. *Biochemistry*, v.43, n.43, Nov 2, p.13849-58. 2004.

Herbert Zimmermann. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Development Research*, v.52, n.1-2, p.44-56. 2001.

Jacobson, K. A., M. F. Jarvis e M. Williams. Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. *J Med Chem*, v.45, n.19, Sep 12, p.4057-93. 2002.

Kamhawi, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol*, v.22, n.9, Sep, p.439-45. 2006.

La Sala, A., D. Ferrari, F. Di Virgilio, M. Idzko, J. Norgauer e G. Girolomoni. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J Leukoc Biol*, v.73, n.3, Mar, p.339-43. 2003.

Laskowski, R. A., M. W. Macarthur, D. S. Moss e J. M. Thornton. {PROCHECK}: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, v.26, p.283-291. 1993.

Lustig, K. D., A. K. Shiau, A. J. Brake e D. Julius. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.90, n.11, Jun 1, p.5113-7. 1993.

Maioli, T. U., E. Takane, R. M. Arantes, J. L. Fietto e L. C. Afonso. Immune response induced by New World Leishmania species in C57BL/6 mice. *Parasitol Res*, v.94, n.3, Oct, p.207-12. 2004.

Marr, J. J., R. L. Berens e D. J. Nelson. Purine metabolism in Leishmania donovani and Leishmania braziliensis. *Biochim Biophys Acta*, v.544, n.2, Dec 1, p.360-71. 1978.

Meyer-Fernandes, J. R., J. Saad-Nehme, C. E. Peres-Sampaio, R. Belmont-Firpo, D. F. Bisaggio, L. C. Do Couto, A. L. Fonseca De Souza, A. H. Lopes e T. Souto-Padron. A Mg-dependent ecto-ATPase is increased in the infective stages of Trypanosoma cruzi. *Parasitol Res*, v.93, n.1, May, p.41-50. 2004.

Milpetz, F., P. Argos e B. Persson. TMAP: a new email and WWW service for membrane-protein structural predictions. *Trends Biochem Sci*, v.20, n.5, May, p.204-5. 1995.

Mizumoto, N., T. Kumamoto, S. C. Robson, J. Sevigny, H. Matsue, K. Enyoji e A. Takashima. CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat Med*, v.8, n.4, Apr, p.358-65. 2002.

Nakazawa, K., K. Inoue e S. Koizumi. Facilitation by 5-hydroxytryptamine of ATP-activated current in rat pheochromocytoma cells. *Pflugers Arch*, v.427, n.5-6, Jul, p.492-9. 1994.

North, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*, v.82, n.4, Oct, p.1013-67. 2002.

Ralevic, V. e G. Burnstock. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*, v.50, n.3, Sep, p.413-92. 1998.

Roberts, J. A., C. Vial, H. R. Digby, K. C. Agboh, H. Wen, A. Atterbury-Thomas e R. J. Evans. Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch*, v.452, n.5, Aug, p.486-500. 2006.

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

Sali, A., L. Potterton, F. Yuan, H. Van Vlijmen e M. Karplus. Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER. *Proteins*, v.23, n.3, Nov, p.318-26. 1995.

Sambrook, J., E. F. Fritsch e T. Maniatis. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 1989.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989

Sansom, F. M., P. Riedmaier, H. J. Newton, M. A. Dunstone, C. E. Muller, H. Stephan, E. Byres, T. Beddoe, J. Rossjohn, P. J. Cowan, A. J. D'apice, S. C. Robson e E. L. Hartland. 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.

Sansom, F. M., S. C. Robson e E. L. Hartland. 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., M. A. Possa, M. S. Bastos, P. M. Guedes, M. R. Almeida, R. Demarco, S. Verjovski-Almeida, M. T. Bahia e J. L. Fietto. Influence of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase Activity on Trypanosoma cruzi Infectivity and Virulence. *PLoS Negl Trop Dis*, v.3, n.3, p.e387. 2009.

Seifert, R., K. Wenzel, F. Eckstein e G. Schultz. Purine and pyrimidine nucleotides potentiate activation of NADPH oxidase and degranulation by chemotactic peptides and induce aggregation of human neutrophils via G proteins. *Eur J Biochem*, v.181, n.1, Apr 15, p.277-85. 1989.

Shaw, J. J. Further thoughts on the use of the name Leishmania (Leishmania) infantum chagasi for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.101, n.5, Aug, p.577-9. 2006.

Tan, F., X. Hu, C. W. Pan, J. Q. Ding e X. G. Chen. Monoclonal antibodies against nucleoside triphosphate hydrolase-II can reduce the replication of Toxoplasma gondii. *Parasitol Int*, v.59, n.2, Jun, p.141-6. 2010.

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

Valera, S., N. Hussy, R. J. Evans, N. Adami, R. A. North, A. Surprenant e G. Buell. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature*, v.371, n.6497, Oct 6, p.516-9. 1994.

Van Rhee, A. M., B. Fischer, P. J. Van Galen e K. A. Jacobson. Modelling the P2Y purinoceptor using rhodopsin as template. *Drug Des Discov*, v.13, n.2, Nov, p.133-54. 1995.

Vasconcelos, E. G., S. T. Ferreira, T. M. Carvalho, W. Souza, A. M. Kettlun, M. Mancilla, M. A. Valenzuela e S. Verjovski-Almeida. Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from Schistosoma mansoni. Immunological cross-reactivities with potato apyrase and

Toxoplasma gondii nucleoside triphosphate hydrolase. *J Biol Chem*, v.271, n.36, Sep 6, p.22139-45. 1996.

Vial, C., A. B. Tobin e R. J. Evans. G-protein-coupled receptor regulation of P2X1 receptors does not involve direct channel phosphorylation. *Biochem J*, v.382, n.Pt 1, Aug 15, p.101-10. 2004.

Vivian, J. P., P. Riedmaier, H. Ge, J. Le Nours, F. M. Sansom, M. C. Wilce, E. Byres, M. Dias, J. W. Schmidberger, P. J. Cowan, A. J. D'apice, E. L. Hartland, J. Rossjohn e T. Beddoe. 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.

Von Kugelgen, I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther*, v.110, n.3, Jun, p.415-32. 2006.

Wang, C. M., Y. Y. Chang e S. H. Sun. Activation of P2X7 purinoceptor-stimulated TGF-beta 1 mRNA expression involves PKC/MAPK signalling pathway in a rat brain-derived type-2 astrocyte cell line, RBA-2. *Cell Signal*, v.15, n.12, Dec, p.1129-37. 2003.

Winbury, M. M., D. H. Papierski, M. L. Hemmer e W. E. Hambourger. Coronary dilator action of the adenine-ATP series. *J Pharmacol Exp Ther*, v.109, n.3, Nov, p.255-60. 1953.

Wirkner, K., D. Stanchev, L. Koles, M. Klebingat, H. Dihazi, G. Flehmig, C. Vial, R. J. Evans, S. Furst, P. P. Mager, K. Eschrich e P. Illes. Regulation of human recombinant P2X3 receptors by ecto-protein kinase C. *J Neurosci*, v.25, n.34, Aug 24, p.7734-42. 2005.

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.

Zebisch, M. e N. Strater. 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.

8. ANEXOS



Anexo 1: Alinhamento Múltiplo das NTPDases-1 e NTPDase-2 das espécies de *Leishmania*. À frente das seqüência se encontram os nomes das enzimas e das espécies as quais correspondem. No alinhamento, as letras representam os aminoácidos e as cores de cada letra representam as características físico-químicas de cada aminoácido. As regiões destacadas em vermelho evidenciam as possíveis regiões transmembrana e as destacadas em azul indicam os possíveis sítios de N-glicosilação. As barras verdes indicam as ACRs presente nessa família de enzimas. A tesoura indica um possível sítio de proteólise presente em um peptídeo sinal nas isoformas GDPase.