

MATHEUS SILVA E BASTOS

EXPRESSÃO DAS NTPDases 1 E 2 DE *Leishmania infantum chagasi* EM SISTEMA BACTERIANO E CÉLULA DE MAMÍFERO E ESTUDO DE SUAS INFLUÊNCIAS NA INFECÇÃO DE CÉLULAS RAW 264.7 E NA EXPRESSÃO DE PURINO RECEPTORES P2

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

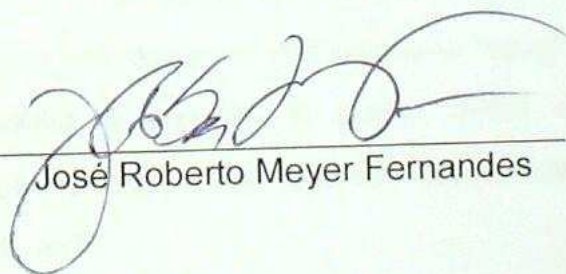
VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

MATHEUS SILVA E BASTOS

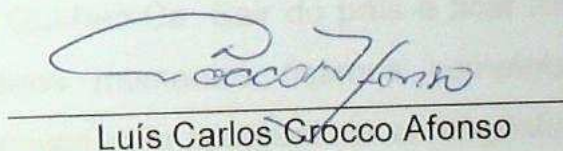
EXPRESSÃO DAS NTPDases 1 e 2 de *Leishmania infantum chagasi* EM SISTEMA BACTERIANO E CÉLULA DE MAMÍFERO E ESTUDO DE SUA INFLUÊNCIA NA INFECÇÃO DE CÉLULAS RAW 264.7 E NA EXPRESSÃO DE PURINO RECEPTORES P2

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

APROVADA: 14 de maio de 2014.



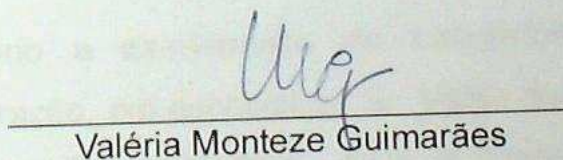
José Roberto Meyer Fernandes



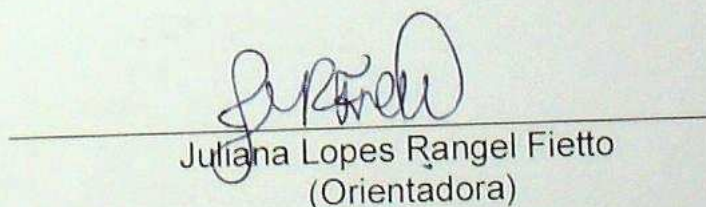
Luís Carlos Crocco Afonso



Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa



Valéria Monteze Guimarães



Juliana Lopes Rangel Fietto
(Orientadora)

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

T

B327e Bastos, Matheus Silva e, 1983-
2014 Expressão das NTPDases 1 e 2 de leishmania infantum
chagasi em sistema bacteriano e célula de mamífero e estudo de
suas influências na infecção de células raw 264.7 e na expressão
de purino receptores P2 / Matheus Silva e Bastos. – Viçosa, MG,
2014.

xi, 88f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.80-86.

1. Leishmaniose visceral. 2. Enzimas. 3. NTPDases.
4. Expressão heteróloga. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de
Pós-graduação em Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 616.9364

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me ajudaram diretamente ou indiretamente durante esta etapa da minha vida.

Agradeço a professora Juliana Lopes Rangel Fietto pela orientação e amizade. Sei que sou uma pessoa tensa e tenho um gênio difícil, mas garanto que sempre dou o meu melhor nas tarefas que me proponho a fazer.

Agradeço o professor Luciano Gomes Fietto que considero como meu segundo orientador e grande amigo. Não existe pessoa melhor para discutir problemas nos experimentos ou na vida. O professor Luciano sempre transmite muita tranquilidade o que ajuda muito nos momentos de dificuldade.

Agradeço o professor Jean Sévigny que me recebeu em seu laboratório em Quebec-Ca. Durante meu estagio com o grupo do professor Jean pude visualizar os experimentos de um ponto de vista diferente. Com certeza esta foi uma das melhores oportunidades que já tive até o momento.

À todos amigos que me ajudaram, com certeza todos foram de grande ajuda, principalmente no período que fiquei em Quebec-Ca. Sair do país e ficar longe da família e amigos é muito difícil e certos momentos ficamos completamente desesperado, mas quando temos bons amigos para compartilhar as angústias tudo dá certo.

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 a Izadora, Joice e Lucas que contribuíram neste trabalho, sem ajuda deles com certeza este trabalho não seria possível.

À Universidade Federal de Ouro Preto e a cidade de Ouro Preto que fizeram de mim o que sou hoje.

À Universidade Federal de Viçosa e ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola e ao 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.

Ao CNPq pela bolsa que financiou o meu trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. LEISHMANIOSE.....	1
1.2. E-NTPDases e purino receptores.....	3
2. ESTADO DA ARTE.....	5
2.1. Leishmaniose Visceral Humana (LV)	5
2.2. Leishmaniose Visceral Canina (LVC).....	8
2.3. Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase	10
2.4. E-NTPDases e sinalização purinérgica do sistema imune	15
2.5. E-NTPDases de Patógenos	19
2.6. Correlação entre Ecto-Nucleotidase e virulência de <i>T. cruzi</i> e <i>Leishmania</i>	21
3. OBJETIVOS.....	23
4. Capítulo 1:	25
Avaliação da atividade enzimática das LicNTPDases em diferentes: condições de armazenamento, protocolos de renaturação e sistemas de expressão	25
4.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS	26
5. MATERIAL E MÉTODOS	27
5.1. Organismos	27
5.2. Meios de culturas usados.....	27
5.3. Obtenção de células competentes e transformação.....	27
5.4. Clonagem da LicNTPDase-1 e 2 de <i>L. infantum chagasi</i> no vetor pET21b de expressão em <i>E. coli</i>	28
5.5. Clonagem da LicNTPDase-1 e 2 de <i>L. infantum chagasi</i> no vetor pcDNA3 de expressão em célula de mamífero	29
5.6. Expressão das LicNTPDases recombinantes em sistema bacteriano.....	31
5.7. Purificação das LicNTPDase-1 e 2 recombinante expressas em sistema bacteriano.....	31
5.8. Renaturação das proteínas purificadas	33
5.8.1. Protocolo padrão	33
5.8.2. Renaturação segundo (Manque, 2012) com modificações	33
5.8.3. Renaturação segundo (Murphy, 2003 e Manque, 2012) com adaptações.....	33
5.9. Dosagem de atividade nucleotidásica das Lic NTPDases expressas em <i>E. coli</i>	34
5.10. Testes de expressão das LicNTPDases nas células COS-7.....	34
5.11. Obtenção de extrato de proteína de células COS-7 para teste de atividade....	35

5.12. Dosagem de atividade nucleotidásica das Lic NTPDases expressas em células COS-7	36
5.13. Quantificação de proteína	37
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
Renaturação segundo (Murphy, 2003 e Manque, 2012) com adaptações	39
7. CONCLUSÕES	52
8. CAPITULO 2:	53
Avaliação do efeito das LicNTPDases recombinantes na expressão de purino receptores P2 e na infecção de macrófagos da linhagem RAW 264.7 por <i>L. infantum chagasi</i>	53
8.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS	54
9. MATERIAL E MÉTODOS	55
9.1. Organismos usados nos experimentos	55
9.2. Cultivo de macrófagos	55
9.3. Cultivo de <i>Leishmania</i>	55
9.4. Western blotting com extrato proteico de diferentes espécies de <i>Leishmania</i>	56
9.5. Ensaio de infecção “in vitro”	56
9.6. Avaliação da expressão dos purino receptores por qPCR	57
9.7. Ensaio de Ligação das LicNTPDases recombinantes em macrófagos	59
9.8. Co-imuno precipitação de proteína ligante das LicNTPDases nos macrófagos	60
10. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
10.1. Detecção das LicNTPDases por western blotting em diferentes espécies de <i>Leishmania</i>	63
10.2. Avaliando a capacidade das LicNTPDases recombinantes de ligar na membrana de macrófagos da linhagem RAW 264.7	65
10.3. Avaliando a capacidade das LicNTPDases recombinantes interferir na infecção feita “in vitro” de macrófagos RAW 264.7 com <i>L. infantum chagasi</i> (cepa M2982)	68
10.4. Busca do ligante das LicNTPDases nos macrófagos	70
10.5. Expressão de receptores P2 em macrófagos tratados com LicNTPDases recombinantes	72
11. CONCLUSÕES	78
12. PERSPECTIVAS FUTURAS RELACIONADAS A ESTE TRABALHO	79
13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
14. ANEXOS	87
14.1. ANEXO 1 – ARTIGO: <i>Leishmania infantum</i> ECTO-NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE DIPHOSPHOHYDROLASE-2 is an APYRASE INVOLVED in MACROPHAGE INFECTION and EXPRESSED in INFECTED DOGS	87
14.2. ANEXO 2 – ARTIGO: TRYPANOSOMA CRUZI NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE DIPHOSPHOHYDROLASE 1 (TCNTPDASE-1) BIOCHEMICAL	

CHARACTERIZATION, IMMUNOLOCALIZATION AND POSSIBLE ROLE IN HOST
CELL ADHESION..... 88

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Distribuição de Leishmaniose Visceral no mundo, dados de 2012 [3]	6
Figura 2: Distribuição de Leishmaniose Visceral nas Américas [19].....	7
Figura 3: Alinhamento entre as cinco ACRs de diversas espécies [18].	11
Figura 4: Família das E-NTPDases de mamíferos e de alguns patógenos: Esta figura demonstra a topologia de membrana e as 5 ACRs (blocos pretos) [18].	12
Figura 5: Arvore filogenética mostrando o agrupamento das apirases de diversos organismos [32].	13
Figura 6: Comparação entre a estrutura da NTPDase de <i>L. pneumophila</i> (cinza) com a estrutura da NTPDase-2 de <i>R.norvegicus</i> (laranja) [35].	14
Figura 7: Topologia de membrana dos receptores P1 e P2 e uma sequência de alguns agonistas que podem ativá-los [52].	16
Figura 8: Agrupamento das NTPDases 1 e 2 de tripanosomatídeos [66].	20
Figura 9: Mapa do vetor de expressão pET21 b (NOVAGEM).	29
Figura 10: Mapa do vetor de expressão pcDNA3 (INVITROGEN).....	30
Figura 11: Estratégia de clonagem usada na clonagem feita em pcDNA3.	30
Figura 12: Teste de armazenamento a 4°C das enzimas purificadas após a renaturação.....	40
Figura 13: Teste de armazenamento a -30°C das enzimas purificadas antes da renaturação.....	42
Figura 14: Dosagem da atividade da LicNTPDase-1 para diferentes substratos.....	44
Figura 15: Dosagem da atividade GTPásica da LicNTPDase-1 em diferentes concentrações de cálcio ou magnésio.	45
Figura 16: Dosagem da atividade da LicNTPDase-2 em diferentes protocolos de renaturação.....	48
Figura 17: Dosagem da atividade das LicNTPDases expressa em COS-7..	51
Figura 18: Western blotting com extrato total de promastigotas de diferentes espécies de <i>Leishmania</i>	64
Figura 19: Ensaio de ligação das LicNTPDases na membrana de macrófagos da linhagem RAW 264.7..	67
Figura 20: Ensaio de infecção de macrófagos RAW 264.7 com <i>L. infantum chagasi</i> na presença ou não das LicNTPDases.	69

Figura 21: Ensaio de co-imunoprecipitação da proteína ligante das LicNTPDases nos macrófagos RAW 264.7..	71
Figura 22: Avaliação da qualidade do RNA total extraído dos macrófagos RAW 264.7.	73
Figura 23: Avaliação da expressão dos purino receptores P2 nos macrófagos RAW 264.7.	75
Tabela 1: Oligos usados para clonagem das LicNTPDases no vetor pcDNA3.	31
Tabela 2: Protocolos de renaturação	39
Tabela 3: Oligos usados no qPCR.	58

RESUMO

BASTOS, Matheus Silva e., D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2014. **Expressão das NTPDases 1 e 2 de *Leishmania infantum chagasi* em sistema bacteriano e de célula de mamífero e estudo de suas influências na infecção de células raw 264.7 e na expressão de purino receptores P2.** Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto. Coorientadores: Márcia Rogéria de Almeida Lamego, Gustavo Costa Bressan e Jean Sévigny.

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 das Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfo Hidrolase 1 e 2 de *Leishmania infantum chagasi* (LicNTPDase-1 e 2), agente etiológico principal da LV no Brasil. As LicNTPDases 1 e 2 fazem parte da família das E-NTPDases, que são enzimas implicadas como fatores de virulência de alguns parasitos. Evidências indicam que as E-NTPDases participam da via de salvação de purinas e da modulação da resposta imune do hospedeiro dependente de nucleotídeos extracelulares. Essas enzimas têm sido apontadas como importantes alvos para o desenvolvimento de novas drogas e vacinas para as leishmanioses, tanto humana quanto canina. Neste trabalho foram feitas análises comparativas da expressão destas enzimas em sistema bacteriano (pET21 b) e em células de mamífero (COS-7). Foram avaliados diferentes protocolos de renaturação, bem como feita a comparação entre a atividade das enzimas em diferentes substratos. Além disto, foi avaliado se as enzimas recombinantes podem participar do mecanismo de adesão dos parasitos em macrófagos e se estas e se estas são capazes de modular a expressão de purino receptores P2. Os resultados demonstram que alterando o protocolo de renaturação das enzimas expressas em bactéria, é possível aumentar a atividade da LicNTPDase-2, mas o mesmo efeito não foi observado para LicNTPDase-1. Já quando é feita a expressão em COS-7 é possível observar um aumento significativo da atividade da LicNTPDase-1. Por outro lado foi possível verificar o mesmo padrão de atividade entre a LicNTPDase-2 expressa em bactéria e expressa em COS-7 o que indica que a renaturação usada na LicNTPDase-2 expressa em *E. coli* é suficiente para atingir o estado nativo similar a que foi observada para a enzima expressa em célula de mamífero.

Ensaio de adesão na presença ou ausência das enzimas recombinantes levou a uma diminuição da infecção em macrófagos da linhagem RAW 264.7. Assim, foi possível confirmar a participação das LicNTPDases na adesão dos parasitos em macrófagos. Adicionalmente foi avaliada a expressão de mRNA de purino receptores P2 nos macrófagos RAW 264.7 na presença ou ausência das enzimas recombinantes. Foi possível verificar também a relação entre a presença destas enzimas e a modulação da expressão de alguns purino receptores P2, onde verificamos um aumento na expressão de P2X₃, P2X₅, P2Y₂ e uma diminuição na expressão de P2Y₁₃ para macrófagos incubados com LicNTPDase-1 e uma diminuição na expressão de P2X₆ e P2X₇ para macrófagos incubados com LicNTPDase 2, quando os macrófagos foram infectados com *Leishmania infantum chagasi*, foi visto aumento na expressão dos receptores P2X₂, P2Y₁₂ e P2Y₁₃, não foi possível verificar alterações para o restante dos receptores.

ABSTRACT

BASTOS, Matheus Silva e., D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April of 2014. **Expression of NTPDase 1 and 2 from *Leishmania infantum chagasi* in bacterial system and mammalian cells. Studies of its influences in infection Raw 264.7 cells and P2 purine receptors expression.** Adviser: Juliana Lopes Rangel Fietto. Co-advisers: Márcia Rogéria de Almeida Lamego, Gustavo Costa Bressan and Jean Sévigny.

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 NTPDase-1 and 2 from *L. infantum chagasi* (LicNTPDases) is the main etiologic agent of VL in Brazil. The LicNTPDase-1 and 2 are part of the E-NTPDase family, enzymes that are implicated as virulence factors of some parasites. They can participate in the purines salvage pathways and in the modulation of host immune response that dependent on extra cellular nucleotides. These enzymes have been indicated important as targets for the development of new drugs and effective vaccines for *Leishmaniasis*. In this work, were did comparative tests between different refolding protocols of the recombinant enzymes as well as comparison between activity of enzymes expressed in *Escherichia coli* and expressed in mammalian cells (COS-7). Moreover, many experiments in macrophages were done to determine if the recombinant enzymes can be involved in adhesion mechanisms of parasites and if these enzyme can modulate the P2 receptor expression. The data demonstrate that changing the refolding protocol was possible to increase the activity of LicNTPDase-2, but the same effect was not observed for LicNTPDase-1, when these enzyme were expressed in bacterial. However, when the expression was done in COS-7 is possible to verify a activity increased of LicNTPDase-1. It was possible to see the same activity level between LicNTPDase-2 expressed in *E. coli* and expressed in COS-7. This result showed that LicNTPDase2 expressed in *E. coli* have a same shape than enzyme expressed in COS-7. This work was also possible to confirm the direct involvement of LicNTPDases in the parasites binding mechanism, showing a dependence of the concentration of recombinant. It was also possible to verify a possible relationship between the presence of these enzymes and modulation of expression of some

purine receptors, macrophage treated with LicNTPDase-1 showed a up expression of mRNA of P2X₃, P2X₅, P2Y₂ and a down expression for P2Y₁₃, when the macrophage was treated with LicNTPDase-2 the P2X₆ and P2X₇ mRNA level decreased and when was checked the mRNA expression of infected macrophage was possible to verify that *L. infantum chagasi* can control the expression of P2X₂, P2Y₁₂ and P2Y₁₃.

1. INTRODUÇÃO

1.1. LEISHMANIOSE

As leishmanioses são enfermidades causadas por pelo menos 20 espécies patogênicas de protozoários flagelados do gênero *Leishmania* (Ross, 1903). As leishmanioses 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*; gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia*). 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 [1].

Estes protozoários apresentam um ciclo de vida heteróximo, 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 localizadas 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 procíclicas poucas horas após a ingestão e a completa diferenciação ocorre após 24-48 horas, estes promastigotas se multiplicam e se diferenciam em promastigota metacíclicas que serão inoculados novamente em um novo hospedeiro vertebrado [1].

As leishmanioses se apresentam sob diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e da resposta do hospedeiro a infecção, sendo basicamente divididas em: forma visceral (forma mais grave da doença), onde o parasito infecta células do fígado, baço e medula óssea, o que pode acarretar em imunossupressão e posteriormente morte do hospedeiro se não tratado; e formas tegumentares, que podem ser subdivididas em muco-cutânea,

cutânea e cutânea difusa. Na leishmaniose muco-cutânea o parasito se aloja em células da mucosa do hospedeiro, podendo causar uma lesão grave na área de infecção. Na leishmaniose cutânea o parasito prolifera na área da picada do flebotomíneo, gerando lesão típica, geralmente ulcerada. Por fim, na leishmaniose cutânea difusa ocorre a disseminação das lesões por metástases, sem que haja ulceração destas lesões.

A *Leishmania chagasi* é hoje considerada espécie sinônima de *L. infantum*, e será citada neste trabalho como *L. infantum chagasi*, a fim de discriminar esta espécie causadora de leishmaniose visceral no Novo Mundo de *L. infantum* principal agente etiológico do Velho Mundo. Dos casos de leishmaniose visceral notificados no mundo, 90% estão concentrados em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão. Além do elevado número de pessoas infectadas, outro fator preocupante é o número de cães infectados nas áreas endêmicas, porque estes animais são um importante reservatório destes parasitos. Portanto, a Leishmaniose Canina (LC) é um importante problema, de saúde pública e animal [2, 3].

Um fator que dificulta o controle desta enfermidade em humano é a LC. 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 [4, 5]. Alguns estudos demonstram que, em áreas endêmicas, o índice de cães infectados é elevado, como por exemplo em Jacobina (Bahia), onde a prevalência de cães infectados com *L. infantum chagasi* chega a 36% [6] e a infecção é mais prevalente entre animais mais jovens. Em Jequié (Bahia), cerca de 6,55 cães em cada 100 são infectados por ano [7]. A urbanização da leishmaniose visceral 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, nestas áreas os cães são principais reservatórios [7].

Existem hoje diversos métodos de diagnóstico para leishmaniose visceral canina e humana, como os métodos de aglutinação direta, imunocromatografia, ELISA e PCR [2]. A organização mundial de saúde considera dois métodos de diagnóstico como apropriados para programas de controle: o teste de aglutinação direta, que usa antígenos de promastigotas para detecção de anticorpos presentes no soro e o teste de imunocromatografia, baseado no antígeno recombinante rK39 [2]. Apesar de existirem estes métodos preconizados, os mesmos apresentam

eficácia variável em diferentes regiões [2]. É visto que, para o diagnóstico no cão existe, no momento, uma grande discrepância entre especificidade e sensibilidade de cada teste, podendo variar conforme o tipo do teste ou conforme o grupo de amostragem usado principalmente quando se trata de cães assintomáticos [2]. Em um trabalho feito com cães de Belo Horizonte-MG, foi demonstrado que em diagnóstico usando os métodos de imuno fluorescência indireta e imuno ensaio enzimático, ocorre reação cruzada com *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis* e *L. braziliensis* [8].

Na busca por métodos de diagnósticos mais rápidos e mais confiáveis, diversos grupos procuram alvos como proteínas de *Leishmania* que sejam espécie-específicas e que possam sanar as dificuldades encontradas atualmente de se ter um antígeno universal confiável, permitindo um melhor controle em áreas endêmicas.

Quanto a vacina, hoje existe apenas duas vacinas contra leishmaniose canina registrada no Ministério da Saúde e comercializadas, mas não existem dados que demonstrem a eficácia desta vacina em programas de saúde pública [3, 9]. Dentro deste contexto as E-NTPDases demonstram ser alvos promissores para o desenvolvimento de drogas, vacinas e diagnósticos contra leishmaniose.

1.2. E-NTPDases e purino receptores

As E-NTPDases são enzimas dependentes de cátions divalentes que hidrolisam nucleotídeos tri e difosfatados, possuem 5 regiões conservadas de apirase e são insensíveis a inibidores de diversas ATPases, como por exemplo as ATPases que estão relacionadas com transporte de íons através da membrana, conhecidas como ATPase do tipo P. As NTPDases também são insensíveis a inibidores de ATPases tipo V que são enzimas relacionadas com o transporte ativo de substâncias nas células, como por exemplo a proto-ATPase e as ATPase do tipo F que são as enzimas relacionadas com a síntese de ATP nas mitocôndrias e cloroplastos [10].

Os nucleotídeos extracelulares são sinalizadores em diversos eventos celulares, incluindo a regulação do sistema imune de mamíferos, atuando sobre os receptores purinérgicos e pirimidinérgicos [11]. 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, como por exemplo, monócitos estimulados com LPS dependem de uma ativação de receptores P2Y₂ e 6 para liberar IL-8 e assim estimular uma migração de neutrófilos, em outro trabalho é visto que a NTPDase-1 de macrófago é importante para a auto-regulação da ativação do receptor P2X₇ [12, 13]. É de se esperar que as outras NTPDases também apresente um papel importante na modulação da ativação deste receptor, bem como dos outros purino receptores. O receptor P2X₇ vem sendo apontado como tendo um papel importante na ativação de células imunes para eliminação de patógenos intracelulares, no entanto é preciso buscar mais conhecimento da participação deste e dos outros receptores nestes processos [14].

As E-NTPDases de *Leishmania* se tornaram um alvo promissor de estudos, tendo sido objeto de patente pelo nosso grupo de pesquisa para uso em vários fins, como diagnóstico, prognóstico, vacinação e desenvolvimento de quimioterápicos [15]. Vários trabalhos recentes demonstraram que as ecto-nucleotidases, incluindo as E-NTPDases, parecem atuar como fatores de virulência em patógenos, inclusive em infecções por *Leishmania* [16-18]. *Leishmania infantum* cepa JPM5 apresenta dois genes codificantes de ENTPDases em seu genoma, denominados como Guanosina difosfatase (gi|146079010) e Nucleosídeo difosfatase (gi|146081774), sendo que, neste projeto, iremos nos referir ao produto deste primeiro gene como LicNTPDase-1 e ao produto do segundo gene como LicNTPDase-2.

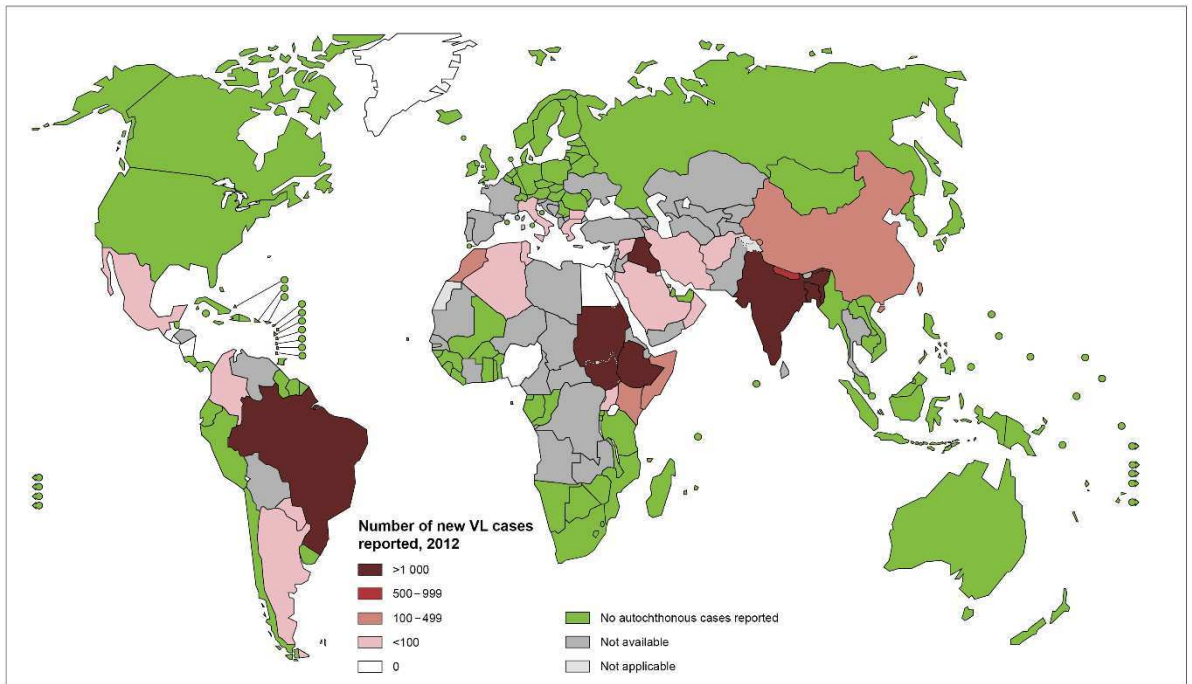
Tendo como foco a leishmaniose visceral canina e possíveis desdobramentos futuros que possam ser usados em imunoterapia, imunização, diagnóstico ou tratamento, neste trabalho foi avaliada a atividade das enzimas recombinantes recuperadas após purificação, melhor condição de estocagem e renaturação comparando atividade das enzimas recombinantes expressas em *E. coli* e expressas em célula COS-7. Estes testes são de grande importância para a utilização biotecnológica destas enzimas. Foi avaliado também o efeito da LicNTPDase-1 e da LicNTPDase-2, durante o processo de infecção e na expressão de purino receptores P2 em macrófagos da linhagem RAW 264.7 in vitro. Tendo em vista que estas enzimas são potencialmente importantes para o processo de infecção, já que elas podem modular a sinalização purinérgica.

2. ESTADO DA ARTE

2.1. Leishmaniose Visceral Humana (LV)

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 [2]. Segundo a Organização Mundial de Saúde, ocorrem 200-400 mil novos casos da doença anualmente, sendo que mais de 20 mil pessoas morrem a cada ano e dos casos de LV notificados no mundo 90% estão concentrados em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (figura 1). Dados de 2013 demonstram que 96,6% dos casos de LV reportados nas américas concentram-se no Brasil (figura 2), sendo que a maior parte dos casos está concentrada no Ceará, Maranhão, Tocantins e Minas Gerais [19]. 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 [7].

Status of endemicity of visceral leishmaniasis, worldwide, 2012



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2013. All rights reserved.

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected
Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Figura 1: Distribuição de Leishmaniose Visceral no mundo, dados de 2012 [3]

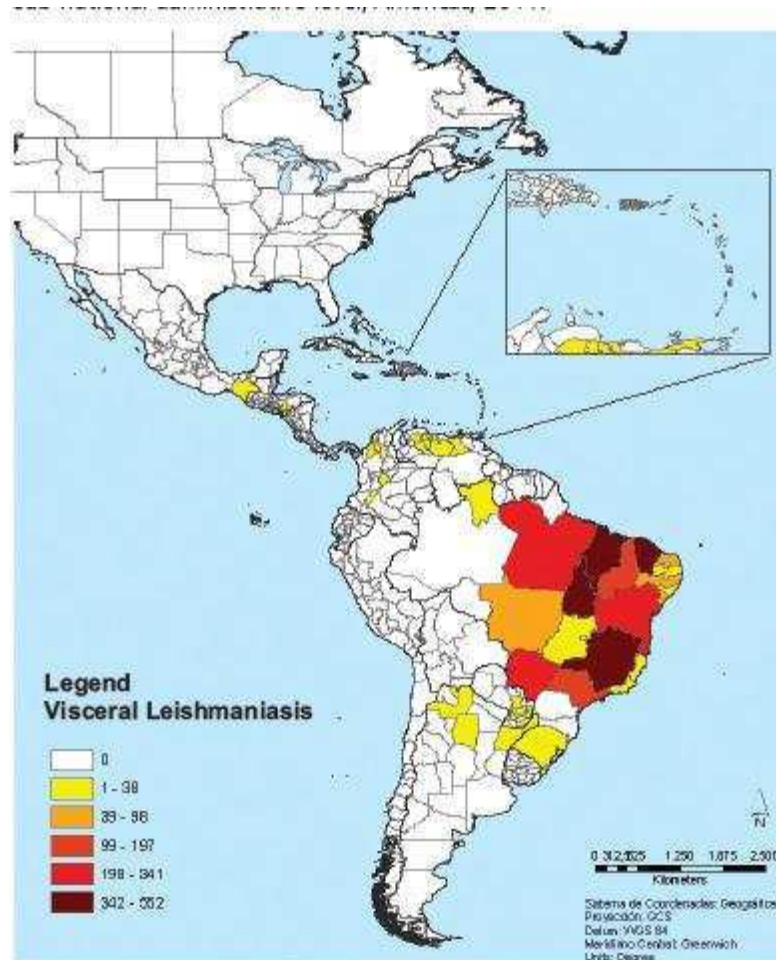


Figura 2: Distribuição de Leishmaniose Visceral nas Américas [19]

O diagnóstico para LV é feita através da combinação de sinais clínicos e exames parasitológicos, sorológicos ou PCR [3, 20]. O diagnóstico clínico é feito principalmente em indivíduos de áreas endêmicas que apresentam febres inexplicáveis acompanhada de alguns sintomas como hepatoesplenomegalia, palidez e perda de peso. A organização mundial de saúde recomenda dois métodos de diagnósticos laboratoriais como apropriados para programas de controle: o teste de aglutinação direta, que usa formas promastigotas e o teste de imunocromatografia baseado em rK39 [2, 20]. No Brasil os testes laboratoriais para detecção de leishmaniose são feitos principalmente usando o método de imunofluorescência indireta com o “antígeno de Manguinhos” [21].

Segundo a organização mundial de saúde o tratamento da Leishmaniose irá depender do tipo de doença, espécie envolvida e a região [3]. Os antimoniais foram usados durante muito tempo no tratamento da LV [22]. Já atualmente a

anfotericina B e a pentamidina têm sido usado com mais frequência. A anfotericina B pode ser administrada de diferentes formas, mas recentemente têm sido usado em formulações lipídicas para aplicações intramusculares, no entanto a eficácia deste medicamento varia muito de região para região e estudos detalhados em áreas endêmicas são necessários para melhor tratamento [22]. No Brasil o tratamento com anfotericina B pode variar de 6 a 12 meses, variando também a concentração de 2 a 20 mg/kg e o veículo de dispersão [2].

2.2. Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

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 *L. infantum chagasi*. Dados no Brasil demonstram um elevado número de cães infectados em áreas endêmicas como por 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 [6]. Em Jequié – Bahia, cerca de 6,55 cães em cada 100 são infectados por ano [7]. Em um levantamento para determinar a prevalência de cães positivos para LVC em áreas urbanas e rurais do nordeste brasileiro foi visto que 72,2% dos cães avaliados nas áreas urbanas foram positivos para LVC. Dos casos positivos 30,8% não apresentavam sinais clínicos. Nas as áreas rurais o índice de cães positivos foi de 12,4%, sendo que destes cerca de 75% não apresentaram sinais clínicos [23]. Como pode ser observado nos dados citados, há um número elevado de cães que não apresenta sinais clínicos o que acarreta em uma maior dificuldade no diagnóstico.

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 LVC, como os métodos de aglutinação direta, imunocromatografia, ELISA e PCR, sendo os mesmo usados para o diagnóstico da LV. 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 [2].

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* [8]. Recentemente foi publicado um trabalho que avaliou o potencial da NTPDase-2 de *Leishmania infantum chagasi* recombinante como antígeno em testes de ELISA indireta, sendo que para estes testes foram avaliados soros provenientes de 78 cães. Foi visto que a recombinante em questão possibilita a detecção de cães com leishmaniose e apresentou alto de especificidade, o que não ocorre em outras metodologias usadas hoje [24].

Outro problema é que ainda não existem vacinas com eficácia comprovada para o tratamento da LCV, apesar de existirem algumas vacinas no mercado veterinário. No Brasil apenas duas vacinas contra Leishmaniose canina foram autorizadas pelo Ministério da Saúde e estão sendo comercializadas, mas ainda não existem dados que demonstrem a eficácia desta vacina em programas de saúde pública [22]. No entanto existem estudos que visam desenvolvimento de novas vacinas, como o estudo com a proteína rLiHyp1 de *L. infantum* que é uma proteína da família das super-oxigenases. Neste estudo foi visto que esta proteína possui potencial para ser usada tanto para diagnóstico quanto para vacinas contra Leishmaniose visceral [25].

Já o tratamento da LVC é ainda mais problemático, como os cães são muito susceptíveis a infecção e as drogas usadas são as mesmas usadas no tratamento humano, alguns governos determinam a eutanásia de cães infectados para evitar a seleção de isolados resistentes a drogas [22]. No Brasil o tratamento dos cães estava proibido pela portaria N° 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. No entanto uma decisão do Tribunal Regional Federal da 3ª região de 2013, determina que a responsabilidade do tratamento ou melhor alternativa a ser tomada é do médico veterinário.

Na busca por métodos de diagnósticos mais rápidos e mais confiáveis e por possíveis alvos para desenvolvimento de drogas ou candidatos vacinais, 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 LVC em áreas

endêmicas. Dentro deste contexto as LicNTPDases têm sido apontadas como candidatos promissores.

2.3. Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase

As E-NTPDases (EC 3.6.1.5), ou Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases, são enzimas capazes de catalisar hidrolisar nucleotídeos tri e difosfatados em diferentes ambientes, incluindo o meio extracelular [26]. Estas enzimas são dependentes de cátions divalentes para sua atividade e insensíveis ou parcialmente sensíveis a inibidores de ATPase tipo P, V e F, como por exemplo azida sódica que inibe ATPases mitocondrial (tipo-F), orthovanadato que inibe H⁺ ATPase (Tipo-P), trifluoperazino que inibe Ca⁺²-ATPase(Tipo-P) e outros [10, 27-29]. Elas podem ser secretadas na forma solúvel ou serem proteína integrais de membranas com uma ou duas porções transmembranas (figura 4). Todos os membros desta família possuem 5 regiões conservadas denominadas regiões conservadas de apirases (ACRs) figura 3, sendo que estas ACRs (figura 3) são extremamente importantes para a formação do sitio ativo destas enzimas. Alguns resíduos de aminoácidos são extremamente conservados nas ACRs, já outros são mais variáveis e esta variação é um possível fator determinante da diferença de especificidade para substrato existente entre as várias enzimas que compõem a família [18, 26, 30, 31].

As NTPDases estão presente em diversos organismos como mamíferos, plantas, leveduras, protozoários e pelo menos uma bactéria (figura 5). A primeira apirase descrita foi a apirase de batata que foi descoberta em 1944 e foi extensamente estudada. Em mamífero a primeira NTPDase descrita foi a CD39 (NTPDase-1) que foi clonada em 1994 [32]. Atualmente têm se informações mais detalhadas para as NTPDases de mamíferos, sendo que já foram descritas 8 diferentes isoformas de NTPDases [18, 26, 33-42]. Cada isoforma apresenta características próprias, como localização celular, secretadas na forma solúvel ou se possui uma ou duas regiões transmembrana (figura 4). Para a capacidade de hidrólise de substratos as NTPDases humanas apresentam as seguintes capacidades; NTPDases 1, 3 e 8 hidrolisam com maior intensidade ATP, ADP, UTP e UDP, já NTPDase-2 apresenta uma maior capacidade de hidrolisar ATP e UTP, enquanto NTPDases 4, 5 e 6 apresentam uma maior capacidade de hidrolisar

nucleotídeos difosfatados e a NTPDase 7 apresentam uma maior capacidade para UTP, CTP e GTP [18]. Outra diferença importante entre as isorformas é que algumas destas enzimas podem hidrolisar em uma única etapa os nucleotídeos trifosfatados diretamente a monofosfatados liberando dois fosfatos inorgânicos (NTPDase-1), enquanto outras hidrolisam os nucleotídeos trifosfatados liberando um fosfato inorgânico e o nucleotídeo difosfatado, sendo que os nucleotídeos difosfatados só são hidrolisados a monofosfatados quando atingem uma determinada concentração no meio de reação. Esta característica permite que ocorra um aumento concentrações transientes de nucleotídeos difosfatados o que pode ser importante para sinalização celular [26, 39] .

	ACR1	ACR2	ACR3	ACR4	ACR5
NTPDase4	---YGI VVDCGSSGSRVFVYCW---	ETPLYILCTAGMRLLP---	VISGKQEGVYAWIGINFLV---	GILDMGGVSTQIAY---	VQWTLGAI---
NTPDase7	---YGLVVDGCGSSGSRIFVYFW---	ETPLYILCTAGMRLLP---	VISGKQEGVYAWIGINFLV---	GILDMGGASLQIAY---	VQWTLGAI---
NTPDase1	---YGI VLDAGSSHTSLYIYKW---	ETPVYLGATAGMRLLR---	IITGQEEGAYGWITINYL---	GALDLGGASTQVTF---	AGWTLGYM---
NTPDase8	---FGIVFDAGSSHTSLFLYQW---	KTPPTFLGATAGMRLLS---	LLAQAEAGAFGWITVNYGL---	GALDMGGASTQITF---	IGWTLGYM---
NTPDase2	---YGI VLDAGSSHTSMFIYKW---	GTPLYLGATAGMRLLN---	ILSGQEEGVFGWVTANYLL---	GAMDLGGASTQITF---	VGWALGYM---
NTPDase3	---YGI VLDAGSSRTTVVYQW---	STPIHLGATAGMRLLR---	IISGQEEGVYGWITANYLM---	GALDLGGASTQISF---	IAWSLGYM---
NTPDase5	---YGI MFDAGSTGTRIHVYTF---	KTPVVLKATAGLRLLP---	IMDGSDEGILAWVTVNFLT---	GTLDLGGASTQITF---	TGWALGAT---
NTPDase6	---YGI MFDAGSTGTRVHVYQF---	ATPLVLKATAGLRLLP---	IMNGTDEGVSAWITINFLT---	GMLDLGGSTQIAF---	TSWALGAI---
<i>T. vaginalis</i> -NTPDase1	---YGI MVDAGSSGTRAFVYTW---	STPMYVFATAGMRLLG---	VINGVEEGVYGWLSVNL---	GAMDLGGASFQIAV---	LSWAIGAM---
<i>T. vaginalis</i> -NTPDase2	---MVDAGSSGTRGFLYTW---	ETPIYVYATAGMRLLS---	VISGVEEGVYGWLSVNL---	GSIDLGGASFQIAL---	LSWAIGAM---
<i>T. vaginalis</i> -NTPDase3	---KVLIFDAGSSGTRVYLYQY---	DVPLMIYATAGMRLLS---	VIEGYEEGIYAWISVNKL---	PILEIGGASVQFAS---	PQWTLGAV---
<i>T. vaginalis</i> -NTPDase4	---KVLIFDAGSSSTRVYLYKY---	SVPLIVYATAGMRLLP---	VIPGYEEGLFAWVAVNRL---	PIFEFGGASQAIAA---	PQWTLGAV---
<i>T. cruzi</i> -NTPDase	---YSIVFDAGSTGSRVHVYFRY---	CVPIEMKATAGLRRIG---	ILEGWEEGPLAWLTVNYLL---	TILDLGGSTQIVM---	TAWALGAS---
<i>T. brucei</i> -NTPDase	---YSVVF DAGSTGSRVHVYRY---	CVGIELKATAGLRRIG---	ILEGREGPLAWLTVNFLT---	TILDLGGSTQIVM---	TAWTLGAS---
<i>L. major</i> -NTPDase2	---YSVVF DIGSTGSRVHVYKY---	CTAAEFKATAGLRLMLG---	ILDACEEGPMAWLTVNYLL---	AVIDLGGSTQIVF---	TAWSL GAS---
<i>L. braziliensis</i> -NTPDase2	---YSVVF DIGSTGSRVHVYKY---	CTPIEFKATAGLRLMLG---	ILDSHEEGLMAWLTVNYLL---	AIIDIGGSTQIVF---	TAWPLGAS---
<i>L. major</i> -NTPDase1	---YDVVIDAGSTGSRVHVYQY---	CTSRTLKATAGLRLLP---	IISGAQEGVYGWLTVNXLL---	ATIDMGRASQIVF---	VSWSLGSS---
<i>L. infantum</i> -NTPDase	---YDVVIDAGSTGSRVHVYQY---	CTFVTLKATAGLRLLP---	IISGAQEGVYGWLTVNYLL---	ATIDMGGASTQIVF---	VSWSLGSS---
<i>L. braziliensis</i> -NTPDase1	---YDIVIDAGSTGSRVHVYQY---	CTSRTLKATAGLRLLP---	IVSGAQEGVYGWLTVNYLL---	ATIDMGGASTQIVF---	VSWSLGCS---
<i>S. cerevisiae</i> -GDA1p	---YVIMIDAGSTGSRVHIYKF---	CTPVAVKATAGLRLMLG---	IMGDGEEGVFAWITVNYLL---	AVFDLGGSTQIVF---	IGWCLGAS---
<i>C. neoformans</i> -GDA1p	---YALTI DAGSTGSRVHVYKF---	CTPVVVKATAGLRLMLG---	NWDFTVGGVYAWITANYLL---	AVMDLGGASTQIVF---	LGWALGAG---
<i>L. pneumophila</i> -Lpg1905	---CIAVIDAGSTGSRVHIYSY---	NI PVYFYATAGMRLLP---	TITGNDEALFDWLVNYKL---	GVMMDGGASVQIVF---	LDWTIGVV---
<i>L. pneumophila</i> -Lpg0971	---CIAVIDAGSSSRVHIYAY---	LMPVYFYSTAGMRLLP---	TISGTEEGIFAWLATNYQL---	GVMIDGGASVQIVI---	IDWTLGAV---
<i>T. gondii</i> -NTPDase3	---ALVVIDAGSSSTRVNFVLA---	GIPVMLCSTAGVRDFH---	PITGAEGLFAPITLNLHLS---	GVVEVGGASQIVF---	LGWQVGI---
<i>T. gondii</i> -NTPDase1	---ALVVIDAGSSSTRVNFVLA---	GIPVMLCSTAGVRDFH---	PITGAEGLFAPITLNLHLS---	GVVEVGGASQIVF---	LGWQVGI---
<i>N. caninum</i> -NTPDase	---AIVVIDGGSSATRTDVFLA---	GVPVLLCSTAGVRDFH---	PITGAEGLYAFALNLHLS---	GVVEVGGASTQIVF---	LGWHVGA---
<i>S. neurona</i> -NTPDase	---AVLLIDGGSSKTPVPMFKM---	GVPVLFNSTAGIRDFA---	TLSGEEGVSAFLTANHL---	GIVEVGGASMQIVL---	AGWPIGRI---
<i>S. mansoni</i> -NTPDase2	---YGVVFDAGSTGSRVHIFKL---	NTPVLLRATAGLRLIS---	IMDGFYEGLYLWFTLNFL---	GTLDLGGSTQITF---	INWSL GAL---
<i>S. cerevisiae</i> -NTPDase	---FGIVIDAGSSGSRVHIFKW---	SCPVFIQATAGMRLLP---	VIDGE TEGLYGWLGLNYLY---	GFMDMGGASTQIAF---	LSWTLGRI---
<i>P. syringae</i> -NTPDase	---WQVVVDAGSSKTRGILYRL---	TVLVNVLGTAGMRELS---	TIDGRDEGIFAWVHLNFK---	GIIEMGGASQITF---	IRWTDGFL---
<i>S. mansoni</i> -NTPDase1	---YSVVIDAGSTSSKLHLYKW---	HTPIYLAATAGMRLKL---	LLYGSSEGLYGVVSVNYL---	GSLDLGGASTQIAF---	VSWALGYM---
<i>P. falciparum</i> -NTPDase	---YGI IIDAGSNGTRIHLFEW---	SYPFYFQATGGMRLNK---	ILSGEEGIYGWLVNLL---	GAIDLGGSTQITF---	ISWTHGSM---
<i>P. atlantica</i> -NTPDase	---CHIIYDAGSSGTRVYVEE---	VVSARIYATAGMRIA---	TVTGFEEGLFAWLSVQDPT---	GIVDMGGASQVTF---	VSWTRGAV---

Figura 3: Alinhamento entre as cinco ACRs de diversas espécies [18].

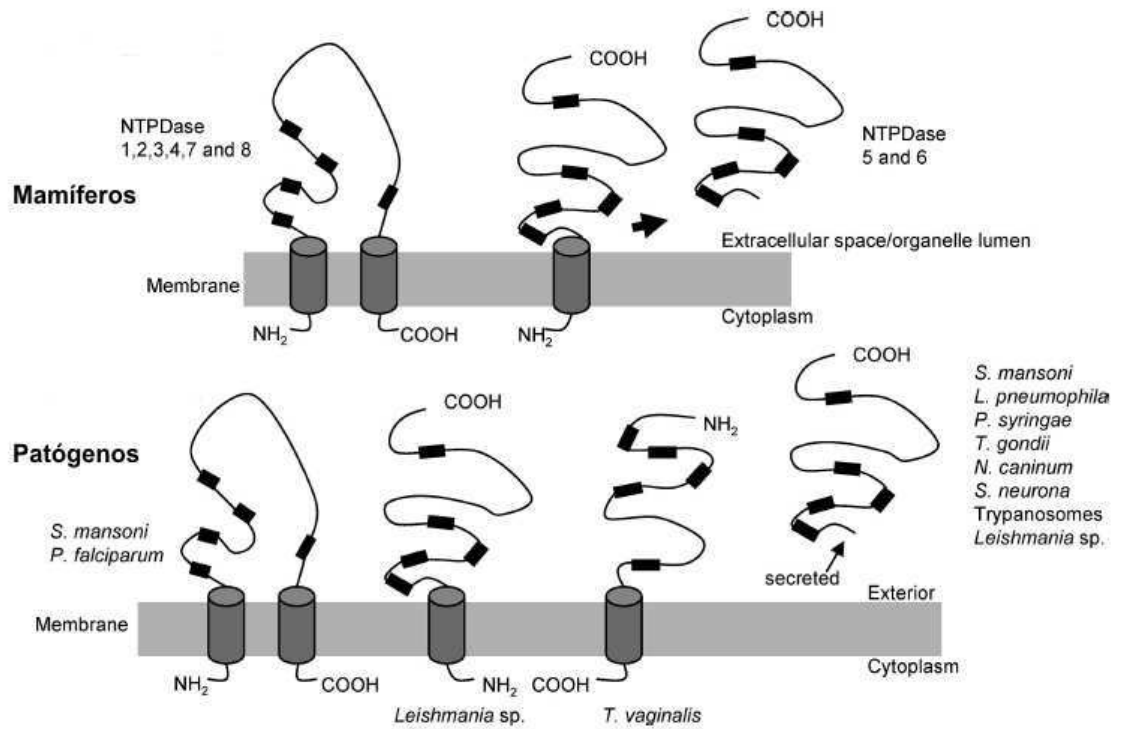


Figura 4: Família das E-NTPDases de mamíferos e de alguns patógenos: Esta figura demonstra a topologia de membrana e as 5 ACRs (blocos pretos). *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*), *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*), *Pseudomonas syringae* (*P. syringae*), *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), *Neospora caninum* (*N. caninum*), *Sarcocystis neurona*, (*S. neurona*), figura modificada de [18].

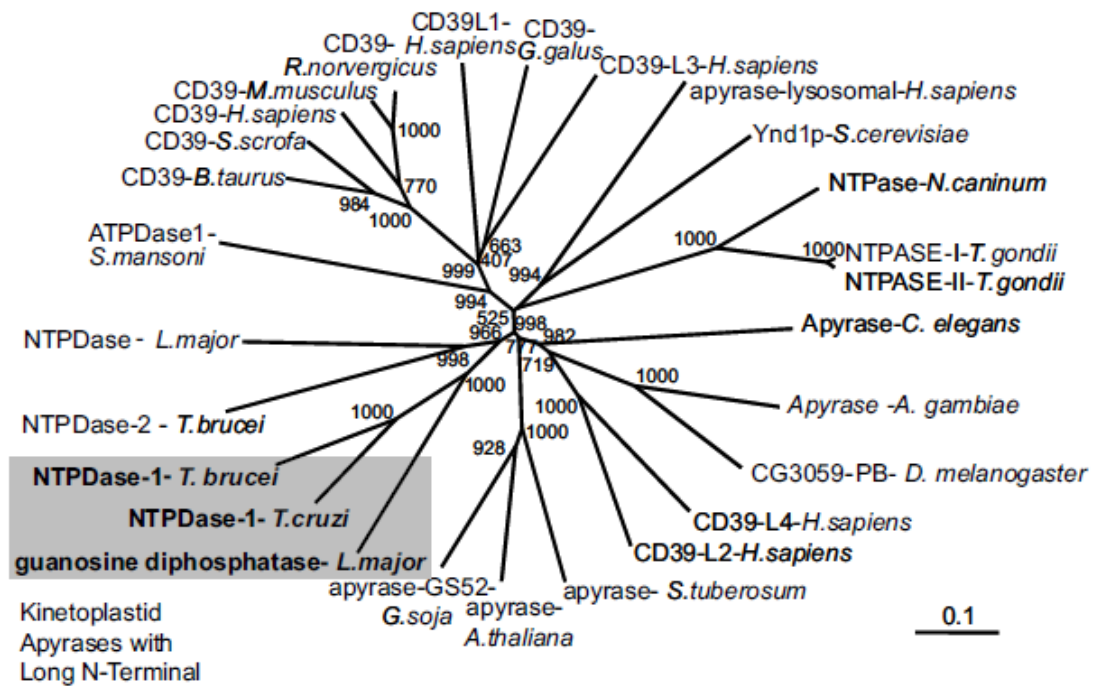


Figura 5: Arvore filogenética mostrando o agrupamento das apirases de diversos organismos [43].

Em 2008 a NTPDase-2 de *Rattus norvegicus* teve sua estrutura resolvida. Foi possível determinar quais os resíduos de aminoácidos participam diretamente e indiretamente da hidrólise de nucleotídeos o que possibilitou uma maior compressão da reação catalisada por esta enzima [31]. Recentemente foi resolvida também as estruturas da NTPDase de *Legionella pneumophila* e da NTPDase-1 de *Toxoplasma gondii* [30, 44, 45]. Em análise comparativa entre a NTPDase-2 de *Rattus norvegicus* e NTPDase de *Legionella pneumophila*, verifica-se que estas duas enzimas possuem uma identidade de sequência de apenas 26%, mas quando é feita sobreposição das estruturas observa-se uma similaridade estrutural significativa (figura 5) [30]. 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. 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) [46]. Já a NTPDase-2 de *R. norvegicus* possui um K_m

aproximado para ATP e ADP de 0,0303 e 0,039 mM respectivamente [42]. Isto sugere que as alterações, proporcionam uma diferença na atividade da enzima, mesmo sendo a estrutura semelhante.

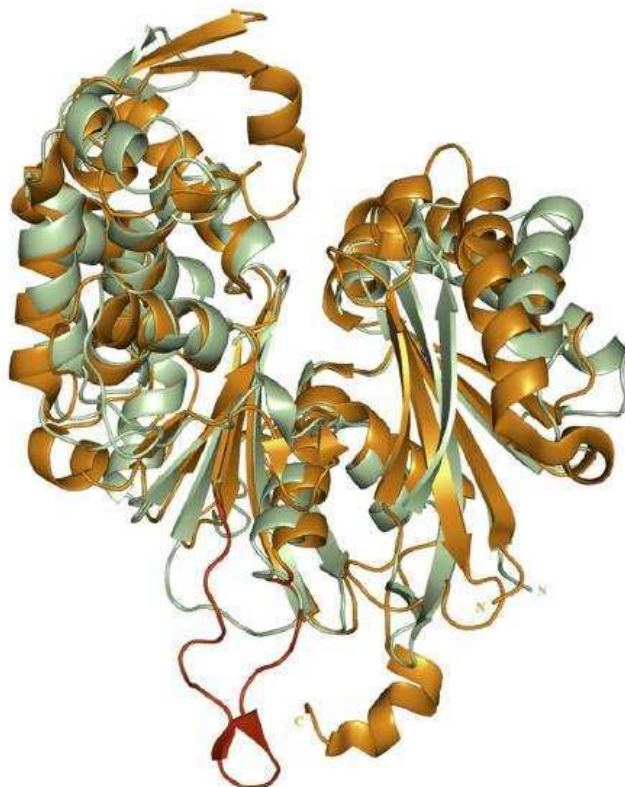


Figura 6: Comparação entre a estrutura da NTPDase de *L. pneumophila* (cinza) com a estrutura da NTPDase-2 de *R. norvegicus* (laranja) [30]:É possível observar um grau elevado de sobreposição entre as α -hélices e as folhas β entre as duas estruturas.

Portanto é necessário obter mais conhecimento sobre estas enzimas para poder determinar quais seriam os resíduos de aminoácidos responsáveis por estas diferenças na especificidade e catálise de nucleotídeos, o que facilitaria muito nos estudos de desenho racional de drogas. As E-NTPDases são enzimas que controlam a concentração de nucleotídeos em torno do seu microambiente e juntamente com a enzima 5' nucleotidase, podem agir na modulação de sinal via diversos subtipos de purino receptores nas células.

2.4. 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, já que a hidrólise destes nucleotídeos podem modular a ativação dos purino receptores. 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 (figura 7) [47]. O conceito de um sistema de sinalização purinérgica, utilizando nucleotídeos e nucleosídeos purínicos como mensageiros extracelulares, é conhecido há mais de 30 anos, período em que já se demonstrava a influência da liberação de ATP sobre células do sistema nervoso, posteriormente foi identificado purino receptores em diversos tecidos, como músculos, pulmão, coração, baço, testículos, bexiga, intestino, fígado, células do sistema imune e outras [11, 48, 49]. Por sua vez, os purino receptores são proteínas ancoradas à membrana celular que reconhecem purinas e pirimidinas que, ao se ligarem ao receptor, desencadeiam uma série de reações, alterando o comportamento celular. Os purino receptores são divididos em receptores dos tipos P1 e P2 (figura 7) [11].

Os receptores do tipo P1 são subdivididos em A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, sendo todos eles ativados pelo reconhecimento de adenosina (figura 7). 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 do tipo P2 são subdivididos em dois grandes grupos: os receptores do tipo canal P2X (P2X₁₋₇) que, quando interagem com ATP, possibilitam o fluxo de cátions de forma não seletiva através da membrana; e os receptores do tipo serpentina, P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ e P2Y₁₁₋₁₄) (figura 7). Os números não mostrados, são referente a sequência genica de possíveis subtipos de receptores P2Y, mas que não possuem evidencia de que eles são receptores funcionais, por exemplo o P2Y₃ que é encontrado em frango e o P2Y₈ que é encontrado em *Xenopus* e peru e ambos são ortólogos ao receptores de mamífero P2Y₆ e P2Y₄ respectivamente, no entanto não foi comprovado ainda que estes receptores desencadeiam alguma função nestes organismos [11, 47, 50]. 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 [47]. 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 [11, 47, 51, 52].

Estes receptores são expressos em diversos tipos de células do sistema imune; como neutrófilos, monócitos, macrófagos, linfócitos, células natural “killer”, células dendríticas [47]. A grande diferença entre estas células é que umas expressam mais determinados receptores do que outras ou não expressam, o que acarreta em um tipo de resposta fisiológica específica a cada estímulo. [11, 12, 14, 47, 53-59].

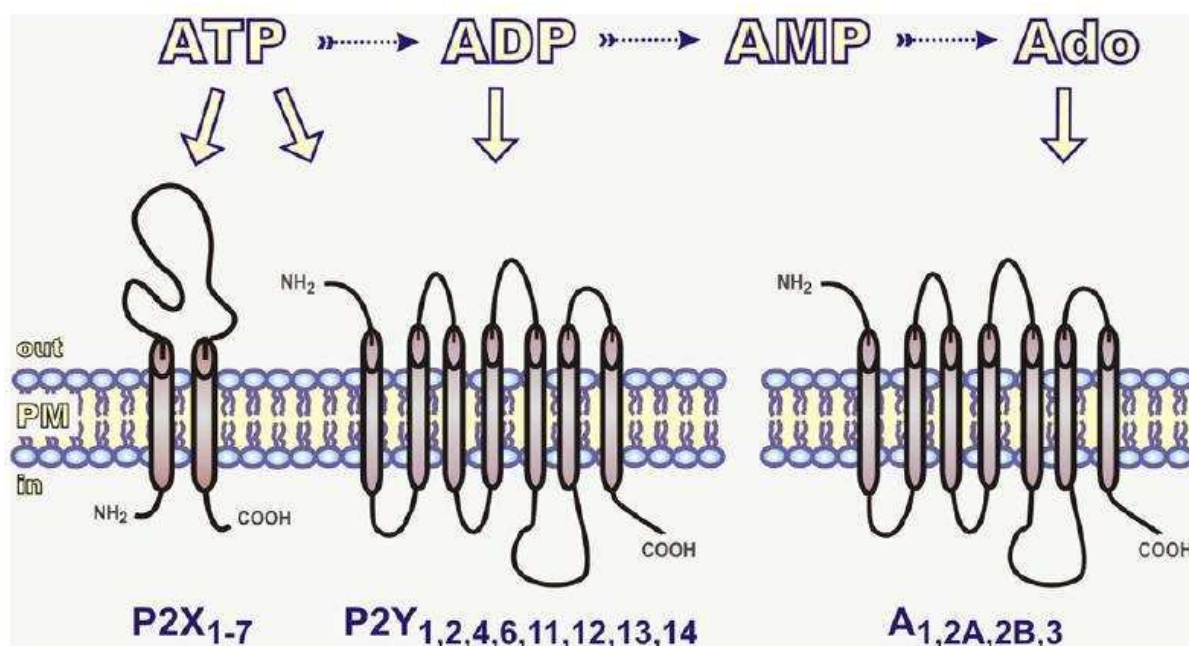


Figura 7: Topologia de membrana dos receptores P1 e P2 e uma sequência de alguns agonistas que podem ativá-los [60]. Nesta figura é possível verificar os nucleotídeos que podem regular a ativação dos receptores P2X e P2Y.

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. Por exemplo foi demonstrado que os receptores P2Y₂ e P2Y₁₂ e os receptores P1A2a, A2b e A3 são importantes para o mecanismo de quimiotaxia dos macrófagos induzida por gradiente de C5a. Quando adicionado apirase de batata (uma E-NTPDase com alta atividade ATPásica e ADPásica) ocorre uma queda da quimiotaxia [61]. O mesmo ocorre quando é feita a inibição dos receptores citados. Além disso, 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 [12, 62].

Outros trabalhos demonstram que 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 estimulação da célula pelo LPS que por sua vez faz com que esta célula libere nucleotídeos que irão ativar os receptores P2Y₂ e P2Y₆. Por outro lado, ocorre uma diminuição na liberação de IL-8 quando é feita a inibição destes receptores, seja por “knockdown” ou pelo uso de antagonistas ou mesmo pela adição de apirase de batata durante o estímulo com LPS [12].

Já em estudo com neutrófilos humanos, foi 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 [63].

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 repostas 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 [14, 58, 64-66]. Estudos demonstram uma possível correlação entre ativação de P2X₇ de monócitos e macrófagos com liberação de IL-1 β . Nestes estudo verifica-se que a liberação de IL-1 β é inibida pela a adição do inibidor AG126, no entanto a correlação direta deste inibidor com o receptor P2X₇ ainda não é certa [65, 66]. Este receptor parece agir também na via de controle de apoptose de monócitos e macrófagos infectados com *Mycobacterterium tuberculosis* [58]. Neste estudo foi verificado que a apoptose induzida pela infecção por *M. turberculosis* é inibida quando o receptor P2X₇ foi bloqueado. Além disto, dois trabalhos verificaram um aumento de expressão do receptor P2X₇, P2Y₂ e P2Y₄ em macrófagos infectados com *Leishmania amazonenses*, quando comparado com células infectadas com as não infectadas e que a ativação destes receptores é importante para eliminação do parasito, já que células infectadas são mais sensíveis a apoptose induzida por ATP ou UTP [64, 67]. Outro estudo focado no receptor P2X₇, demonstra que macrófagos infectados com *L. amazonenses* e macrófagos não infectados possuem seletividade alterada para fluxo de íons. Onde células infectadas são menos permeáveis a corantes catiônicos e mais permeáveis a corantes aniônicos, sugerindo que ocorre uma indução de seletividade no receptor P2X₇ em células infectadas [68] .

Já em um trabalho com macrófagos de camundongo C57BL/6 foi demonstrado que o receptor P2X₇ é auto regulado pela NTPDase-1 do macrófago [13]. 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 [13]. Foi possível verificar também que a secreção de IL-1 β e IL18 induzida pela ativação de P2X₇, é controlada pela NTPDase-1 [13]. Observando a importância da NTPDase-1 na regulação deste receptor, podemos imaginar que outras NTPDases expressas por estas células ou por patógenos por exemplo, podem ter um papel importante no controle deste e de outros purino receptores. Provavelmente a regulação é dependente do momento e do tipo de infecção que a célula está combatendo, já que cada situação leva a uma determinada resposta. Assim, a expressão de E-NTPDases dos parasitos poderia influenciar a sinalização

purinérgica, simulando o efeito regulador das enzimas do próprio organismo (no caso o hospedeiro).

2.5. E-NTPDases de Patógenos

Diversos patógenos conhecidos apresentam uma atividade ecto-nucleotidásica em sua superfície e expressam NTPDases ou possuem genes que podem codificar possíveis NTPDases. Como por exemplo *Toxoplasma gondii*, *Neosporium caninum*, *Schistosoma mansoni*, *Sarcocystis neurona*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi* e diferentes espécies *Leishmania* [18, 43, 69-73].

O primeiro patógeno para o qual foi demonstrado uma co-relação entre virulência e expressão de NTPDases e atividade ecto-nucleotidase foi para o *T. gondii* [70, 71]. Onde é visto que os isolados mais virulentos destes parasitos expressam NTPDase-1 e 3 enquanto os isolados menos virulentos expressam apenas a NTPDase-1 [70, 71, 74]. Em trabalhos mais recentes, foi demonstrado uma relação entre atividade ecto-nucleotidase e virulência para *T. cruzi*, agente causador da doença de chagas, onde foi visto que cepas mais virulentas apresentam uma atividade ecto-nucleotidase diferente de cepas menos virulentas [43, 69].

Estudos focados em diferentes espécies de *Leishmania* também demonstram uma relação entre atividade ecto-nucleotidase e capacidade infectiva. Em um trabalho feito com diferentes espécies de *Leishmanias* foi demonstrado que as espécies mais infectivas apresentam uma maior capacidade de hidrólise de nucleotídeos. Em outro trabalho com diferentes isolados de uma mesma espécie, onde os isolados apresentam capacidade infectiva distintos, também possuem uma capacidade de hidrólise de nucleotídeos distinta [17, 75]. Já foram preditos no genoma das diferentes espécies de *Leishmania* dois genes codificantes de E-NTPDases uma isoforma maior e que possivelmente secretada na forma solúvel e outra isoforma menor que apresenta uma região transmembrana N-terminal. Em análise filogenética entre as duas isoformas é possível verificar que as isoforma maiores das diferentes espécies de *Leishmania*, assim como a NTPDase-1 de *T.*

cruzi e de *T. brucei* possuem maior similaridade entre si, quando comparado com as isoformas menores dentro da mesma espécie. Talvez esta similaridade seja devido a conservação nestas espécies de uma possível via de atuação de cada isoforma (figura 8).

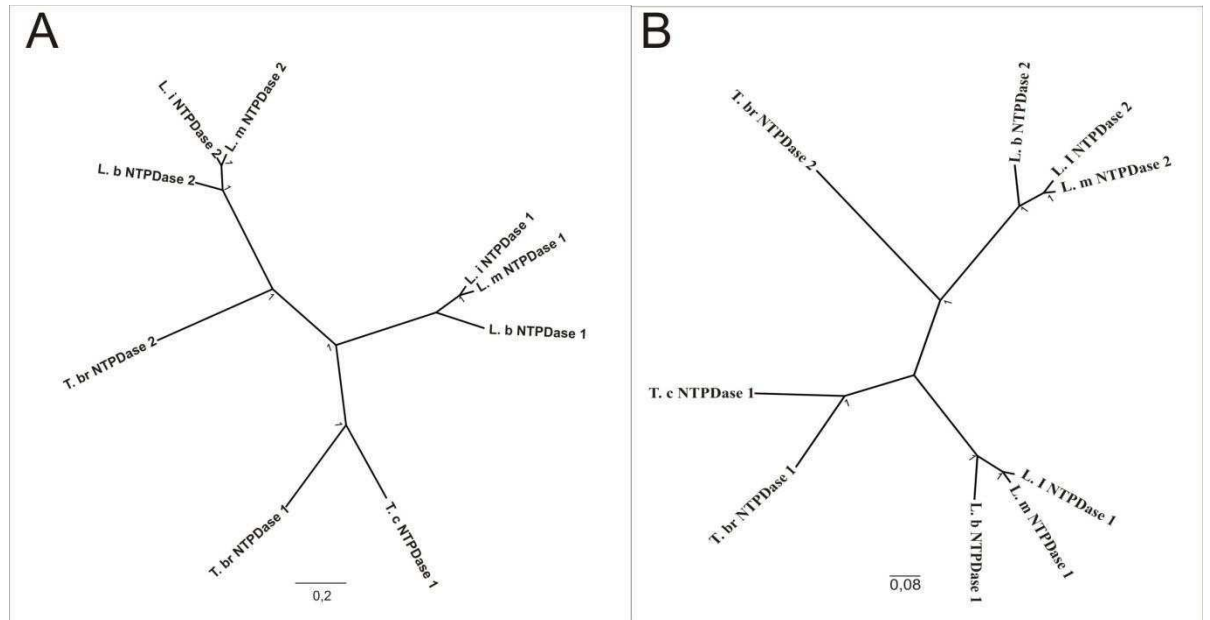


Figura 8: Agrupamento das NTPDases 1 e 2 de tripanosomatídeos. A) Agrupamento feito por inferência Bayesian. B) Agrupamento feito pelos métodos Neighbor joining / UPGMA. As árvores foram feitas com alinhamento das sequências de aminoácidos das NTPDases de *Leishmania*, *T. brucei* e *T. cruzi* [76].

Até o momento não foi demonstrado a função específica para cada uma das isoformas de NTPDases das *Leishmanias* e por este motivo é necessário maiores estudos focados em desvendar a função destas enzimas no metabolismo dos parasitos e na modulação do metabolismo das células hospedeira.

Para *L. infantum* (cepa JPCM5) os genes anotados das NTPDases são: Guanosine Diphosphatase (gi|146079010), provavelmente por apresentar na anotação automática do genoma uma similaridade com a GDPase de leveduras 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 à possível GDPase que é a isoforma maior como LicNTPDase-1 (devido a sua maior similaridade de sequência primária com a NTPDase-1 de *T. cruzi* que foi descrita e bioquimicamente caracterizada como E-NTPDase, capaz de hidrolisar vários nucleotídeos tri e difosfatados) [69, 77]. O produto do segundo gene que codifica a isoforma menor, chamaremos de

LicNTPDase-2, sendo que esta enzima de *L. infantum* foi recentemente caracterizada bioquimicamente pelo nosso grupo como uma genuína apirase, capaz de hidrolisar nucleotídeos tri e difosfatados (artigo em preparação). Devido aos genes das E-NTPDases 1 e 2 de *L. infantum* apresentarem então similaridade com GDPases e NTPDases, a seguir será descrito com mais detalhes alguns dados importantes da literatura sobre a relação da atividade destas enzimas e a virulência.

2.6. Correlação entre Ecto-Nucleotidase e virulência de *T. cruzi* e *Leishmania*

Atualmente muitos grupos que estudam Leishmaniose Visceral, seja no homem ou no cão, estão focando seus estudos na busca de novos alvos para desenvolvimento de drogas, para uma vacina efetiva e também novos métodos de diagnósticos que incluam alvos que possibilitem um diagnóstico mais confiável com maior rapidez e nos resultados e facilidade de execução. 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 [15].

Em estudos feitos em *T. cruzi*, foi visto que estes parasitos possuíam atividade ecto-nucleotidase em sua superfície e que esta atividade era dependente de cátions divalentes [43, 78, 79]. Em trabalho feito em 2004, foi feita a clonagem do possível gene da NTPDase de *T. cruzi* [43]. Estudando diferentes cepas de *T. cruzi* com diferentes capacidades infecciosas, nosso grupo de pesquisa mostrou que o perfil de hidrólise para ATP e ADP, se modifica em uma mesma cepa mantida “in vitro” por vários ciclos, onde ocorreu redução na razão de hidrólise ATP/ADP, acompanhada por uma diminuição da capacidade infecciosa deste parasito [69]. Neste mesmo trabalho, uma perda significativa na capacidade infecciosa também foi notada em ensaios com inibidores específicos para NTPDase [69]. Também foi 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 e outro independente desta atividade. Em testes usando inibidores parciais de E-NTPDases (suramina, cloreto de gadolínio e ARL 67156) foi verificado uma redução na infecção presença destes inibidores, e um mecanismo independente de atividade enzimática. Por outro lado, usando um antissoro poli-clonal anti-NTPDase-1 de *T. cruzi*, que não inibe a atividade da

enzima, foi verificado também uma redução na infecção [69]. Em um trabalho recente do nosso grupo, foi possível comprovar a existência deste segundo mecanismo. Foi demonstrado que quando na presença de concentrações crescentes da NTPDase-1 recombinante de *T. cruzi*, houve uma redução proporcional da adesão dos parasitos na célula hospedeira. Este resultado sugere que a enzima recombinante compete com a enzima do parasito pelo sitio de adesão na célula hospedeira [77].

Em trabalhos com *L. amazonensis*, 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 [16, 80]. Em outro trabalho com diferentes espécies de *Leishmania* 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 e correlacionando com as lesões geradas na pata de camundongos (C57BL/6) [17]. 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* [17]. Em trabalhos mais recentes com *L. amazonenses* foi possível identificar a localização da NTPDase-1 em diferentes compartimentos celulares, como membrana plasmática, núcleo, cinetoplasto, flagelo e bolsa flagelar [81]. Este resultado indica que as NTPDases de *L. amazonenses* podem estar atuando em diversos vias do parasito.

Trabalhando com diferentes isolados de *L. braziliensis* com capacidade de hidrolisar nucleotídeos (ATP, ADP e AMP) diferentes, foi visto que os isolados com maior atividade ecto-nucleotídica são isolados mais infectivos do que os isolados com menor capacidade, o que comprova uma relação direta entre atividade ecto-nucleotídica e capacidade infectiva mesmo quando é comparado uma mesma espécie de *Leishmania* [75]. Ainda para *L. braziliensis*, outro trabalho demonstrou a presença de uma ATP difosfohidrolase, nome sinônimo de E-NTPDase, capaz de hidrolisar ATP e ADP, na superfície de promastigotas de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. Neste trabalho os autores conseguiram demonstrar através de microscopia eletrônica a presença da NTPDase-1 na membrana plasmática, núcleo,

cinetoplasto, flagelo e bolsa flagelar, sendo este resultado idêntico ao encontrado para *L. amazonenses*. Outro dado importante demonstrado foi que o anticorpo anti-NTPDase de *L. brasilienses* é capaz de reduzir o crescimento das promastigotas “in vitro”, indicando a importância destas enzimas para o crescimento celular [82].

Em um trabalho com *L. infantum* apresenta uma perda de capacidade infectiva quando mantida em cultura axênica por sucessivas passagens e que estes parasitos perdem a capacidade de modular resposta imune na célula hospedeira. No entanto a capacidade de infectiva é recuperada quando os parasitos são induzidos a se diferenciar em amastigotas [83]. Este dado corrobora com o que já foi demonstrado para *T. cruzi*, mas como neste trabalho não foi feita análise da atividade ecto-nucleotidase, não podemos afirmar que o resultado obtido está relacionado com capacidade de hidrólise de nucleotídeos. Em trabalho recente com *L. infantum*, foi demonstrado a atividade da NTPDase do parasito por excisão de banda do gel, foi visto também que tanto o anticorpo anti-apirase de batata quanto o anti-NTPDase de *L. brasilienses* inibem a atividade desta enzima, sendo que o anti-NTPDase de *brasilienses* tem um efeito inibitório maior. Isso se deve ao fato de que o anticorpo anti-NTPDase de *L. braziliensis* reconhece um domínio extremamente conservado entre as duas espécies [84].

3. OBJETIVOS

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 os resultados serão divididas em duas partes. No primeiro capítulo será demonstrado os resultados de atividade enzimática comparativa entre diferentes protocolos de refolding das enzimas recombinante expressa em *E. coli*, bem como atividade das enzimas expressa em célula COS-7. Esta avaliação é muito importante para demonstrar os acertos na metodologia empregada na

renaturação das enzimas. Bem como o melhor sistema de expressão para cada uma das LicNTPDase.

Já no segundo capítulo será apresentado alguns resultados de experimentos que demonstram a ação das recombinantes em macrófagos murino da linhagem RAW 264.7. O que pode auxiliar na compreensão da função destas enzimas na célula hospedeira, o que permitirá desenvolvimento de novas estratégias de ação para o tratamento de leishmaniose canina ou humana.

4. Capítulo 1:

Avaliação da atividade enzimática das LicNTPDases em diferentes: condições de armazenamento, protocolos de renaturação e sistemas de expressão

4.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Avaliar: Qual a melhor condição de armazenamento, renaturação e melhor sistema de expressão das LicNTPDases considerando os sistemas de expressão bacteriano e em células COS-7.

Determinar algumas características enzimáticas da LicNTPDase-1 como preferência por nucleotídeos e cátions. Assim teremos mais informações sobre as duas LicNTPDases, possibilitando uma melhor comparação entre as duas enzimas. Já que os estudos voltados para a caracterização da LicNTPDase-2 já está bem avançada.

Estas avaliações serão muito importante para experimentos futuros, bem como em um futuro uso destas enzimas em vacinas ou kits para diagnóstico.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Organismos

Para elaboração deste trabalho foram utilizadas duas cepas de *Escherichia coli*, *E. coli* DH5 α que foi usado nos ensaios de clonagem e BL21 codon plus-RIL (STRATAGENE) que foi usado nos ensaios de expressão heteróloga. Para expressão em células de mamífero foi usado a célula COS-7 que é derivada de rim de *Cercopithecus aethiops* (macaco verde africano).

5.2. Meios de culturas usados

Para os ensaios com *E. coli* foram utilizados dois meios diferentes, 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 μ g/mL de ampicilina [85]. 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 [85]. A cultura de COS-7 foi mantida em meio DMEM (SIGMA) pH 7,2, suplementado com 10% soro fetal bovino (LGC), 2mM de L-glutamina, 100 μ g/mL de penicilina e 20 μ g/mL de gentamicina.

5.3. 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 \approx 0,5 de 0,8 (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 sedimento foi suspenso em 40 mL de solução de CaCl₂ 0,1 M (solução esterilizado e mantida à 4°C). Este material ficou no gelo por pelo menos 1

hora e depois foi centrifugado novamente e o precipitado foi suspenso com 1 mL de solução de CaCl_2 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 [85]. Para transformação das células foi usado o método de choque térmico descrito em com alteração apenas nos volumes de material genético usado [85]. 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 1 μL da extração de DNA plasmidial que corresponde aproximadamente a 50 ng.

5.4. Clonagem da LicNTPDase-1 e 2 de *L. infantum chagasi* no vetor pET21b de expressão em *E. coli*

Os genes das duas LicNTPDases de *L. infantum chagasi* foram previamente analisados e posteriormente foi desenhado primers que amplificassem apenas a região solúvel se ambas as enzimas, eliminando a região do peptídeo sinal da LicNTPDase-1 e a região de transmembrana da LicNTPDase-2. Os genes foram então clonados no vetor pET21b (figura 9). Os detalhes das clonagens já foi demonstrado nas dissertações [76, 86].

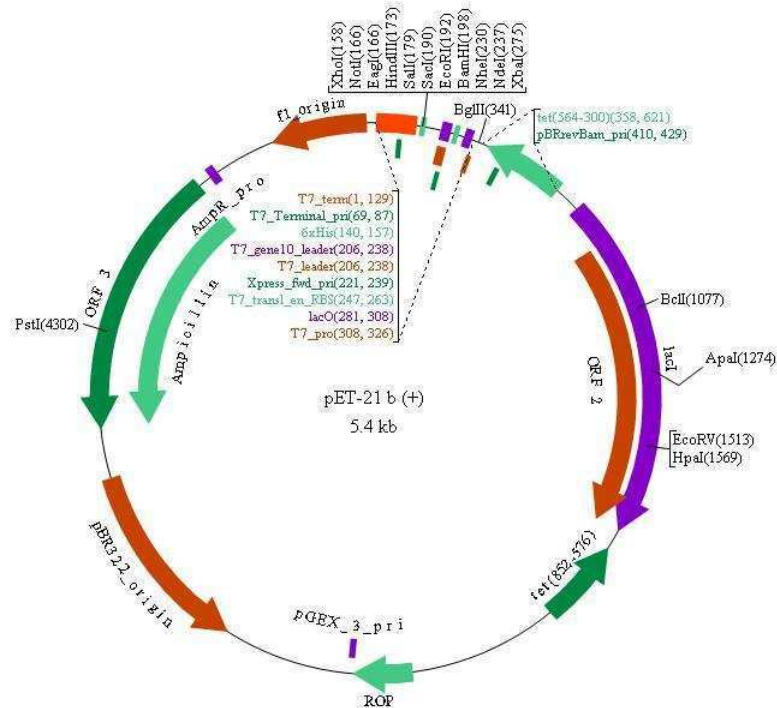


Figura 9: Mapa do vetor de expressão pET21 b (NOVAGEM).

5.5. Clonagem da LicNTPDase-1 e 2 de *L. infantum chagasi* no vetor

pcDNA3 de expressão em célula de mamífero

Os genes das LicNTPDase-1 e da LicNTPDase-2 previamente clonados em vetor pET21b foram usados como molde para efetuar a clonagem no vetor pcDNA3 (figura 10), o vetor usado nesta clonagem continha o gene da NTPDase-1 de camundongo, sendo desenhado primers que amplificariam o vetor inteiro mais a região de transmembrana da NTPDase-1 de camundongo. Para efetuar esta clonagem foi usado o kit fusion que é um kit de clonagem por PCR (CLONTECH). Foram desenhados 3 pares de primers foram desenhados (tabela 1). As condições do PCR foram determinadas de acordo com os primers e as recomendações do fabricante do kit (figura 11).

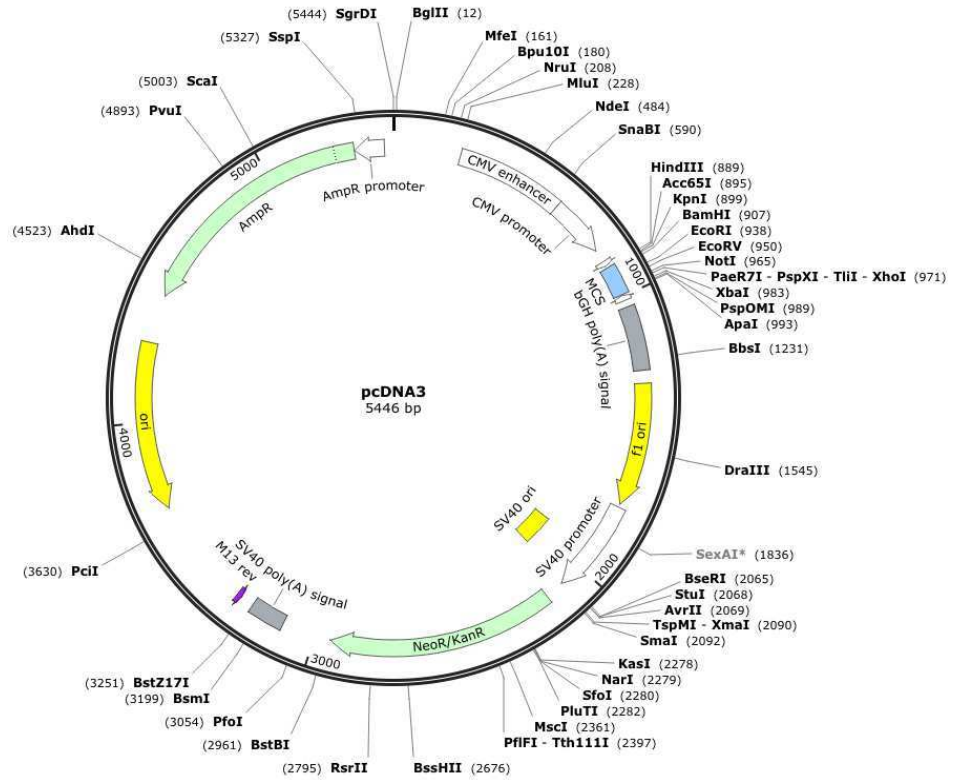


Figura 10: Mapa do vetor de expressão pcDNA3 (INVITROGEN).

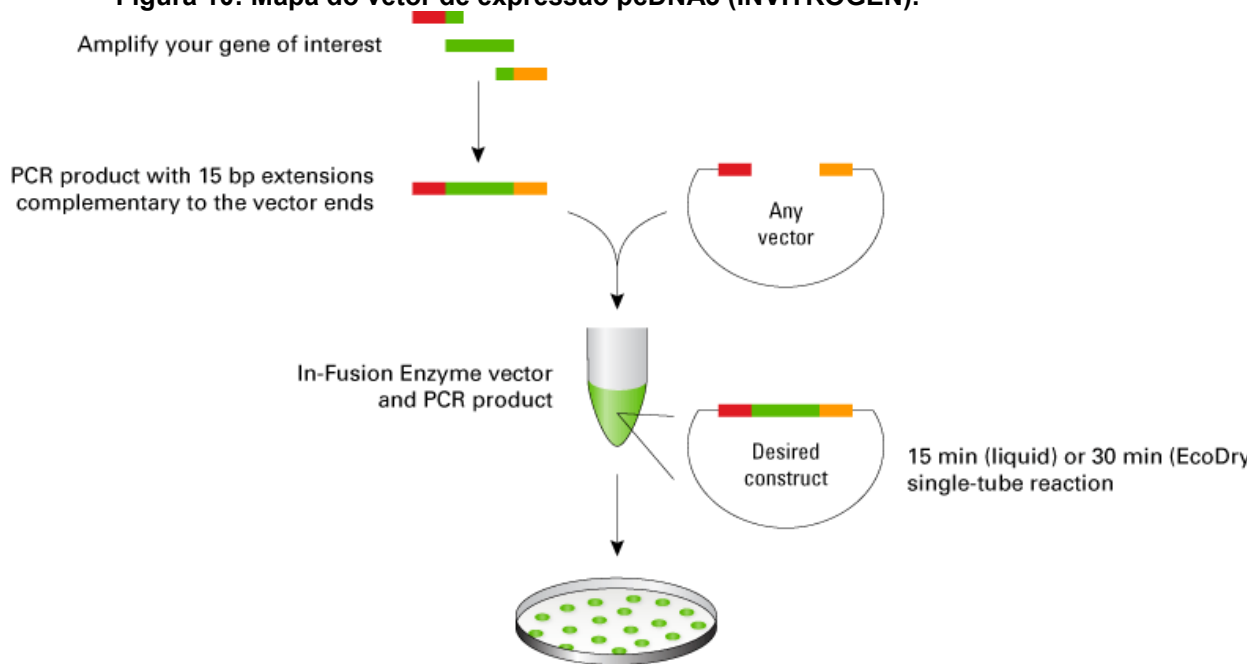


Figura 11: Estratégia de clonagem usada na clonagem feita em pcDNA3.

Tabela 1: Primers usados para clonagem das LicNTPDases no vetor pcDNA3	
Nome	Sequência nucleotídica 5'→3'
Vetor oligo F1	CGGCCGCTCGAGTCTAGAG
Vetor oligo R1	CAGTCCCACAGCAATCAAAGCT
LicNTPDase-1 F1	ATTGCTGTGGGACTGAACCCGCTTCAGTCGC
LicNTPDase-1 R1	AGACTCGAGCGGCCGTTAGGTAAGAGAGAGGAGTG
LicNTPDase-2 F1	ATTGCTGTGGGACTGCTCTCCCCATGTGACTC
LicNTPDase-2 R1	AGACTCGAGCGGCCGTCATTCCATCTTGAGCAG

- Em negrito estão as regiões dos Primers que serão usadas na recombinação com o vetor.

5.6. Expressão das LicNTPDases recombinantes em sistema bacteriano

As construções pET21b/LicNTPDases de *L. infantum chagasi* foram utilizadas 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 a 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 (500 mL) de meio SOC sem antibiótico. A incubação foi feita da mesma forma anterior. As culturas foram incubadas até que atingissem $DO_{600} \approx 0,6$; sendo então adicionado 0,25 mM de IPTG (Fermentas). As células foram incubadas por 2 horas para LicNTPDase-1 e 1 hora para LicNTPDase-2 nas mesmas condições anteriores.

5.7. Purificação das LicNTPDase-1 e 2 recombinante expressas em sistema bacteriano

Após a indução, a cultura foi fracionado em alíquotas de 100 mL em tubos cônicos e centrifugados 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 sedimento 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 µg/mL de aprotinina, 1 µg/mL de pepstatina e 1 µg/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 x *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 de tris pH 7,2, 500 mM NaCl, 10 mM de β-mercaptoetanol e 2 M de uréia). Após a lavagem o precipitado foi então solubilizado com 12 mL de tampão contendo 8 M de uréia (50 mM tris pH 7,2, 500 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoetanol e 8 M de uréia) seguindo o protocolo descrito na referência [87]. Alterando apenas o uso do Triton – X 100 que foi abolido no presente protocolo. Para aumentar a solubilização dos corpos de inclusão as amostras foram incubadas por 10 minutos a 60°C [35]. Os 12 mL de 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: Tampão “A” (50 mM de tris, 100 mM de NaCl, 8M de ureia e 5 mM de imidazol) e o tampão “B” (50 mM de tris, 100 mM de NaCl, 8M de ureia e 250 mM de imidazol), sendo o primeiro tampão para promover interação da resina com as proteínas e o segundo para fazer a eluição das proteínas que interagiram com a resina da coluna. As purificações foram feitas em 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 1,4 mL, sendo coletados as proteínas recombinantes na fração 2. Estas amostras foram alíquotas em frações de 100 µL e estocada no freezer a -80°C.

5.8. Renaturação das proteínas purificadas

5.8.1. Protocolo padrão

Nesta parte do trabalho será usado alguns protocolos de renaturação diferentes. No protocolo padrão usado é quase todos os experimentos a enzima purificada é diluída 10 vezes em tampão de atividade 1X (50 mM HEPES pH 7,2, 50 mM tris pH 7,2, 116 mM NaCl, 5 mM KCl e 5 mM MgCl₂) mais 1 mM de L-Glutationa oxidada (GSSG) e 2 mM L-Glutationa reduzida (GSH). Após a diluição as amostras são incubadas sem agitação a 4° por 24 horas e somente depois são utilizadas nos experimentos.

5.8.2. Renaturação segundo (Manque, 2012) com modificações

As proteínas purificadas foram renaturadas através de diálise em 2 etapas. Na primeira etapa foi usado um volume de tampão 50 vezes maior do que o volume da amostra sendo o tampão constituído de 100 mM Tris, pH 8.0, 1 M L-arginina, 2 mM EDTA, 1 mM GSH, 0.1 mM GSSG e 5% glycerol. As amostras foram mantidas neste tampão por ~16 horas a 4°C com agitação. Após as 16 horas a amostra foi dialisada novamente em um volume de tampão 200 vezes maior do que o volume de amostra por mais ~16 horas, nesta etapa o tampão usado foi o tampão de atividade 1X [88]. Ambas etapas de diálise foram feitas com apenas uma troca de tampão.

5.8.3. Renaturação segundo (Murphy, 2003 e Manque, 2012) com adaptações

Terceiro protocolo as amostras purificadas foram diluídas 10 vezes no tampão de atividade 1 X contendo 1 mM GSSG, 2 mM L-GSH, 2 mM cloreto de cálcio e 1M L arginina. Amostras foram incubadas por 48 horas a 4°C. Em seguida as amostras foram dialisadas em um volume de tampão 200 vezes maior do que o volume de amostra por mais ~16 horas, nesta etapa o tampão usado foi o tampão de atividade.

Este protocolo é uma adaptação dos 2 anteriores mais alguns detalhes observados no artigo [36, 88]. A etapa de diálise foi feita com apenas uma troca de tampão.

5.9. Dosagem de atividade nucleotidásica das Lic NTPDases expressas em *E. coli*

Os ensaios foram feitos em microtubo de 1,5 mL com volume final de reação de 200 μ L a 37°C. Os tubos foram 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 1 mM de substrato (ATP, ADP, GTP, GDP, UTP e UDP). Os microtubos foram colocados na incubadora e deixada por 5 minutos para equilibrar a temperatura (37°C), a reação sempre era iniciada com adição da enzima na concentração de 0,5-1 μ g e interrompida com adição de 200 μ L do reagente colorimétrico após 10 minutos de incubação para LicNTPDase-2 e 20 minutos para LicNTPDase-1.

Para o ensaio de determinação de preferência de cátion, foi usado tampão com diferentes concentrações de cloreto de cálcio ou cloreto de magnésio. A medida da atividade enzimática foi feita através da dosagem de fosfato inorgânico liberado na hidrólise. Após a adição do reagente colorimétrico 200 μ L de reação de cada tubo foi transferido para uma microplaca de 96 poços e fazendo a leitura em 630 nm, usando para isso uma leitora de microplaca. Para a conversão de absorbância em nmol de fosfato, foi feito uma curva padrão de fosfato a partir de uma solução estoque de Na₃PO₄ 12H₂O 1,5 mg/mL e o reagente colorimétrico foi preparado conforme a referência [89].

5.10. Testes de expressão das LicNTPDases nas células COS-7

Inicialmente as células COS-7 foram descongeladas e mantidas em cultura por duas passagens antes de fazer a transfecção. Para manutenção e repique destas células foi seguido as indicações da ATCC [90].

Para a expressão das LicNTPDases, a transfecção de COS-7 foi feita usando lipofectamina (GibcoBRL: 2 mg/ml), sendo a transfecção feita em placas de 24 poços (P.24) ou em placas de 10 cm de diâmetro (P.10).

As placas foram preparada com 48 horas de antecedência. Foi adicionado 2 x 10⁵ células por poço na placa P.24 ou 1,5 x 10⁶ células na placa P.10. Após as 48

horas, foi feita a transfecção usando 250 ng de DNA por poço para placa P.24 ou 6µg por placa P.10. Inicialmente o DNA foi diluído em água para ajustar a concentração do DNA para 250 ng/µL, quando a transfecção foi feita em placa P.24 ou 1 µg/µL quando a transfecção foi feita em placa P.10. Com o DNA diluído foi feito a solução “A” usando 1 µL de DNA mais 24 µL de DMEM para transfecção em P.24 ou 6 µL de DNA mais 244 µL de DMEM para transfecção feita em P.10. Logo em seguida foi preparado a solução “B”, 1 µL de lipofectamina mais 24 µL de DMEM para transfecção em P.24 ou 24 µL de lipofectamina mais 926 µL de DMEM para transfecção feita em P.10. As soluções A e B foram misturadas posteriormente, sem uso de vortex e incubadas sem agitação por 45-60 minutos em temperatura ambiente.

Antes de fazer a transfecção as células foram lavadas 3 vezes com meio DMEN para remover o soro fetal bovino e logo em seguida foram colocadas na estufa 37°C, 5% CO₂. Após a incubação da lipofectamina com DNA, foi feito a remoção do meio da placa e adicionados 450 µL por poço de DMEN novo para placa P.24 ou 4,8 mL por placa P.10. Logo em seguida foi adicionados 50 µL da solução A+B por poço da placa P.24 ou 1,2 mL por placa P.10. O material foi homogeneizado e colocado na estufa 37°C, 5% de CO₂ por 5 horas. Após 5 horas, o meio de transfecção foi removido e foi adicionado novo meio DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino e 2 mM de glutamina. As células foram colocadas na estufa a 37°C, 5% CO₂ e cultivadas por 3 dias. Após os 3 dias as amostras foram usadas para preparar extrato proteico ou foi feita a atividade enzimática diretamente na P.24 [39].

5.11. Obtenção de extrato de proteína de células COS-7 para teste de atividade

As células usadas no experimento de transfecção foram inicialmente a células COS-7 foram lavadas 3 vezes com tampão Tris-salina gelado a 4°C (45 mM Tris e 95mM NaCl pH 7,5). Este passo é extremamente importante para eliminação de fosfato inorgânico, já que na dosagem de atividade será medido a liberação de fosfato pela hidrólise de nucleotídeos. Em seguida as células foram removidas usando “scrap”. Para esta remoção foi adicionado 1 mL de tampão Tris-salina contendo inibidor de protease (0,1 mM PMSF). Após completa remoção das células

da placas, a amostra foi colocada em um tubo cônico de 15 mL e centrifugada a 520 x g por 10 minutos a 4°C. Foram feitas mais duas lavagens adicionais usando Tris-salina mais inibidor de protease (0,1 mM PMSF). Após a lavagem as células foram ressuspenas em 1 mL de tampão Tris-salina contendo inibidores de protease (0,1 mM PMSF e 10 µg/mL de aprotinina) e logo em seguida foram sonicadas em 4 ciclos de 1 segundo com intervalo de 1 segundo, usando 10 watts de potência, sempre no gelo. O lisado foi transferido para microtubo de 1,5 mL e centrifugado a 300 x g por 10 minutos a 4°. O sobrenadante desta centrifugação foi coletado e usado para a dosagem de proteína e logo em seguida foi adicionado 7,5% de glicerol e a amostra foi estocada no freezer -80°C [39].

5.12. Dosagem de atividade nucleotídica das Lic NTPDases expressas em células COS-7

A atividade das LicNTPDases em célula COS-7 foi feita usando os mesmos procedimentos usados para enzima expressa em *E. coli* e purificada. As diferenças são apenas em alguns detalhes descritos a seguir.

Para os ensaios feitos em placa de 24 poços a atividade foi feita diretamente na placa e com as células intactas. Após o preparo das células foi adicionado 500 µL do tampão de atividade e adicionado os nucleotídeos de interesse. A placa foi incubada a 37° por 20 minutos e logo em seguida a reação foi parada usando o reagente colorimétrico. Posteriormente o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 10.000 x g e logo em seguida foi feita a leitura seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente.

Para os ensaios feitos com extrato de célula COS-7, o experimento seguiu da mesma forma descrita acima. Alterando apenas o tempo de atividade e diluição da amostra entre as duas enzimas. Para a LicNTPDase-1 os ensaios foram feitos em 20 minutos e o extrato de COS-7 foi diluído apenas 2 vezes. Já para LicNTPDase-2 os ensaios foram feitos em 10 minutos e o extrato de COS-7 foi diluído 10 vezes para poder fazer o experimento. Extrato de COS-7 não transfectado foi usado como controle deste experimento.

5.13. Quantificação de proteína

O método usado para determinação da concentração de proteína foi o método de Bradford [91], 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. Para efetuar os cálculos de concentração da proteína, foi feito uma curva padrão de soro albumina bovina (BSA), variando a concentração de BSA 0,725-0,0906 mg/mL. 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) dissolvida em H_2O (Sigma).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As E-NTPDases 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, via modulação da sinalização purinérgica dos hospedeiros e por consequência modulação da resposta imune e via auxílio na adesão celular entre as células do hospedeiro e o parasito [14, 16-18, 64, 67-69, 75, 88, 92]. Outra grande importância destas enzimas é a possibilidade de 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 [16, 71].

Com o intuito de ampliar os conhecimentos sobre estas enzimas e seu papel nas infecções causadas por *Leishmania infantum chagasi*, nosso grupo de pesquisa vem estudando as duas isoformas destas enzimas. Neste capítulo os estudos se concentram na avaliação de diferentes condições de armazenamento, renaturação e expressão das LicNTPDase-1 e 2 de *L. infantum chagasi* em um sistema de expressão em procarioto (*E. coli* BL21 / pET21b) e um sistema de expressão em célula de mamífero (COS-7).

O primeiro problema enfrentado pelo nosso grupo com relação a estas enzimas é a estabilidade das enzimas purificada. Como pode ser visto na figura 6 estas enzimas perdem a capacidade de hidrolisar nucleotídeos poucos dias após a renaturação, quando armazenadas a 4°C, o protocolo de renaturação usado neste experimento foi o protocolo que foi chamado de protocolo padrão, por ser o protocolo que é usado a mais tempo nos ensaios (tabela 2). Neste resultado foi observado que a LicNTPDase-1 apresenta uma perda de atividade 72 horas após a renaturação e a LicNTPDase-2 já apresenta uma redução na atividade 24 horas após a renaturação. Ambas enzimas perderam parcialmente a atividade (figura 12). A escolha do GTP para fazer o teste, foi por sabermos que a LicNTPDase-1 tem preferência por este nucleotídeo [76]. Desta forma tínhamos certeza que iramos obter atividade para ambas as enzimas.

Tabela 2: Protocolos de renaturação		
Protocolo	Ponto principal do protocolo	Referência
Renaturação Padrão	Proteína purificada é diluída na proporção 1:10 em tampão de atividade contendo L-glutathione reduzida e oxidada	
Renaturação segundo (Manque, 2012)	É feita duas etapas de diálise da proteína purificada. Na primeira etapa a proteína é dialisada em um tampão contendo L-glutathione reduzida e oxidada e L-arginina. A segunda etapa é feita para eliminar o tampão da etapa anterior que possui altas concentrações de L-arginina	[88]
Renaturação segundo (Murphy, 2003 e Manque, 2012) com adaptações	Proteína purificada é diluída na proporção 1:10 em tampão de atividade contendo L-glutathione reduzida e oxidada e L-Arginina. Após a renaturação a proteína é dialisada para remover o tampão de renaturação.	[36, 88]

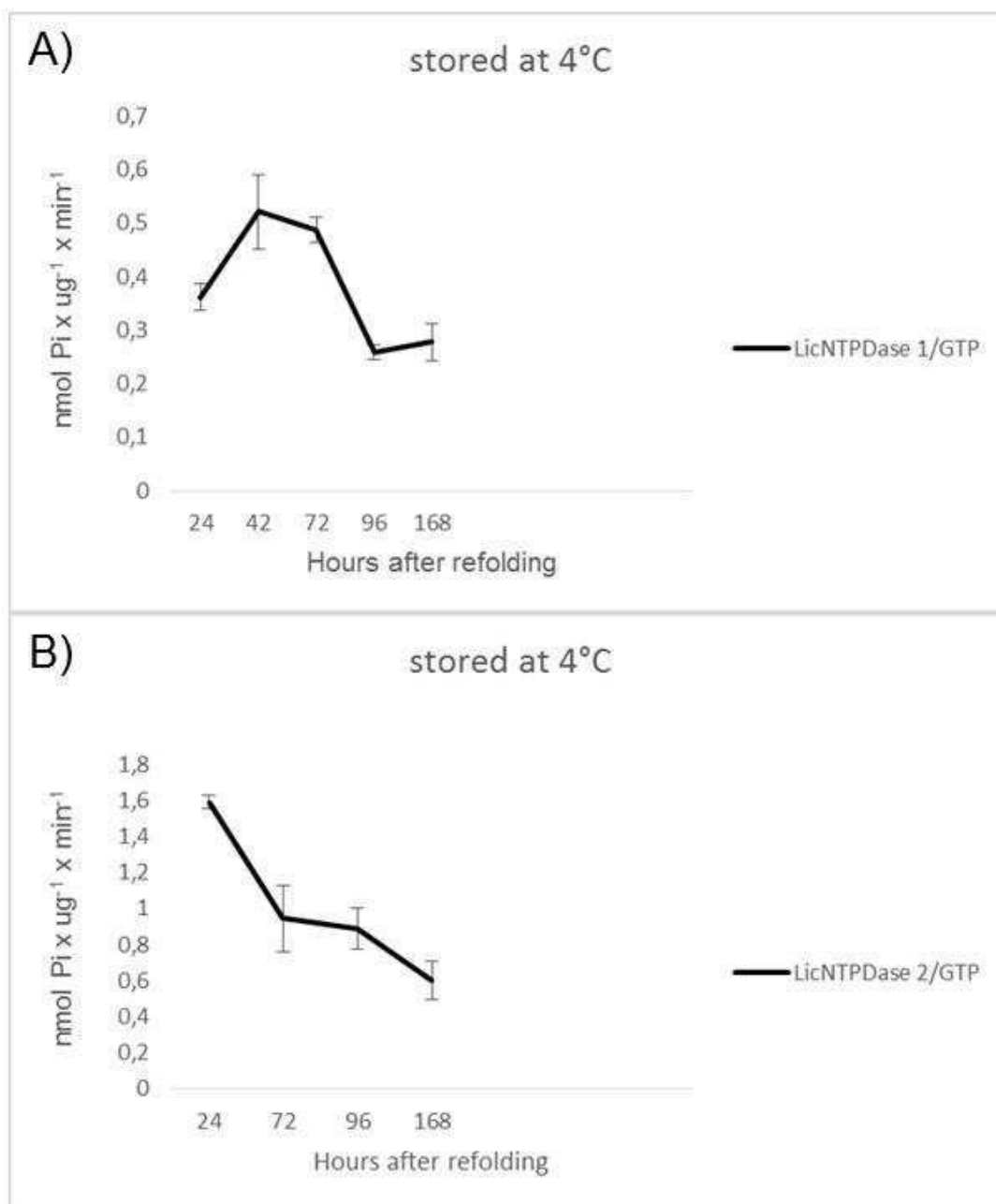


Figura 12: Teste de armazenamento a 4°C das enzimas purificadas após a renaturação.
 A) Atividade GTPásica da LicNTPDase-1 após a renaturação. B) Atividade GTPásica da LicNTPDase-2 após a renaturação.

Para tentar contornar este problema, inicialmente tentamos congelar a proteína a -30°C após a renaturação, mas observamos que a perda da atividade era ainda maior. As enzimas praticamente perdiam toda atividade (dados não mostrados). A segunda tentativa foi congelar as amostras a -30°C antes da renaturação. Desta forma as enzimas foram purificadas, alíquotadas e logo em seguida congeladas. As amostras foram então descongeladas, renaturada com o protocolo padrão (tabela 2) e a atividade feita 24 horas após a renaturação e ao longo do tempo (figura 13). Com este procedimento foi possível observar que a LicNTPDase-1 apresentou atividade por período de 23 dias (figura 13: A), já a LicNTPDase-2 foi estável por 129 dias após a purificação (figura 13: B), sendo este o tempo máximo de análise, pois os estoques de amostras acabaram e foi necessário fazer novas purificações.

Na verdade ambas as enzimas mantiveram a atividade durante um período superior a 129 dias, mas para LicNTPDase-1 enfrentamos outro problema. O protocolo de renaturação usado parecia não ser o mais adequado. Por este motivo nem sempre foi possível medir a atividade da LicNTPDase-1 após a renaturação, já que a atividade era baixa. Contudo o fato de conseguirmos armazenar as enzimas após purificação já é um grande avanço para os experimentos futuros e para possíveis uso das enzimas em testes de diagnósticos ou vacinas ou busca por droga, já que esta metodologia possibilita o uso de uma mesma amostra em uma batelada de testes.

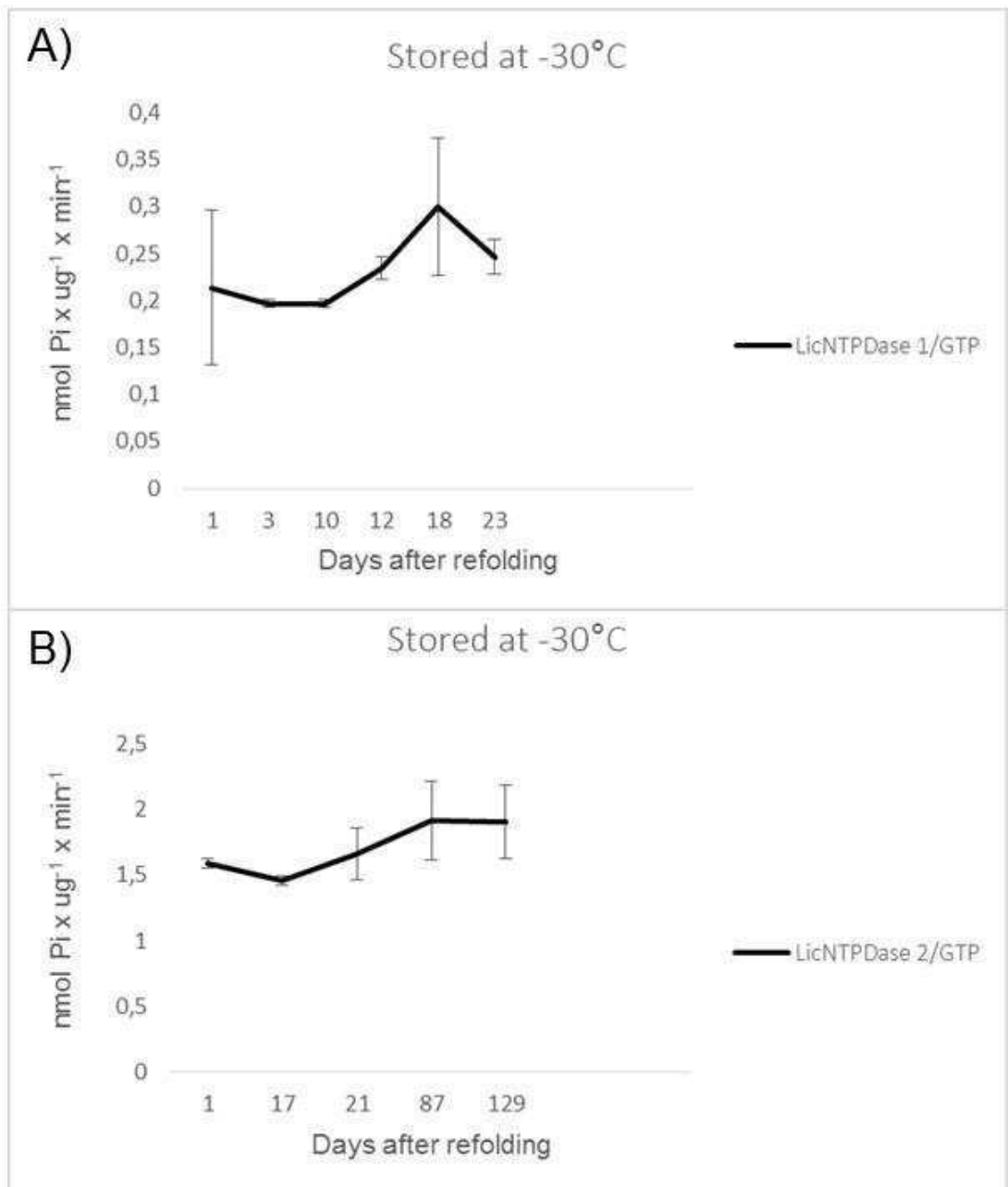


Figura 13: Teste de armazenamento a -30°C. Neste teste as enzimas purificadas foram armazenadas antes da renaturação, sendo armazenadas no tampão de eluição. A) Atividade GTPasica da LicNTPDase-1 após a renaturação. B) Atividade GTPasica da LicNTPDase-2 após a renaturação. Neste teste a enzima sempre foi renaturada 24 horas antes do teste de atividade.

Como comentado acima, durante boa parte dos experimentos foi verificado que a LicNTPDase-1 não apresentava uma boa capacidade de hidrolisar os nucleotídeos, os valores da atividade obtidos ficavam muito próximos do branco o que aumenta muito a chance de erro e por isso exige um número maior de ensaios para obter resultados consistentes (figura 14). Mesmo tendo esta dificuldade, foi possível fazer alguns testes e verificar que a renaturação estava funcionando, sendo usado o protocolo padrão (tabela 2).

Nestes experimentos foi verificado que a LicNTPDase-1 foi capaz de hidrolisar todos nucleotídeos tri e difosfatados, apresentando maior atividade para os nucleotídeos trifosfatados e GDP e menor capacidade para hidrolisar ADP e UDP (figura 14). Além disto, foi avaliado a preferência da LicNTPDase-1 por cálcio ou magnésio (figura 15). Neste experimento foi verificado que não existe diferença entre a atividade na presença de cálcio ou magnésio. Verificou-se também que a atividade da enzima é dependente da presença de cátions e que a concentração deste cátion influencia diretamente na atividade. Estes resultados comprovam que esta enzima é uma legítima NTPDases [10]. Neste trabalho não foram feitas estas mesmas análises para LicNTPDase-2, porque a análise referente a LicNTPDase-2, já está mais avançada e será publicada em breve em outro trabalho (Anexo-1).

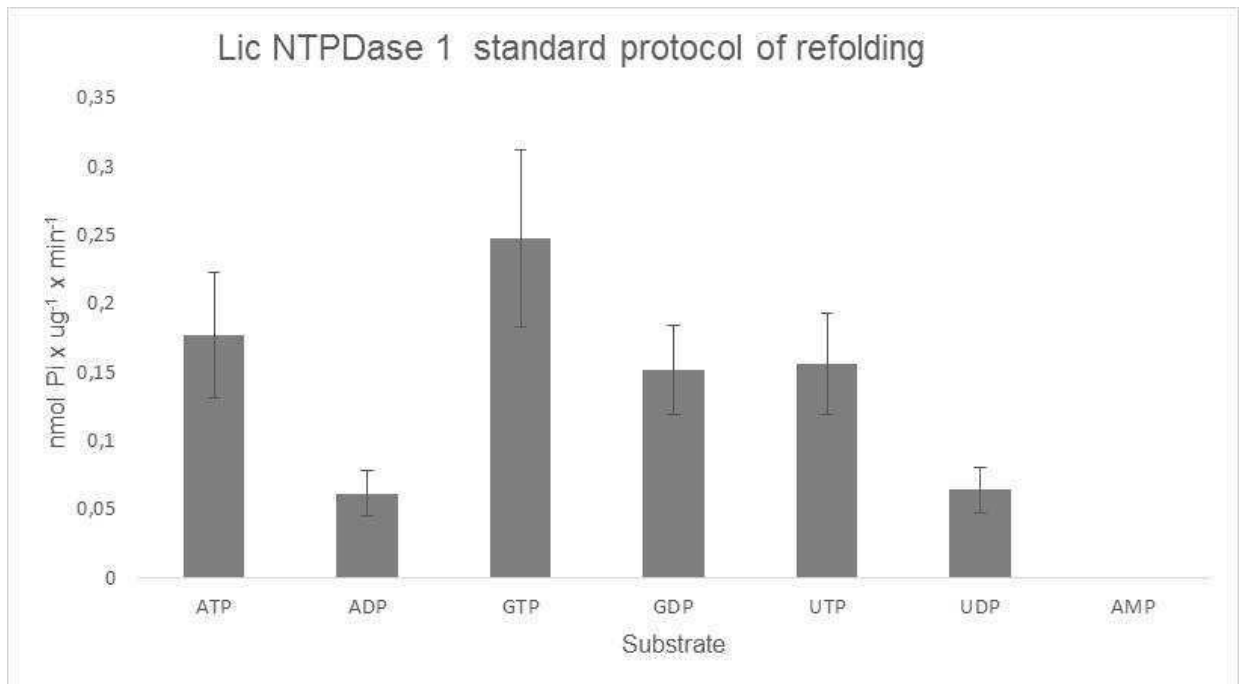


Figura 14: Dosagem da atividade da LicNTPDase-1 para diferentes substratos. Para este experimento a enzima foi renaturada usando o protocolo padrão de renaturação apresentado na metodologia e na tabela 2. Este experimento foi repetido 3 vezes para todos nucleotídeos, exceto para AMP que foi testado apenas 1 vez.

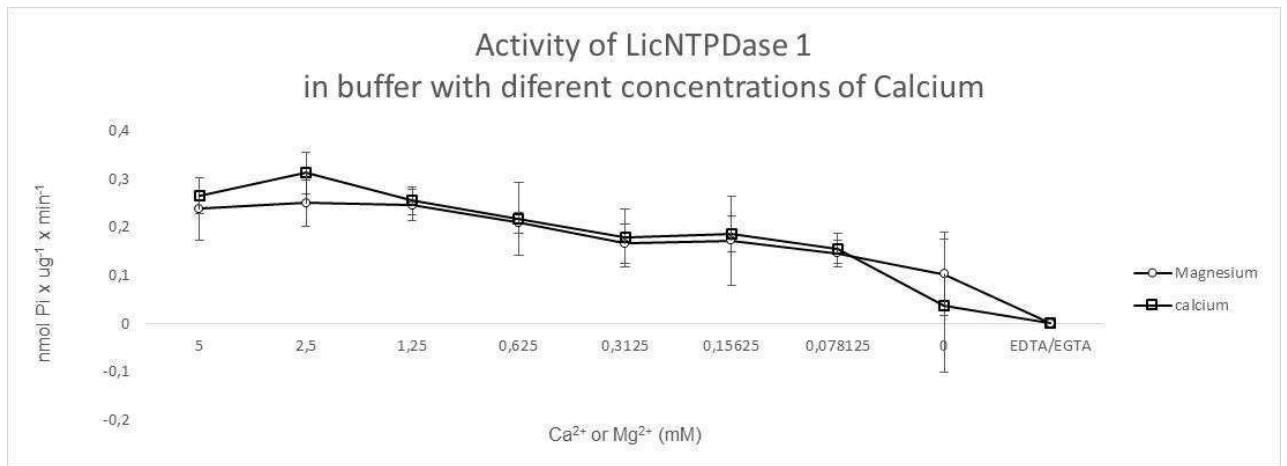


Figura 15: Dosagem da atividade GTPásica da LicNTPDase-1 em diferentes concentrações de cálcio ou magnésio. Para este experimento a enzima foi renaturada usando o padrão de renaturação apresentado na metodologia e na tabela 2. Sendo que foi removido o cloreto de magnésio do tampão de renaturação para podermos determinar a participação de cátions na atividade enzimática. Este experimento foi repetido 2 vezes.

O próximo passo para o estudo da LicNTPDase-1 seria a determinação do K_m para os diferentes substratos, mas neste momento observamos que teríamos de mudar o protocolo de renaturação da enzima, já que a atividade era muito baixa e isso seria um problema na determinação do K_m , devido a limitações do método de dosagem de atividade. Na busca por métodos alternativos de renaturação, encontramos um artigo recente que demonstrou bons resultados com uma apirase recombinante de *Cryptosporidium* [88]. Neste artigo a enzima recombinante foi expressa e purificada em condições similares a que usamos com diferença no protocolo de renaturação que consiste em duas etapas de diálise a primeira contendo L-arginina e L-glutathiona oxidada e reduzida e uma segunda diálise para remover este compostos (segundo protocolo apresentado na metodologia e na tabela 2) [88]. Desta forma este protocolo foi usado para a renaturação das duas LicNTPDases, resolvemos usar a LicNTPDase-2 também para que ela servisse de controle do novo protocolo (tabela 2). Em um primeiro teste verificamos que ambas as recombinantes precipitavam ao final da segunda etapa de diálise. Em seguida fizemos diversas alterações no tampão da segunda diálise que continha apenas 20 mM de MOPS pH 7,4, sendo que testamos concentrações diferentes de cloreto de sódio, testamos substituir o MOPS por Tris. Para LicNTPDase-1 foi possível eliminar o problema da precipitação quando usamos 50 mM de Tris, pH 8 e 300 mM de cloreto de sódio ou quando usamos o tampão de atividade para substituir o MOPS, mas não foi observada melhoria na atividade. Já para a LicNTPDase 2 não conseguimos eliminar ou reduzir a precipitação.

Na busca por alternativas encontramos um outro artigo mais antigo que trabalhou com expressão da NTPDase 6 humana recombinante, expressa em *E. coli* [35]. O protocolo usado neste trabalho contém alguns detalhes similares ao protocolo que nosso grupo usava inicialmente e alguns detalhes do novo protocolo que testamos, por este motivo resolvemos fazer algumas alterações e montamos um terceiro protocolo de renaturação (tabela 2). Com este novo protocolo conseguimos superar o problema da precipitação causada na etapa de diálise. No entanto para LicNTPDase-1 ainda não conseguimos obter uma enzima mais ativa, mas para LicNTPDase-2 verificamos aumento de mais de 10X na e hidrólise. Contudo a capacidade de hidrolisar os nucleotídeos foi mantida (figura 16). Este dado sugere que o novo protocolo aumentou a eficiência de renaturação da LicNTPDase-2 ou seja possivelmente conseguimos em uma mesma amostra uma

proporção maior de enzima com conformação adequada. A L-arginina usada neste novo protocolo provavelmente foi o componente crucial para a melhoria da renaturação, visto que a diferença básica entre o protocolo padrão e o novo é a adição da L-arginina.

Apesar de ser usado em diversos protocolos de renaturação a ação exata da L-arginina não é conhecida, mas uma das hipóteses sugeridas é que a L-arginina interage com a proteína desnaturada, diminuindo a interação entre as proteínas e evitando a agregação durante a renaturação. O que por sua vez favorece um dobramento correto da proteína recombinante [93].

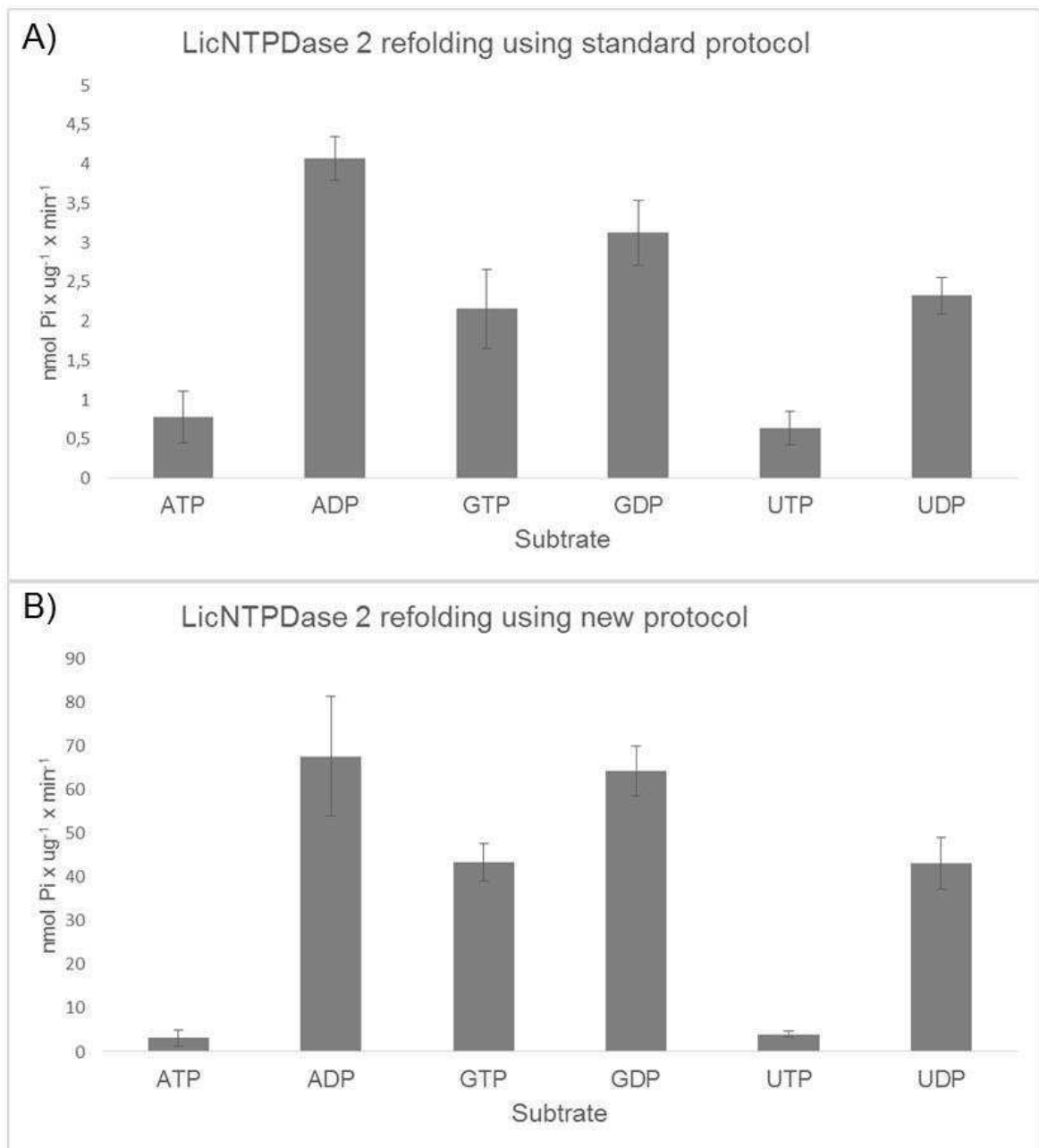


Figura 16: Dosagem da atividade da LicNTPDase-2 em diferentes protocolos de renaturação. A) A enzima purificada foi diluída 10 vezes em tampão de atividade 1X contendo 1 mM de L-glutaciona oxidada e 2 mM L-glutaciona reduzida. A amostra foi incubada a 4°C por 24 horas. B) A enzima purificada foi diluída 10 vezes em tampão de atividade 1X contendo 1 mM de L-glutaciona oxidada, 2 mM L-glutaciona reduzida, 2mM CaCl₂ e 1 M L-arginina. A amostra foi incubada a 4° por 48 horas e logo em seguida dialisada por mais 48 horas usando 200 volumes de tampão de atividade sem L-glutaciona e L-arginina.

Após várias tentativas com diferentes protocolos de renaturação, verificamos que não foi possível melhorar a atividade da isoforma LicNTPDase-1. Assim uma alternativa seria a expressão da LicNTPDase-1 em célula de mamífero como a linhagem COS-7. Vários grupos de pesquisa usam célula COS-7 para expressão de NTPDases [34, 37, 39, 41, 94]. Esta linhagem de célula possui uma baixa expressão de ecto-nucleotidase em sua superfície o que facilita os estudos com NTPDases e por ser uma célula de mamífero ela possui maquinaria para fazer as modificações pós-traducionais adequadas. Para isso foi feita a construção pcDNA 3 mais o gene da LicNTPDase-1 ou 2.

Esta construção foi feita no centro de pesquisa “Centre hospitalier universitaire de Québec” (CHUQ) em Quebec Canadá, em colaboração com o grupo de pesquisa coordenado pelo professor Dr Jean Sévigny. Os experimentos para montagem das construções foram feitos pelo estudante de Graduação Lucas Barreto e o profissional de Pesquisa Alain Tremblay. Para esta clonagem foi usado a porção da transmembrana N terminal da NTPDase-1 de camundongo com intuito de garantir que ambas enzimas fossem expressas e estivessem presentes na membrana da COS-7 [39]. Optamos por usar esta transmembrana, porque no laboratório já havia sido testado a expressão da NTPDase-1 de camundongo [39]. Sendo inclusive a NTPDase-1 de camundongo usada como controle positivo do teste piloto da expressão das LicNTPDases em COS-7.

Após a confirmação da clonagem, foi feito o primeiro teste de expressão das LicNTPDases em COS-7, logo em seguida verificamos se as enzimas expressas estavam ativas, o que nos deu um resultado positivo para ambas as enzimas. Com este teste foi possível finalmente obter uma boa atividade da LicNTPDase-1. Onde a atividade da amostra teste era mais do que 15% maior do que o branco, o que permite ter maior segurança na análise do resultado. Foi possível verificar também que a atividade observada na enzima expressa em *E. coli* é bem diferente da atividade observada na enzima expressa em COS-7. A LicNTPDase-1 expressa em bactéria é capaz de hidrolisar ATP, GTP, GDP e UTP com mesma intensidade. Enquanto a LicNTPDase-1 expressa em COS-7, hidrolisa mais GDP>ATP>UDP>GTP, sendo que a atividade para GDP é o dobro da atividade obtida para ATP que por sua vez é o dobro da atividade obtida para UDP e que por sua vez é o dobro da atividade obtida para GTP, a atividade para ADP e UTP foram muito baixas, vale lembrar que estamos comparando a atividade de diferentes

substratos na mesma concentrações, sendo que não podemos determinar no momento o substrato preferencial desta enzima, já que não fizemos os testes de cinética enzimática. Este dado sugere que esta enzima pode necessitar de alguma modificação pós-traducional importante para a atividade nucleotídásica e que esta modificação é ausente ou feita de forma inadequada em sistema bacteriano.

Por outro lado a LicNTPDase-2 apresentou um padrão de atividade bem similar entre a enzima expressa em *E. coli* e a enzima expressa em COS-7. Estes resultado indica que conseguimos obter uma renaturação adequada para enzima expressa em sistema bacteriano e provavelmente esta enzima não possui modificações pós-traducionais importantes para sua atividade. Além disto este resultado nos dá segurança com relação a caracterização da enzima expressa em sistema bacteriano (figura 17). É importante ressaltar que estes testes foram feitos com extrato proteico de COS-7, o que nos indica que a atividade especifica seria muito maior caso estivéssemos trabalhando com uma enzima purificada.

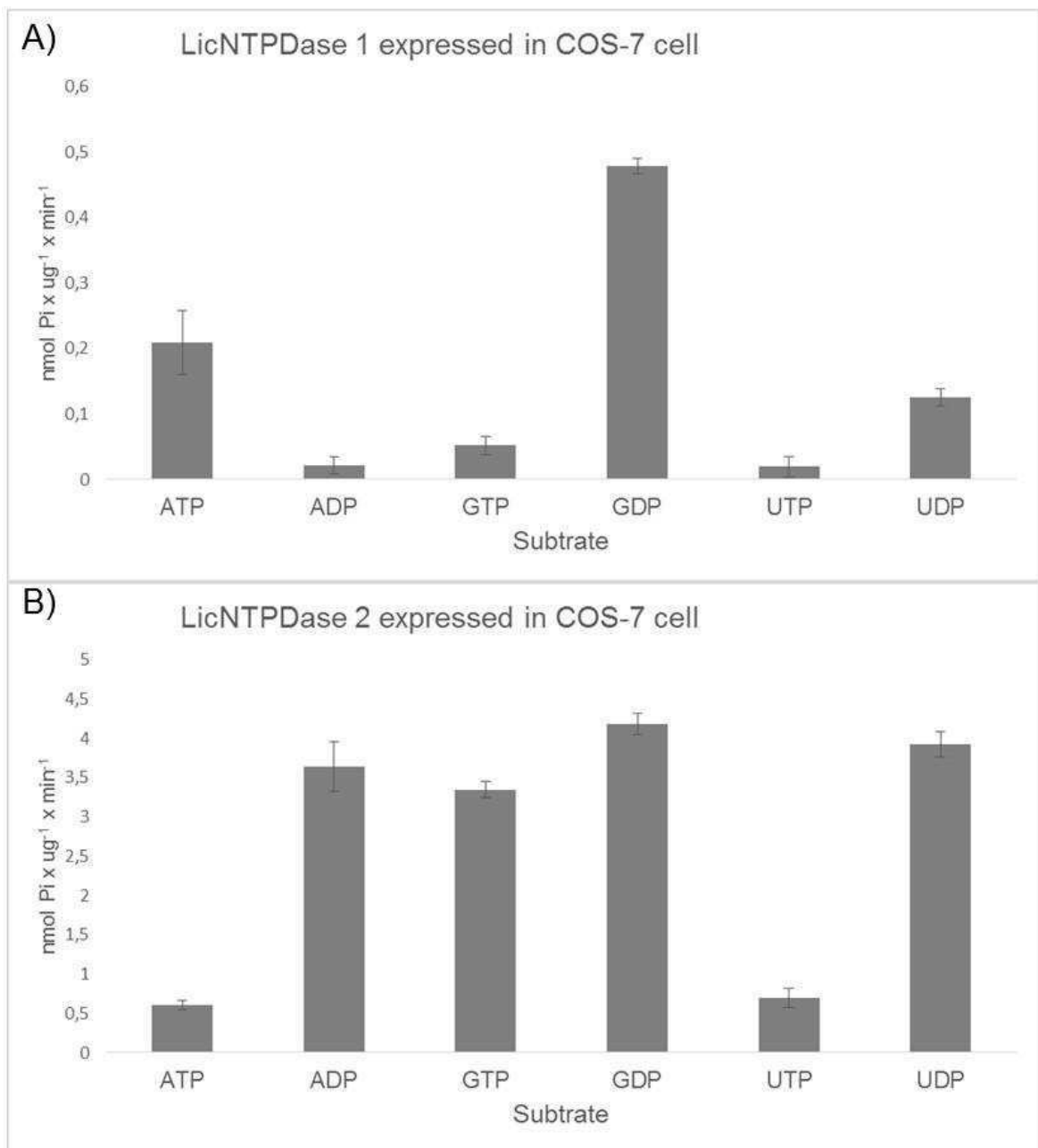


Figura 17: Dosagem da atividade das LicNTPDases expressa em COS-7. A) Dosagem da atividade da LicNTPDase-1 usando diferentes substratos. B) Dosagem da atividade da LicNTPDase-2 usando diferentes substratos. Este experimento foi repetido 2 vezes. Para ambos os testes a atividade representada nos gráficos é a diferença entre a atividade obtida para extrato de COS-7 transfectada com pCDNA 3 mais LicNTPDases menos a atividade obtida para extrato de COS-7 não transfectada.

7. CONCLUSÕES

No presente capítulo foi possível fazer diversas análises comparativa entre as diferentes condições de expressão e renaturação das LicNTPDases recombinantes. Foi possível verificar que a LicNTPDase-2 recombinante é uma enzima mais fácil de trabalhar quando comparado com a LicNTPDase-1, mas ainda é possível melhorar as condições de trabalho para ambas as enzimas. Desta forma poderemos obter dados cada vez melhores sobre estas enzimas. Dentro destas análises foi possível verificar:

Para o estudo de expressão heteróloga das LicNTPDases foi possível concluir:

- As enzimas foram expressa e purificadas com sucesso. Também foi possível otimizar as condições de armazenamento das enzimas purificadas, o que irá facilitar os trabalhos futuros com estas enzimas.
- Foi possível expressar ambas as enzimas em célula de mamífero COS-7
- A expressão da LicNTPDase-1 em *E. coli* pode não ser a melhor opção, já que vimos que a atividade da enzima é mais intensa e estável quando a enzima foi expressa em célula COS-7. No entanto a enzima expressa em bactéria apresenta atividade para todos nucleotídeos tri e difosfatados e é dependente de cátions o que nos dá respaldo para afirmar que está é uma legitima NTPDase.
- Para LicNTPDase-2, foi possível verificar que a atividade da enzima expressa em *E. coli* é similar a da enzima expressa em COS-7. Estes resultados sugerem que o modelo de expressão bacteriano é um bom modelo para trabalhar com esta enzima e que modificações pós-traducionais ausentes em *E. coli* e presente em COS-7 não devem afetar de forma significativa a atividade nucleotidásica. No entanto foi verificado também que apesar do protocolo de renaturação inicial funcionar ainda é possível otimizar as condições de renaturação desta enzima, já que conseguimos aumentar a atividade da enzima em mais de 10 vezes quando alteramos o protocolo de renaturação.

8. CAPITULO 2:

Avaliação do efeito das LicNTPDases recombinantes na expressão de purino receptores P2 e na infecção de macrófagos da linhagem RAW 264.7 por *L. infantum chagasi*

8.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Os objetivos desta parte do trabalho foram avaliar o efeito das LicNTPDase-1 e 2 recombinantes no processo de infecção de macrófagos, além de avaliar se estas enzimas podem participar do mecanismo de adesão do parasito às células hospedeiras.

Também foi avaliado o efeito das proteínas recombinantes sobre a expressão de purino receptores P2 e assim tentar identificar se estas enzimas podem estar agindo sobre um ou mais receptor P2.

9. MATERIAL E MÉTODOS

9.1. Organismos usados nos experimentos

Para elaboração deste trabalho foram utilizadas duas cepas de *Escherichia coli*, DH5 α que foi usado nos ensaios de clonagem e BL21 codon plus-RIL (STRATAGENE) que foi usado nos ensaios de expressão heteróloga. Para os testes “in vitro” foram usados macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 e *L. infantum chagasi* (cepa M2682), *L. braziliensis* (cepa M2904) e *L. amazonensis* (cepa PH 8). As cepas de *Leishmania* foram cedidas pelo grupo coordenado pelo professor Dr Luís Carlos Croco Afonso do Laboratório de Imuno Parasitologia da Universidade Federal de Ouro Preto.

9.2. Cultivo de macrófagos

Os macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram cultivadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. O meio usado foi o RPMI-1640 (Sigma), pH 7,2, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (LGC Biotecnologia), 2mM de L-glutamina (Serva), 2 g/L de bicarbonato de sódio, 100 μ g/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina (USB Corporation). Toda metodologia seguirá o descrito no trabalho [95].

9.3. Cultivo de *Leishmania*

Os parasitos foram cultivados a 25°C em meio Grace's (Sigma-Aldrich), pH 6,5, suplementado com 10 % de soro fetal inativado (LGC Biotecnologia), 2 mM de L-glutamina (Serva), 100 μ g/mL de penicilina (USB Corporation). Após o descongelamento e recuperação das células, os repiques foram feitos com intervalos de 4-5 dias. Para ensaios de infecção, o cultivo foi estendido até o 7° dia de cultura para obtermos um maior número de promastigotas metacíclicas.

9.4. Western blotting com extrato proteico de diferentes espécies de *Leishmania*

Para o “western-blotting” foi feito inicialmente um SDS-PAGE 10%, onde as amostras foram aplicadas. Após a eletroforese, foi feito o “blotting” em membrana de nitrocelulose (GE). Após o “blotting”, a membrana foi bloqueada “over night” a 4°C em PBS contendo 3% de soro albumina bovina. No dia seguinte a membrana foi lavada 3 vezes com PBS contendo 0,05% Tween 20. Após a lavagem, a membrana foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente com anticorpo anti-LicNTPDase-2 produzidos em coelho [86]. Para marcar o anticorpo anti-LicNTPDase-2 foi usado o anti-IgG de coelho produzido em camundongo conjugado FITc (Sigma). Ambos anticorpos foram diluídos em PBS contendo 0,05% de Tween 20 [85]. Após as etapas de lavagens e incubação descritas, foi feita a avaliação do resultado usando o foto documentador de fluorescência FLA 5100 (Fujifilm®).

Para fazer este experimento, o precipitado de 10 mL de cultura de células de diferentes espécies de *Leishmanias* foram suspendidas em 0,5 mL de tampão de lise contendo inibidores de proteases (50 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 1 mg/mL de lisozima, 1µg/mL aprotinina, 1µg/mL pepstatina e 1µg/mL de leupeptina) e logo em seguida foram lisadas por choque térmico (6 ciclos de congelamento e descongelamento), estas amostras foram aplicadas em um gel SDS-PAGE 10% [85].

9.5. Ensaio de infecção “in vitro”

Inicialmente 2×10^5 macrófagos foram distribuídos em cada poço em placas de 24 poços contendo lamínulas esterilizadas. Estas células foram incubadas por 24 horas em estufa 37 °C, 5% de CO₂. Após o tempo de incubação as células foram lavadas com PBS esterilizado, eliminando as células mortas. Neste ponto foi adicionado 1µg/mL da LicNTPDase-1 ou 2 ou 1µg/mL de soro albumina bovina (controle). As células foram incubadas com ou sem as enzimas por 20 minutos. Após os 20 minutos, foi adicionado 1×10^6 de promastigotas totais de *L. infantum* chagasi por poço da placa, as células foram incubadas por 3 horas a 37 °C em 5% CO₂. Depois deste tempo os poços foram lavados novamente com PBS esterilizado para remover os parasitos que não aderiram aos macrófagos, logo em seguida as

células foram colocadas novamente na estufa e incubadas por 72 horas [64]. Por fim após as 72 horas as células foram lavadas 3 vezes com PBS esterilizado. As células foram fixadas na lamínula com metanol (1ml por poço). Posteriormente as lamínulas foram coradas com kit de coloração panótico. A quantificação da infecção foi feita pela contagem de 300 macrófagos por lamínula, onde foi verificado por microscopia se os macrófagos estavam ou não infectados, se estavam quantas amastigotas haviam no seu citosol.

Este mesmo teste foi usado para preparação de células e posterior extração de RNA para dosagem de expressão de receptores P2 por PCR em tempo real. A diferença entre os testes foram que no teste para extração de RNA foram usadas placas de 6 poços para termos um número maior de células, foi adicionado 1×10^6 macrófagos por poço. Os macrófagos foram infectadas (5×10^6 *L. infantum chagasi*) ou tratadas com $1 \mu\text{g/mL}$ de LicNTPDase-1 ou com LicNTPDase-2 ou não receberam nenhum tratamento para servirem de controle de expressão. As células foram coletadas após as 72 horas de incubação e preparadas para a extração do RNA.

9.6. Avaliação da expressão dos purino receptores por qPCR

Foram feitas extrações de RNA total das células coletadas nas condições citadas acima. Para extração do RNA foi usado o método Trizol (Invitrogen), onde foi adicionado 0,5 mL do reagente por poço de célula. Posteriormente o cDNA foi sintetizado através do uso do kit da superscript III (Invitrogen), todos os protocolos seguiram estritamente o recomendado pelo fabricante. A concentração do cDNA foi determinada usando o nanoDrop (Thermo). Cerca de 300 ng de cDNA foi usado para o qPCR com kit SYBR Green [13, 63]. O PCR foi feito seguindo o que foi feito por [13]. Os pares de primers utilizados estão na tabela 2. Todos os primers foram desenhados usando o software primer express (Applied), com exceção dos primers para P2X₇ e o controle 18S que foram retirados da literatura [13]. Para controle foi usado 3 genes endógenos; gene da beta-actina, gene da GAPDH e o gene da subunidade 18S ribossomal. Estes 3 controles foram escolhidos com base em dados da literatura.

Tabela 3: Primer usados no qPCR		
Nome do primer	Direção	Sequências
P2X ₁	FW	GCACTGTGAAGACGTGTGAGATCT
P2X ₁	RV	GCAGGGCTTGGGATCTTGT
P2X ₂	FW	GCATGGTGCAGCTGCTCAT
P2X ₂	RV	TTTCGCTATCCTGGTAGCTTTTCT
P2X ₃	FW	CACCGTGGAGATGCCTATCA
P2X ₃	RV	GAAGAGAGGGAAACGGATGCT
P2X ₄	FW	CTACAATTTTCAGGTTTGCCAAGTACT
P2X ₄	RV	GGTGAGTGTGCGTTGCTCAT
P2X ₅	FW	TGGCAAGGCGGGAAAAT
P2X ₅	RV	CCGGAACCAATGTTGATGACT
P2X ₆	FW	GACTGCTGTCCCCAGTACTCCTT
P2X ₆	RV	AGTGATTGGCTGTCCTGAAGTTG
P2X ₇	FW	CCTACATTAGCTTTGCTTTGGTGA
P2X ₇	RV	GCTCTTTCCGCTGGTACAGC
P2Y ₁	FW	GCAGAATGGAGACACGAGTTTG
P2Y ₁	RV	GGGATGTCTTGTGACCATGTTACA
P2Y ₂	FW	TCAGGTCCAGGGCAATGG
P2Y ₂	RV	ACACGGGCAACAGCACGTA
P2Y ₄	FW	GCCCGGCGACTGTATCG
P2Y ₄	RV	AACGGAGCCGAGAAGATGACT
P2Y ₆	FW	CCAAATCTGGCACTTCCTCCTA
P2Y ₆	RV	TCCTATGCTCGGAGAGTCTGTCT
P2Y ₁₂	FW	CCACTAACTAGTATTCCCGGAGACA
P2Y ₁₂	RV	CACATCCATGGTCCTGGTTCT
P2Y ₁₃	FW	GTCTCTTCCAAAACAAAGCTGATG
P2Y ₁₃	RV	GCACCGCTCAGACTTGTTGA
P2Y ₁₄	FW	GTCGTCTGCTTTGTGCCTTACC
P2Y ₁₄	RV	TGACCTTCCGTCTGACTCTTTG

Controles		
18S	FW	TGCATGTCTAAGTACGCACGG
18S	RV	AATGAGCCATTCGCAGTTTCA
GAPDH	FW	CTCGTCCCGTAGACAAAATGG
GAPDH	RV	TGACCAGGCGCCCAATA
Beta actina	FW	AGATGACCCAGATCATGTTTGAGA
Beta actina	RV	CACAGCCTGGATGGCTACGT

9.7. Ensaio de Ligação das LicNTPDases recombinantes em macrófagos

Inicialmente foi adicionado 1×10^5 macrófagos por poço em placa de 96 poços, sendo adicionado 0,2 mL de RPMI suplementado para cobrir as células. Em seguida os macrófagos foram incubados por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. O cultivo e preparo dos macrófagos foi descrito anteriormente. Após 24 horas as células foram fixadas com 0,1 mL de paraformaldeído 4% por 1 hora a temperatura ambiente. Após a fixação as células foram lavadas 3 vezes com 0,1 mL de PBS. Em seguida foi adicionado 0,1 mL de solução de bloqueio (PBS mais 0,5% de BSA). A placa foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente foram feitas mais 3 lavagens com 0,1 mL de PBS em seguida adicionou-se concentrações crescentes das LicNTPDases recombinantes purificadas, sendo as enzimas diluídas em PBS contendo 0,5% de BSA. A placa foi então colocada na estufa a 37°C por 1 hora. Após 1 hora a placa foi lavada 4 vezes novamente usando PBS mais 0,05% de Tween 20, em seguida foi adicionado o anticorpo monoclonal anti-His na diluição 1:500 (GenScript), sendo o anticorpo diluído em PBS contendo 0,05% de Tween 20. A placa foi incubada novamente por 1 hora a 37°C, logo em seguida foi repetido o passo de lavagem anterior e adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidases (GenScript), este segundo anticorpo foi diluído na proporção 1:5000 em PBS contendo 0,05% de Tween 20. A placa foi incubada novamente por 1 hora a 37°C e logo em seguida foi repetido o passo de lavagem. Após 4 lavagens, foi adicionado 50 µL do substrato TMB (Sigma) por poço e após 15 minutos de incubação do substrato. Foi adicionado 50 µL de H₂SO₄ 2 M por poço. Por fim foi

feita a leitura da absorbância no comprimento de onda de 450 nm. Este protocolo é uma adaptação do protocolo da referência [88].

9.8. Co-imuno precipitação de proteína ligante das LicNTPDases nos macrófagos

Inicialmente foi coletado $4,3 \times 10^7$ macrófagos, estes macrófagos foram centrifugados a $500 \times g$, para isto foram coletadas todas as células de 2 frascos de 75 cm. As células foram lavadas 2 vezes com 10 mL de PBS e suspensas em 1 mL de PBS contendo 0,1 mM PMSF e 10 $\mu\text{g/mL}$ de aprotinina. Logo em seguida as células foram lisadas em sonicador em 4 ciclos de 1 segundo com intervalo de 1 segundo, usando 10 watts de potência, sempre no gelo. O lisado foi transferido para microtubo de 1,5 mL e centrifugado a $790 \times g$ por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante desta centrifugação foi coletado e colocado em tubos para ultracentrifugação. Em seguida foi feita uma centrifugação a $100.000 \times g$ por 1 hora a 4°C . O pellet obtido foi ressuspenso em PBS e a amostra dividida em 3 partes (controle, amostra que seria incubada com 37 $\mu\text{g/mL}$ de LicNTPDase-1 ou 37 $\mu\text{g/mL}$ de LicNTPDase-2). A incubação das enzimas foi feita a 4°C sobre agitação por 2 horas. Após as 2 horas as amostras de membrana foram centrifugadas a $100.000 \times g$ por 1 hora a 4°C . O precipitado obtido foi lavado 1 vez com 0,5 mL de PBS e centrifugado a $100.000 \times g$ por 1 hora a 4°C . Após esta última centrifugação o precipitado foi suspenso em 0,5 mL do tampão de solubilização de membrana (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl, 1 mM EDTA, 10% glicerol, 1 $\mu\text{g/mL}$ aprotinina, 1 mM PMSF e 0,6% Triton x 100). Estas amostras foram então incubadas em Proteína A sefarose previamente preparada.

Para o preparo da Proteína A sefarose, inicialmente foi coletado 200 μL da resina estoque (GE). A resina foi lavada 3 vezes com 400 μL do tampão de solubilização de membrana, sendo a resina suspendida no tampão de solubilização de membrana e logo em seguida centrifugada $12.000 \times g$ por 20 segundos a 4°C , seguindo instruções do manual do fabricante. Após a lavagem o precipitado foi suspenso em mais 400 μL do mesmo tampão. Posteriormente 50 μL da resina previamente preparada, foi adicionada em cada amostra e incubada por 1 hora a

4°C. Após 1 hora esta amostra foi centrifugada e o sobrenadante coletado. Desta forma foi eliminado as proteínas que interagem inespecificamente com a resina.

Na resina restante foi adicionado 5 µL do anticorpo anti-his e este material foi incubado por 3 horas a 4°C. Após a incubação a resina foi lavada 3 vezes como especificado anteriormente e dividida em 3 partes (controle, amostras incubadas com LicNTPDase-1 ou incubada com LicNTPDase-2). As amostras mais a resina com anti-His foram incubadas por 3 horas a 4°C. Após a incubação a resina foi lavada 3 vezes com 500 µL do tampão de solubilização de membrana. As amostras foram então suspendidas em 60 µL do tampão de solubilização de membrana. Por fim 10 µL de cada amostra foi usada para visualização em SDS-PAGE 12% corado com prata [85]. Em todas as etapas foram usada inibidores de protease e foi coletado uma alíquota de cada etapa para posterior análise em eletroforese. O restante das amostras da última etapa foi armazenada para posterior análise por espectrometria de massa.

10. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Levando em consideração a importância já citada no capítulo anterior das NTPDases de parasitos que estão relacionada com a possível participação em mecanismos de virulência, via modulação da sinalização purinérgica dos hospedeiros e por consequência modulação da resposta imune e via auxílio na adesão celular entre as células do hospedeiro e o parasito [14, 16-18, 64, 67-69, 75, 88, 92]. Estas enzimas podem atuar também nas 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 [16, 71].

O fato é que as enzimas estudadas até o momento hidrolisam nucleotídeos tri e difosfatados, apresentando capacidade de hidrólise distintas para substratos ou mesmo na dependência de cátions (artigo em preparação). Também já foi demonstrado a redução na infecção, quando é usado anticorpos específicos contra estas enzimas ou mesmo inibidores enzimáticos. Já foi visto que em ensaios de competição entre as proteínas recombinantes e os parasitos, onde quando adiciona-se a NTPDase recombinante, estas enzimas se ligam aos sítios de adesão que são usados pelos parasitos e isso desencadeia uma redução na adesão [69, 88, 92].

A participação direta destas enzimas sobre a modulação do sistema imune do hospedeiro ainda não foi mostrada, mas existem trabalhos que demonstram expressão aumentada de purino receptores (P2X₇ e P2Y₂ e 4) em macrófagos infectados por *L. amazonensis* e que a ativação destes receptores foram alteradas nas células infectadas quando comparado com células não infectadas [64, 67, 68].

Neste capítulo foram feitos ensaios experimentais em macrófagos usando as LicNTPDases recombinantes, buscando melhor compreender o papel destas enzimas durante a infecção, podendo assim desvendar onde as LicNTPDases podem estar agindo e quais mecanismos do hospedeiro elas podem estar interferindo.

10.1. Detecção das LicNTPDases por western blotting em diferentes espécies de *Leishmania*

Inicialmente analisamos se ambas as enzimas estavam presentes nos extratos proteicos de *Leishmania* de diferentes espécies. O objetivo foi confirmar que ambas LicNTPDases são expressas em promastigotas, para isso foi feito um western blotting, usando extrato proteico total de promastigotas totais e anti-soro policlonal anti-LicNTPDase-2 (figura 18). Apesar de usar as mesmas condições o western para os extratos de *L. amazonenses* e *L. braziliensis* foram feitos separadamente do western para *L. infantum chagasi*. Neste western foi possível confirmar que os parasitos expressam tanto a LicNTPDase-1 (banda maior, logo acima da banda de 70kDa) quanto a LicNTPDase-2 (banda menor, logo abaixo da banda de 50 kDa).

As bandas são bem mais visíveis nos extratos de *L. brazilienses* e *L. amazonenses* do que para *L. infantum chagasi* e isso pode ser devido ao nível de expressão diferencial destas enzimas nas diferentes espécies (figura 18), como previamente mostrado para *L. amazonenses*, *L. brasilienses* e *L. major* [17]. No entanto neste artigo a expressão da LicNTPDase-2 foi detectada nos extratos de membrana enriquecidos de *L. amazonenses*. Não foi detectado a Lic-NTPDase-2 das *L. brazilienses* e *L. major*. No presente trabalho conseguimos verificar a presença das LicNTPDases em todas a *Leishmanias* testadas. O que pode ser justificado pelos diferentes anticorpos usados, no artigo citado o anticorpo usado foi o anticorpo anti-NTPDase-1 de *T. cruzi* enquanto neste trabalho usamos o anti-LicNTPDase-2 de *L. infantum chagasi*.

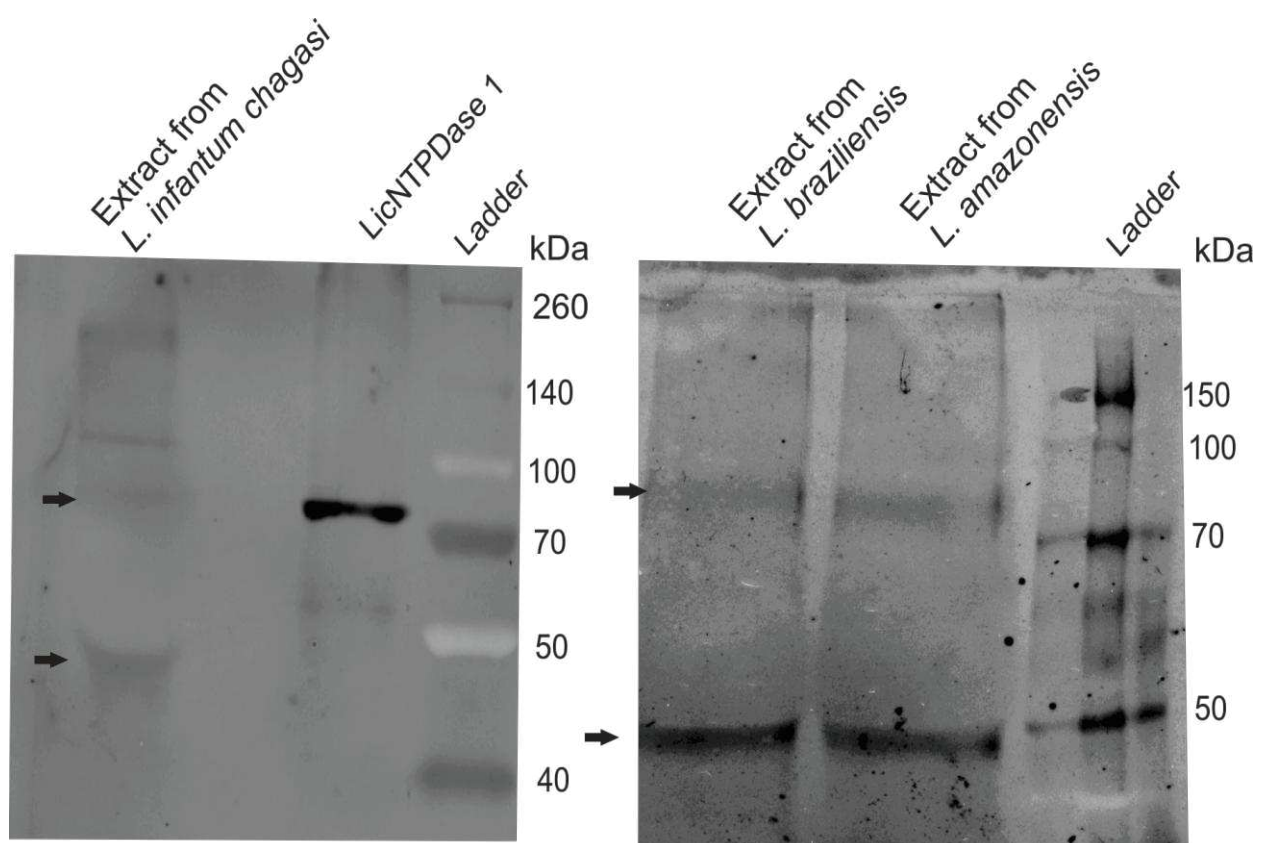


Figura 18: Western blotting com extrato total de promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*. Para teste foi feito um SDS-PAGE 10% e neste gel foram aplicadas 11,5 µg de cada extrato proteico de *Leishmania*. Foi usado como anticorpo primário o antissoro policlonal anti-LicNTPDase-2 na concentração 1:100, como anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com Fitc (sigma) na concentração 1:6000. A revelação foi feita como descrito nos métodos.

10.2. Avaliando a capacidade das LicNTPDases recombinantes de ligar na membrana de macrófagos da linhagem RAW 264.7

Sabendo que as LicNTPDases são expressas em diferentes espécies de *Leishmania* e principalmente que elas são expressas em formas promastigotas das *L. infantum chagasi*, resolvemos verificar se as enzimas de *Leishmania infantum chagasi* estariam participando diretamente no processo de adesão à célula hospedeira, como mostrado anteriormente para *T. cruzi* e para *Cryptosporidium* [69, 88, 92].

Nosso grupo já obteve alguns dados sobre a ação da LicNTPDase-2 como facilitadora de adesão (dados a serem publicados, anexo 1), no entanto, não tínhamos nada sobre a LicNTPDase-1 e não havíamos observado o efeito direto e nem se havia um efeito dose dependente.

Desta forma, fizemos um ensaio com macrófagos da linhagem RAW 264.7, onde incubamos macrófagos com diferentes concentrações das LicNTPDases. O que permitiu determinar uma relação direta entre a concentração das proteínas recombinantes e ligação na membrana de macrófagos (figura 19). Para isso realizamos um ensaio de ELISA, onde macrófagos foram crescidos em placa de 96 poços e posteriormente, fixados e incubados com diferentes concentrações de proteínas recombinantes, sendo as proteínas desnaturadas (controle) ou não (teste). Para detectar se as proteínas estavam ou não ligando, usamos um anticorpo monoclonal anti-Hexa histidina, já que as proteínas recombinantes possui uma hexa histidina fusionada na porção C-terminal.

Assim foi feito ensaios de ELISA, similar ao que foi demonstrado para a proteína recombinante de *Cryptosporidium* [88]. Variando as concentrações das LicNTPDases de 4 µg/mL até 37 µg/mL. Para LicNTPDase-1 foi observado um aumento crescente da detecção de intensidade de ligação, mas não conseguimos chegar em uma concentração máxima de recombinante que saturasse a reação. Já para a LicNTPDase-2 conseguimos chegar em um valor máximo de 27 µg/mL de recombinante para saturar todos os ligantes nos macrófagos, onde não vimos diferença entre a absorção quando colocávamos 27 µg/mL ou 37 µg/mL de recombinante.

Nos testes foi verificado que a LicNTPDase-1 perdia completamente a capacidade de aderir a membrana do macrófago e a LicNTPDase-2 perdia significativamente a capacidade, quando as proteínas eram desnaturadas a 95°C por 10 minutos. Este dado sugere que a capacidade de ligação das LicNTPDases é dependente de suas estruturas. É possível verificar também que mesmo não tendo uma atividade enzimática elevada como vimos no capítulo anterior, a LicNTPDase-1 apresenta capacidade de ligar nos macrófagos, o que pode sugerir a independência entre a atuação no mecanismo de adesão da atuação na hidrólise de nucleotídeo (figura 19).

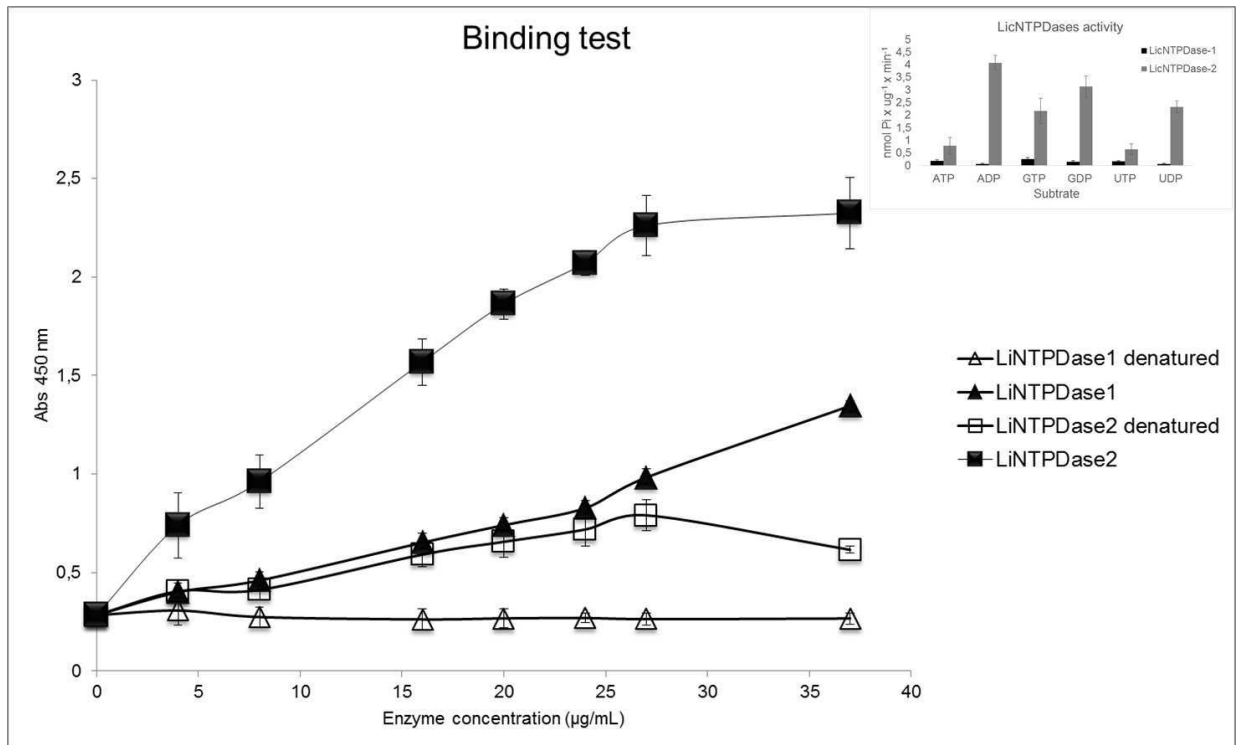


Figura 19: Ensaio de ligação das LicNTPDases na membrana de macrófagos da linhagem RAW 264.7. Para este ensaio placas de 96 poços foram preparadas com 1×10^5 macrófagos por poço, estes macrófagos foram posteriormente fixados e incubados com diferentes concentrações das LicNTPDases desnaturadas ou não. Após a incubação as enzimas que não ligaram foram removidas por lavagem e logo em seguida foi adicionado o anticorpo anti-His que reconhece a “His-tag” presente nas recombinantes. Este experimento foi feito em triplicata e repetido duas vezes.

10.3. Avaliando a capacidade das LicNTPDases recombinantes interferir na infecção feita “in vitro” de macrófagos RAW 264.7 com *L. infantum chagasi* (cepa M2982)

Após confirmar que as LicNTPDases se ligam à membrana de macrófagos, resolvemos verificar se estas enzimas poderiam interferir na infecção. Fizemos um ensaio de competição para verificar o efeito das LicNTPDases recombinantes sobre a infecção “in vitro”, já que o resultado anterior (figura 19), sugere que as LicNTPDases recombinantes são capazes de ocupar os sítios de ligação dos macrófagos que seria usado pela NTPDases nativas da *L. infantum chagasi*. Quando foi adicionado 1 µg/mL de LicNTPDase-2, foi observado redução na infecção superior a 80% (figura 20), mesmo usando uma concentração 4 vezes menor de LicNTPDase-2 que foi usada no primeiro ponto do experimento anterior. Este dado é similar a dados já obtidos e que serão publicados em breve em experimentos similares do nosso grupo, com diferença que os macrófagos usados eram da linhagem J774 (Anexo-1). Já para a adição de 1 µg/mL de LicNTPDase-1, foi observado redução na infecção cerca de 41%, sendo este efeito bem menor do que o observado no para adição LicNTPDase-2. Porém estes dados estão em conformidade com teste de ligação (figura 19), onde a intensidade de ligação da LicNTPDase-2 recombinante é muito superior a LicNTPDase-1 recombinante e que a concentração de enzima recombinante necessária para saturar os sítios de ligação nos macrófagos é bem diferente para ambas, sendo que neste experimento usamos 1 µg/mL de ambas as enzimas (figura 20). Como controle de adição de uma proteína não relacionada, usou-se soro albumina bovina (BSA)

Com este experimento foi possível comprovar que ocorre uma redução na infecção estatisticamente comprovada na presença de LicNTPDase-1 ou de LicNTPDase-2 recombinante, indicando que as LicNTPDases presente na superfície do parasito são importante para adesão celular.

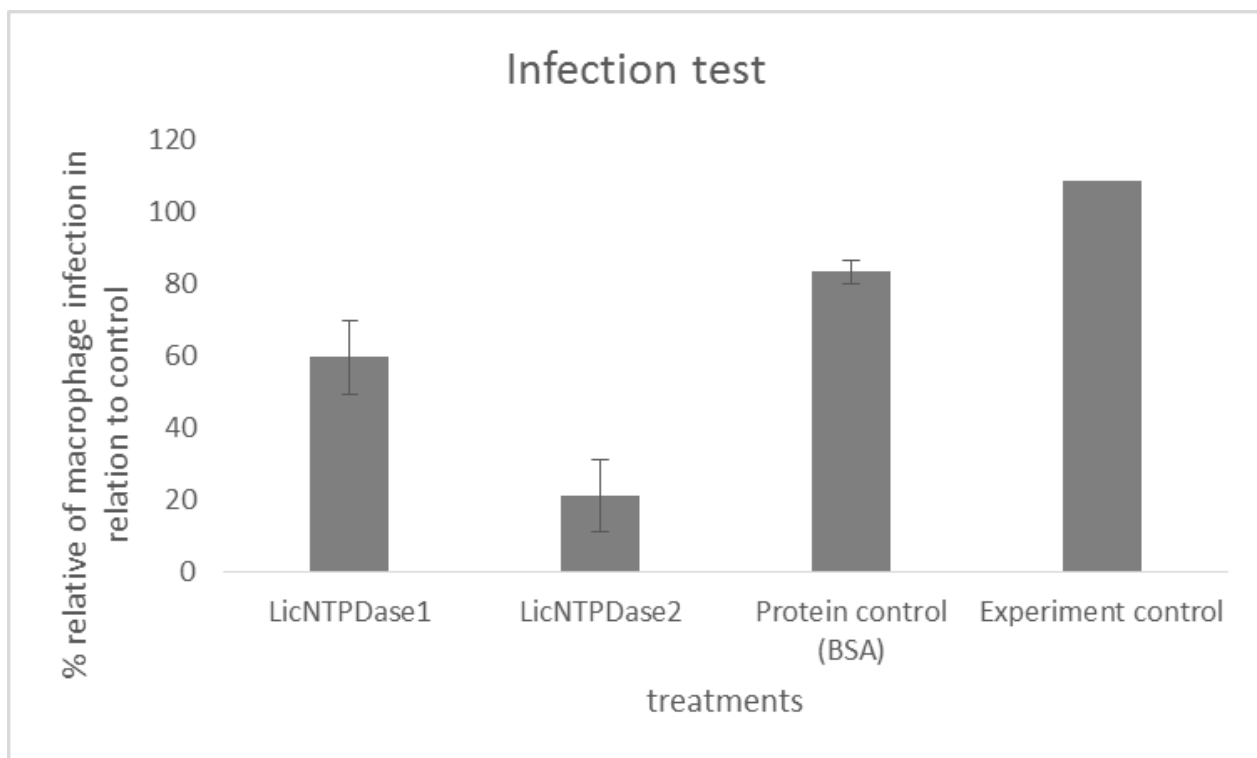


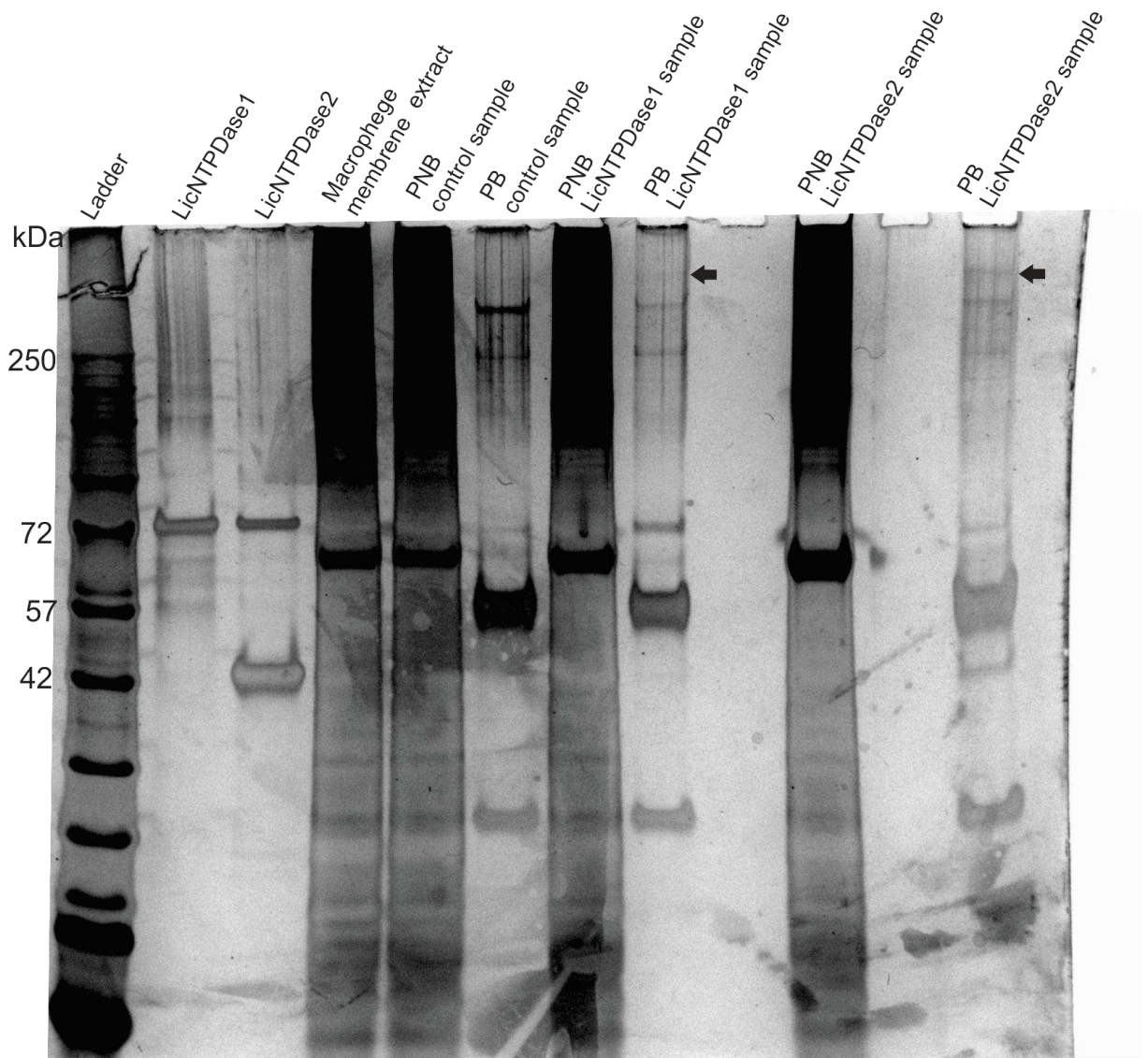
Figura 20: Ensaio de infecção de macrófagos RAW 264.7 com *L. infantum chagasi* na presença ou não das LicNTPDases. Os testes de infecção foram feitos em placas de 24 poços foram preparadas com lamínulas e semeados com $2,5 \times 10^5$ macrófagos por poço, após um período de incubação os macrófagos foram tratados com $1\mu\text{g/mL}$ de LicNTPDase-1 ou LicNTPDase-2 recombinante ou BSA. As proteínas foram incubadas com os macrófagos 20 minutos antes da adição das *L. infantum chagasi*. Após a adição das *Leishmanias*, a placa foi incubada em estufa a 37°C , 5% de CO_2 por 3 horas. Posteriormente foi feito 3 lavagens para remover *Leishmanias* não aderidas. A infecção foi feita por 72 horas e posteriormente as lamínulas foram preparadas conforme descrito na metodologia. Este resultado é referente a dados obtidos de 2 experimentos feitos em triplicata para cada ponto.

10.4. Busca do ligante das LicNTPDases nos macrófagos

Trabalhos recentes mostraram que as ecto-apirase de *Cryptosporidium* e de *T. cruzi* participam da adesão das células dos parasitos com células dos hospedeiros [88, 92]. Conforme dados mostrados anteriormente as LicNTPDases de *L. infantum chagasi* também participam da adesão celular dos parasitos com hospedeiro. Com tudo até o presente momento não foi identificado qual ou quais são os ligantes das ecto-apirase nas células hospedeiras.

Na tentativa de identificar qual ou quais são as proteínas ligantes das LicNTPDases nos macrófagos, fizemos uma co-imunoprecipitação. Desta forma, extrato de membrana de macrófago foi incubado com 37 µg/mL de LicNTPDase-1 ou 37 µg/mL de LicNTPDase-2 (teste) ou não foi incubado com as recombinantes (controle). Após a incubação as amostras foram passadas em resina com anticorpo anti-hexa histidina ligado à proteína A sefarose, conforme descrito na metodologia.

As amostras obtidas na co-imunoprecipitação, foram analisadas em SDS-PAGE 12%, onde conseguimos identificar uma banda proteica maior que 250 kDa que está presente tanto na amostra co-imunoprecipitada com LicNTPDase1 quanto na LicNTPDase-2, sendo que esta mesma banda não está presente na amostra controle (figura 21). Este resultado indica que possivelmente ambas enzimas se ligam em um mesmo alvo, já que a proteína ou complexo proteico isolado nos dois testes apresentam a mesma massa molecular (figura 21). Entretanto ainda precisamos identificar esta proteína.



* Protein not bound to the protein A plus anti-histidine tag (PNB)

* Protein that bound to the protein A plus anti-histidine tag (PB)

Figura 21: Ensaio de co-imunoprecipitação da proteína ligante das LicNTPDases nos macrófagos RAW 264.7. SDS-PAGE 12% corado com prata. Para este ensaio extrato de membrana dos macrófagos foram preparados e incubadas com as recombinantes, posteriormente foi usado anticorpo anti-histidina ligado a proteína A agarose para purificar as recombinantes e as possíveis proteínas ligadas as recombinantes. As setas indicam a proteína isolada que está presente na amostra "PB LicNTPDase-1 sample e PB LicNTPDase-2 sample, mas não está presente na PB control sample".

10.5. Expressão de receptores P2 em macrófagos tratados com LicNTPDases recombinantes

Com os últimos resultados, conseguimos mostrar que estas enzimas podem hidrolisar nucleotídeos tri e difosfatados e estão participando diretamente da adesão celular durante a infecção.

Trabalhos com células infectadas com *L. amazonenses* mostram que ocorre um aumento na expressão dos receptores P2X₇ e P2Y_{2 e 4} quando comparado a células não infectadas com células infectadas e as células infectadas apresentam alterações na ativação destes receptores. Especificamente para o receptor P2X₇ foi visto que ocorre uma alteração na seletividade de íons em células infectadas quando comparada a células não infectadas [64, 67, 68]. Com base nestes dados resolvemos investigar qual ou quais purino receptores P2 têm sua expressão alterada em macrófagos infectados por *L. infantum chagasi*. Outro ponto, seria avaliar se as LicNTPDases recombinante poderiam alterar a expressão destes receptores, já que elas possuem papel importante na infecção.

Assim resolvemos verificar a expressão RNA mensageiro dos purino receptores P2 em macrófagos RAW 264.7 infectados ou não infectados ou tratados com LicNTPDases recombinante ou não tratados. Para isso, inicialmente foi feita a extração do RNA total dos macrófagos. Os macrófagos foram divididos em 4 grupos: Macrófagos que não receberam nenhum tratamento (controle), macrófagos infectados com *L. infantum chagasi*, macrófagos tratados com 1µg/mL de LicNTPDase-1 recombinante, macrófagos tratados com 1µg/mL LicNTPDase-2 recombinante. O RNA total do macrófagos foi extraído após 72 horas dos diferentes tratamentos. Após a extração, o RNA total foi avaliado em eletroforese capilar em sistema bioanalyzer (Agilent). A grande vantagem de utilizar este equipamento é que nele já é feita a avaliação da qualidade do RNA aplicado através no número de integridade do RNA (RIN). O equipamento qualifica o RNA de 0-10, sendo que quanto mais próximo de 10 maior a integridade da amostra e qualquer amostra que apresenta o RIN acima de 6 pode ser usada em ensaios posteriores. Todas as amostras de RNA extraídas apresentaram o RIN acima de 8 (figura 22).

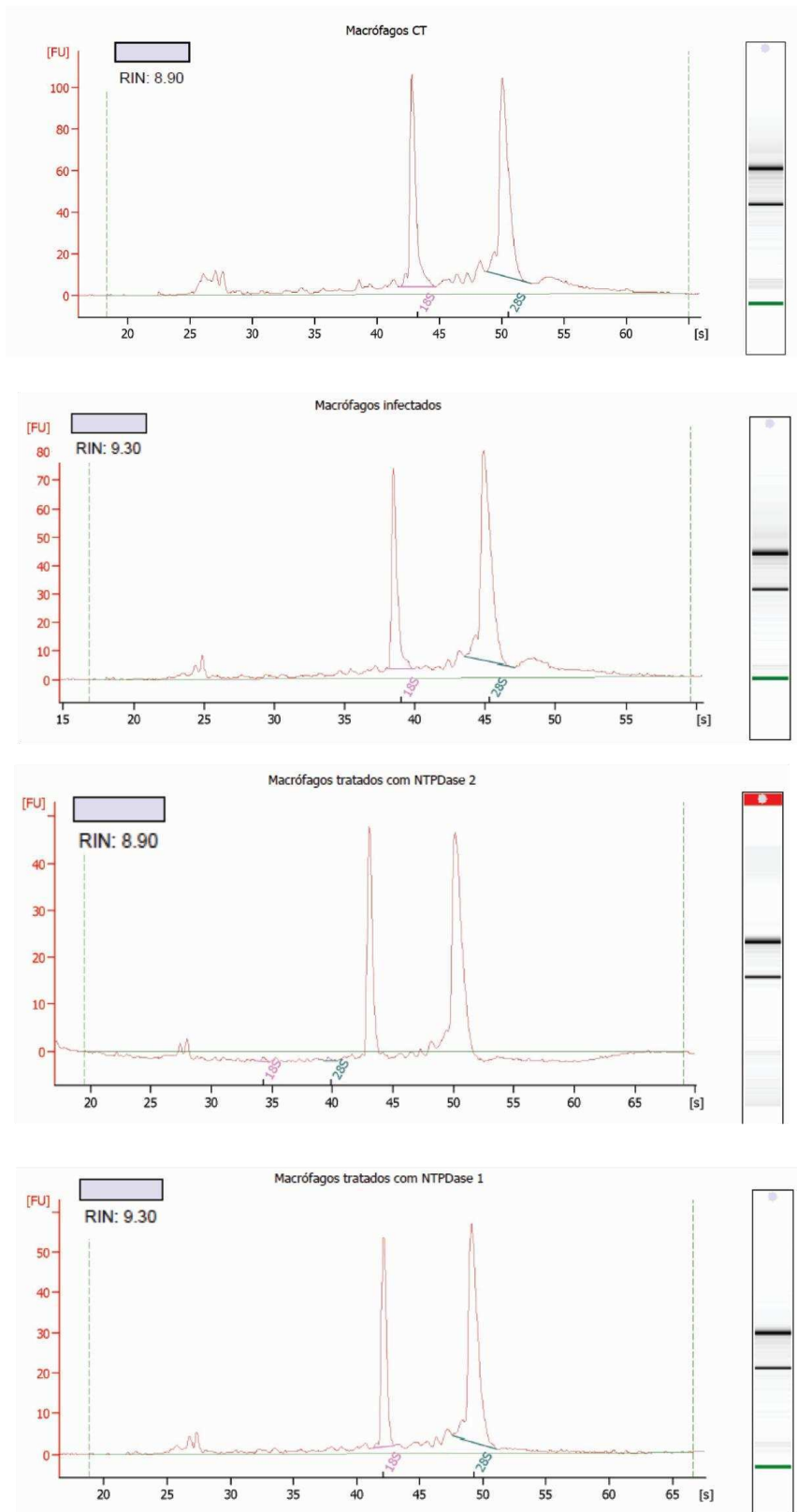


Figura 22: Avaliação da qualidade do RNA total extraído dos macrófagos RAW 264.7.

Foi feito a extração do RNA total das 4 amostras distintas, macrófago controle que não foi infectado e não foi adicionado as enzimas recombinantes, macrófagos infectados com *L. infantum chagasi*, macrófagos tratados com 1 µg/mL de LicNTPDase-1 recombinante e macrófagos tratados com 1 µg/mL de LicNTPDase-2.

O RNA total extraído das diferentes amostras macrófagos foram usados para obter cDNA. O cDNA então foi usado para fazer PCR em tempo real e identificar quais purino receptores seriam diferencialmente expressos nestes macrófagos. Foi feito PCR em tempo real para todos purino receptores P2, mas obtivemos dados confiáveis apenas para os receptores apresentados (figura 23). Foi visto que os macrófagos da linhagem RAW 264.7 quando infectados com *L. infantum chagasi*, apresentam elevação significativa da expressão dos receptores P2X₂, P2Y₁₂ e 13 (figura 23 A). Os macrófagos tratados com 1µg/mL de LicNTPDase-1 apresentaram um aumento na expressão dos receptores P2X₃ e 5 e P2Y₂ e uma redução na expressão do receptor P2Y₁₃ (figura 23 B). Já nos macrófagos tratados com 1µg/mL de LicNTPDase-2, foi observado uma redução na expressão dos receptores P2X₆ e 7 (figura 23 C).

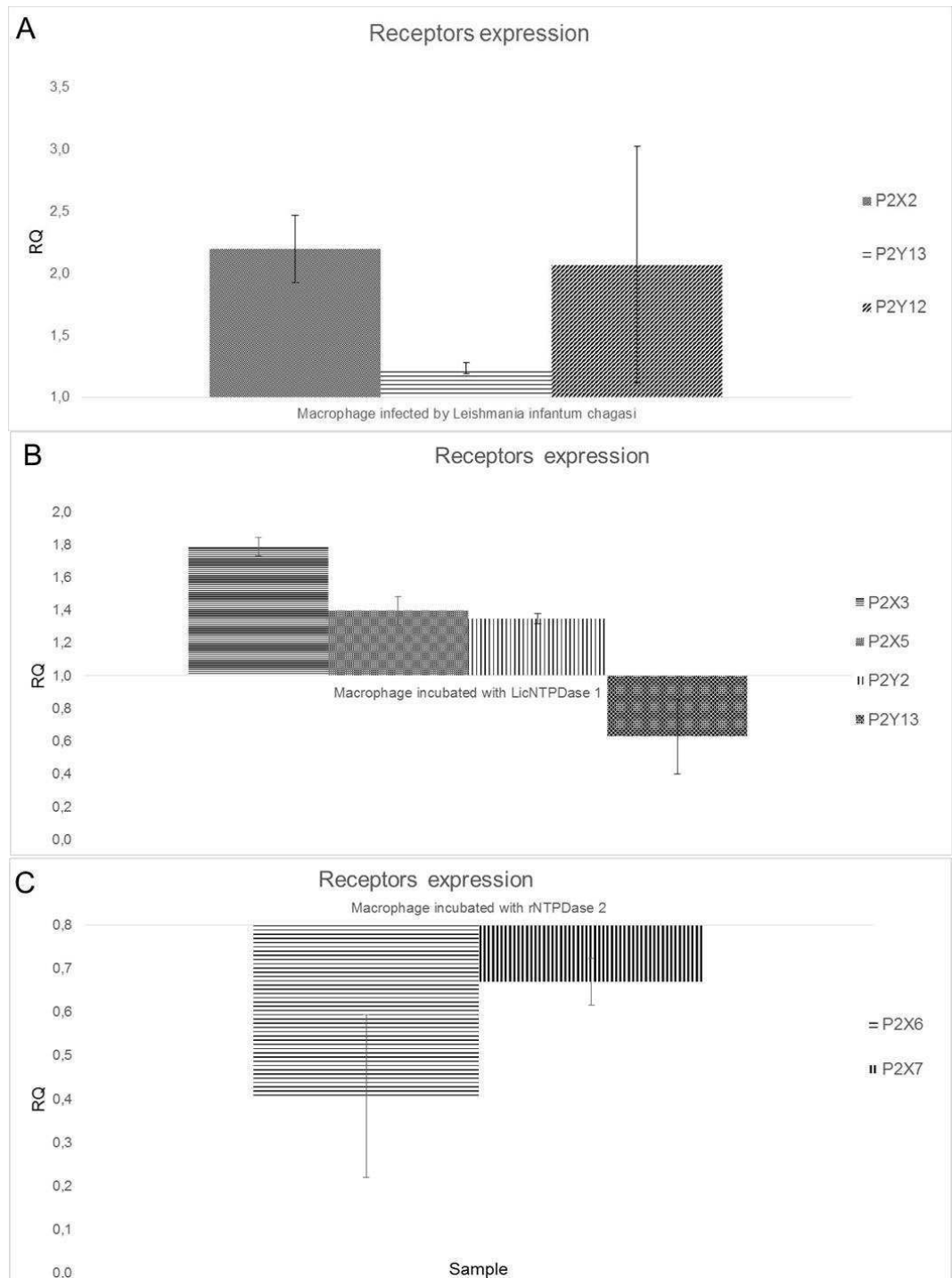


Figura 23: Avaliação da expressão dos purino receptores P2 nos macrófagos RAW 264.7. Para este teste os macrófagos foram infectados ou tratados com 1 µg/mL da LicNTPDase-1 ou 2. A) Avaliação para alteração na expressão dos receptores para macrófagos infectados com *L.infantum chagasi*. B) Avaliação para alteração na expressão dos receptores para macrófagos tratados com 1 µg/mL da LicNTPDase-1. C) Avaliação para alteração na expressão dos receptores para macrófagos tratados com 1 µg/mL da LicNTPDase-2. O experimento foi repetido 2 vezes e foi feito teste-T para determinar se a diferença na expressão dos testes era significativa quando comparada do controle. Os genes da beta-actina e GAPDH foram usados como controles endógenos de expressão.

Existe na literatura dados que mostram o envolvimento direto de vários purino receptores e ativação de macrófagos, no entanto não se conhece o efeito específico para todos eles. Sabe-se até o momento que a ativação de P2X₃, P2Y₂ e 12 promove a quimiotaxia e fagocitose em macrófagos. Já a ativação do P2X₇ de macrófagos, está relacionada com fagocitose, com a apoptose e com eliminação de patógenos intracelular [12, 61, 64, 96-98].

Em testes feitos com macrófagos isolados de camundongos e infectados com *L. amazonenses*, foi demonstrado um aumentam na expressão dos receptores P2X₇, P2Y₂ e 4 [64, 67]. Contudo nos nossos testes vimos que macrófagos da linhagem RAW 264.7 apresentam uma elevação na expressão dos receptores P2X₂, P2Y₁₂ e P2Y₁₃. Esta diferença entre os resultados da literatura e os obtidos neste trabalho pode ser explicado pelo fato de ter sido usado macrófagos diferentes, ou pode ser pelo fato dos trabalhos terem sido feitos com espécies diferentes de *Leishmania*, sendo que estas duas espécies desencadeiam doenças diferentes. Para os macrófagos tratados com as duas enzimas recombinantes também foi visto efeito na expressão de receptores diferentes. Enquanto os macrófagos tratados com LicNTPDase-1 recombinante tiveram alteração na expressão dos receptores P2X₃ e 5 e P2Y₂ e 13. Os tratados com LicNTPDase-2 recombinante apresentaram alteração na expressão dos receptores P2X₅ e 6. Estes resultados indicam efeitos específicos para estas duas enzimas recombinantes frente a ativação dos purino receptores de macrófago, já que ambas recombinantes são expressas, purificadas e renaturadas com o mesmo protocolo, mas mesmo assim apresentaram um efeito completamente diferentes.

Os resultados obtidos são interessante principalmente quando comparamos os dados existentes na literatura para *L. amazonenses* e os obtidos para *L. infantum chagasi*: A não alteração na expressão do receptor P2X₇ observado no teste de células infectadas com *L. infatum chagasi* pode ser explicada pelo efeito da LicNTPDase-2, já que esta enzima fez com que houvesse uma redução na expressão do receptor P2X₇. Já que o receptor P2X₇ é apontado como um dos principais receptores envolvidos na ativação de células do sistema imune e sendo importante para eliminação de patógenos intracelulares [14, 96].

No entanto precisamos obter mais dados sobre esta modulação, pois este experimento foi feito em triplicada e repetido duas vezes, porém verificamos que a expressão basal dos receptores nas amostras controle estavam diferentes entre os

dois experimentos o que fez com que o experimento apresentasse uma variação muito alta entre os dados do primeiro teste e do segundo. Futuramente é preciso confirmar que o aumento ou redução na expressão de RNA dos receptores é acompanhada pela alteração na população de receptores na superfície da célula. Além disso outra importante perspectiva deste trabalho será verificar o efeito da estimulação destes receptores sobre a ativação de macrófagos e verificar se as enzimas são capazes de modular a respostas.

11. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos até o momento comprovam que as LicNTPDases são efetivamente expressas nas diferentes espécies de *Leishmania* estudados e atuam na adesão celular à célula hospedeira. Estas enzimas possuem uma importância ainda maior a que já vem sido sugerida na literatura, já que além de serem importantes para a adesão dos parasitos na célula hospedeira e aparentemente podem modular a expressão de alguns purino receptores do tipo P2. Esta modulação é distinta para as isorformas 1 e 2 de NTPDases de *L. infantum chagasi*.

Em resumo:

- Foi possível comprovar que as LicNTPDases são expressas em promastigotas de *L. amazonenses*, *L. braziliense* e *L. infantum chagasi*.
- Foi confirmada a capacidade de ligação das LicNTPDases em membrana de macrófagos, sendo a ligação dependente da concentração.
- Foi possível demonstrar uma possível proteína ou complexo proteico de ~250 kDa ligante das LicNTPDases 1 e 2 em extrato de membrana de macrófagos, mas até o momento não identificamos esta proteína ou complexo proteico.
- Verificou-se que a *L. infantum chagasi* é capaz de estimular a expressão dos receptores P2X₂, P2Y₁₂ e P2Y₁₃ em macrófagos.
- Mostrou-se que as LicNTPDase-1 e 2 são capazes de modular a expressão de receptores P2 e que a modulação é específica para cada enzima. A LicNTPDase-1 recombinante estimulou o aumento da expressão dos receptores P2X_{3 e 5} e P2Y₂ e uma redução na expressão do receptor P2Y₁₃. Já a LicNTPDase-2 desencadeou uma redução na expressão dos receptores P2X_{6 e 7}.

12. PERSPECTIVAS FUTURAS RELACIONADAS A ESTE TRABALHO

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 iniciais sobre a ação destas enzimas durante a infecção e dos efeitos das mesmas sobre o hospedeiro.

Para melhor elucidar o papel destas enzimas ainda teremos de repetir os experimentos de infecção, bem como os testes de expressão qPCR, visando termos um resultado mais confiável. Será necessário também confirmar por western blotting os resultados obtidos por qPCR e assim confirmar se o efeito observado para expressão de RNA mensageiro é acompanhado de um efeito sobre a população do receptor na superfície da célula. Pretendemos também avaliar o efeito destas enzimas recombinantes sobre a ativação e liberação de citocinas. Desta forma poderemos avaliar a real proporção de ação destas enzimas durante a infecção.

13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] U. Sharma, S. Singh, Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* 45 (2008) 255-272.
- [2] G.A. Romero, M. Boelaert, Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. *PLoS neglected tropical diseases* 4 (2010) e584.
- [3] W.H. Organization, World Health Organization, <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>, 2014.
- [4] G. Baneth, A.F. Koutinas, L. Solano-Gallego, P. Bourdeau, L. Ferrer, Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol* 24 (2008) 324-330.
- [5] G. Miro, L. Cardoso, M.G. Pennisi, G. Oliva, G. Baneth, Canine leishmaniosis-- new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol* 24 (2008) 371-377.
- [6] D.A. Ashford, J.R. David, M. Freire, R. David, I. Sherlock, M.C. Eulalio, D.P. Sampaio, R. Badaro, 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* 59 (1998) 53-57.
- [7] M. Paranhos-Silva, E.G. Nascimento, M.C. Melro, G.G. Oliveira, W.L. dos Santos, L.C. Pontes-de-Carvalho, A.J. Oliveira-dos-Santos, Cohort study on canine emigration and Leishmania infection in an endemic area for American visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. *Acta Trop* 69 (1998) 75-83.
- [8] C. Ferreira Ede, M. de Lana, M. Carneiro, A.B. Reis, D.V. Paes, E.S. da Silva, H. Schallig, C.M. Gontijo, Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Veterinary parasitology* 146 (2007) 235-241.
- [9] M.d. Saúde, Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 3rd (2006) 1-122.
- [10] L. Plesner, Ecto-ATPases: identities and functions. *Int Rev Cytol* 158 (1995) 141-214.
- [11] G. Burnstock, Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64 (2007) 1471-1483.
- [12] F. Ben Yebdri, F. Kukulski, A. Tremblay, J. Sevigny, 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* 39 (2009) 2885-2894.
- [13] S.A. Levesque, F. Kukulski, K. Enyoji, S.C. Robson, J. Sevigny, NTPDase1 governs P2X7-dependent functions in murine macrophages. *Eur J Immunol* 40 (2010) 1473-1485.
- [14] R. Coutinho-Silva, C. Monteiro da Cruz, P.M. Persechini, D.M. Ojcius, The role of P2 receptors in controlling infections by intracellular pathogens. *Purinergic signalling* 3 (2007) 83-90.
- [15] J.L.R. Fietto, L. Almeida, M. R., R.F. De Souza, A.P.C. Zóboli, M.T. Bahia, L.C.C. Afonso, Recombinant e-ntpdases, use for producing a diagnostic kit for detecting antibodies in various types of leishmaniasis caused by species of the leishmania genus, 2011.
- [16] M. Berredo-Pinho, C.E. Peres-Sampaio, P.P. Chrispim, R. Belmont-Firpo, A.P. Lemos, A. Martiny, M.A. Vannier-Santos, J.R. Meyer-Fernandes, A Mg-dependent ecto-ATPase in Leishmania amazonensis and its possible role in adenosine acquisition and virulence. *Archives of biochemistry and biophysics* 391 (2001) 16-24.

- [17] E. de Almeida Marques-da-Silva, J.C. de Oliveira, A.B. Figueiredo, D. de Souza Lima Junior, C.M. Carneiro, J.L. Rangel Fietto, L.C. Crocco Afonso, Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 10 (2008) 850-857.
- [18] F.M. Sansom, S.C. Robson, E.L. Hartland, Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions. *Microbiol Mol Biol Rev* 72 (2008) 765-781, Table of Contents.
- [19] P.A.H. Organization, *Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas*, 2013.
- [20] P.A.H. Organization, *Visceral Leishmaniasis*, 2014.
- [21] M.d. Saúde, *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. 3 rd (2006) 1-122.
- [22] W.H. Organization, *Control of the leishmaniasis*, 2010.
- [23] P.V. Queiroz, G.R. Monteiro, V.P. Macedo, M.A. Rocha, L.M. Batista, J.W. Queiroz, S.M. Jeronimo, M.F. Ximenes, Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. *Res Vet Sci* 86 (2009) 267-273.
- [24] R.F. de Souza, Y.L. Dos Santos, R. de Souza Vasconcellos, L. Borges-Pereira, I.S. Caldas, M.R. de Almeida, M.T. Bahia, J.L. Fietto, Recombinant *Leishmania (Leishmania) infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase NTPDase-2 as a new antigen in canine visceral leishmaniasis diagnosis. *Acta Trop* 125 (2013) 60-66.
- [25] V.T. Martins, M.A. Chavez-Fumagalli, L.E. Costa, A.M. Canavaci, P.S. Lage, D.P. Lage, M.C. Duarte, D.G. Valadares, R.D. Magalhaes, T.G. Ribeiro, R.A. Nagem, W.D. Darocha, W.C. Regis, M. Soto, E.A. Coelho, A.P. Fernandes, C.A. Tavares, Antigenicity and protective efficacy of a *Leishmania amastigote*-specific protein, member of the super-oxygenase family, against visceral leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases* 7 (2013) e2148.
- [26] H. Zimmermann, Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 362 (2000) 299-309.
- [27] J.A. de Aguiar Matos, F.P. Borges, T. Tasca, M.R. Bogo, G.A. De Carli, M. da Graca Fauth, R.D. Dias, C.D. Bonan, Characterisation of an ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. *Int J Parasitol* 31 (2001) 770-775.
- [28] J.D. Shi, T. Kukar, C.Y. Wang, Q.Z. Li, P.E. Cruz, A. Davoodi-Semiromi, P. Yang, Y. Gu, W. Lian, D.H. Wu, J.X. She, Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1). *The Journal of biological chemistry* 276 (2001) 17474-17478.
- [29] A.F. Knowles, A.K. Nagy, Inhibition of an ecto-ATP-diphosphohydrolase by azide. *European journal of biochemistry / FEBS* 262 (1999) 349-357.
- [30] J.P. Vivian, 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, T. Beddoe, Crystal structure of a *Legionella pneumophila* ecto -triphosphate diphosphohydrolase, a structural and functional homolog of the eukaryotic NTPDases. *Structure* 18 (2010) 228-238.
- [31] M. Zebisch, N. Strater, Structural insight into signal conversion and inactivation by NTPDase2 in purinergic signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (2008) 6882-6887.
- [32] T.F. Wang, G. Guidotti, CD39 is an ecto-(Ca²⁺,Mg²⁺)-apyrase. *The Journal of biological chemistry* 271 (1996) 9898-9901.

- [33] M.G. O'Keeffe, P.R. Thorne, G.D. Housley, S.C. Robson, S.M. Vljakovic, Developmentally regulated expression of ectonucleotidases NTPDase5 and NTPDase6 and UDP-responsive P2Y receptors in the rat cochlea. *Histochem Cell Biol* 133 425-436.
- [34] J.J. Mulero, G. Yeung, S.T. Nelken, J.M. Bright, D.W. McGowan, J.E. Ford, Biochemical characterization of CD39L4. *Biochemistry* 39 (2000) 12924-12928.
- [35] V.V. Ivanenkov, D.M. Murphy-Piedmonte, T.L. Kirley, Bacterial expression, characterization, and disulfide bond determination of soluble human NTPDase6 (CD39L2) nucleotidase: implications for structure and function. *Biochemistry* 42 (2003) 11726-11735.
- [36] D.M. Murphy, V.V. Ivanenkov, T.L. Kirley, Bacterial expression and characterization of a novel, soluble, calcium-binding, and calcium-activated human nucleotidase. *Biochemistry* 42 (2003) 2412-2421.
- [37] F. Bigonnesse, S.A. Levesque, F. Kukulski, J. Lecka, S.C. Robson, M.J. Fernandes, J. Sevigny, Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry* 43 (2004) 5511-5519.
- [38] V.V. Ivanenkov, J. Meller, T.L. Kirley, Characterization of disulfide bonds in human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 (NTPDase3): implications for NTPDase structural modeling. *Biochemistry* 44 (2005) 8998-9012.
- [39] F. Kukulski, S.A. Levesque, E.G. Lavoie, J. Lecka, F. Bigonnesse, A.F. Knowles, S.C. Robson, T.L. Kirley, J. Sevigny, Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic signalling* 1 (2005) 193-204.
- [40] D.B. Leal, C.A. Streher, T.N. Neu, F.P. Bittencourt, C.A. Leal, J.E. da Silva, V.M. Morsch, M.R. Schetinger, Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochimica et biophysica acta* 1721 (2005) 9-15.
- [41] D.M. Murphy-Piedmonte, P.A. Crawford, T.L. Kirley, Bacterial expression, folding, purification and characterization of soluble NTPDase5 (CD39L4) ecto-nucleotidase. *Biochimica et biophysica acta* 1747 (2005) 251-259.
- [42] M. Zebisch, N. Strater, Characterization of Rat NTPDase1, -2, and -3 ectodomains refolded from bacterial inclusion bodies. *Biochemistry* 46 (2007) 11945-11956.
- [43] J.L. Fietto, R. DeMarco, I.P. Nascimento, I.M. Castro, T.M. Carvalho, W. de Souza, M.T. Bahia, M.J. Alves, S. Verjovski-Almeida, Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and biophysical research communications* 316 (2004) 454-460.
- [44] U. Krug, R. Totzauer, N. Strater, The crystal structure of *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 represents a conformational intermediate in the reductive activation mechanism of the tetrameric enzyme. *Proteins* 81 (2013) 1271-1276.
- [45] M. Zebisch, P. Schafer, P. Lauble, N. Strater, New crystal forms of NTPDase1 from the bacterium *Legionella pneumophila*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 69 (2013) 257-262.
- [46] F.M. Sansom, 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.L. Hartland, Enzymatic properties of an ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase from *Legionella pneumophila*: substrate specificity and requirement for virulence. *The Journal of biological chemistry* 283 (2008) 12909-12918.

- [47] M.J. Bours, E.L. Swennen, F. Di Virgilio, B.N. Cronstein, P.C. Dagnelie, Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology & therapeutics* 112 (2006) 358-404.
- [48] G. Burnstock, Purinergic modulation of cholinergic transmission. *Gen Pharmacol* 11 (1980) 15-18.
- [49] J.A. Ribeiro, Purinergic modulation of transmitter release. *J Theor Biol* 80 (1979) 259-270.
- [50] G. Burnstock, Purinergic signalling. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1 (2006) S172-181.
- [51] S.C. Robson, J. Sevigny, H. Zimmermann, The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic signalling* 2 (2006) 409-430.
- [52] E.R. Lazarowski, R.C. Boucher, T.K. Harden, Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol* 64 (2003) 785-795.
- [53] M.P. Abbracchio, J.M. Boeynaems, E.A. Barnard, J.L. Boyer, C. Kennedy, M.T. Miras-Portugal, B.F. King, C. Gachet, K.A. Jacobson, G.A. Weisman, G. Burnstock, Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y14 receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 24 (2003) 52-55.
- [54] M. Idzko, E. Panther, H.C. Bremer, S. Sorichter, W. Luttmann, C.J. Virchow, Jr., F. Di Virgilio, Y. Herouy, J. Norgauer, D. Ferrari, Stimulation of P2 purinergic receptors induces the release of eosinophil cationic protein and interleukin-8 from human eosinophils. *Br J Pharmacol* 138 (2003) 1244-1250.
- [55] D. Yeung, R. Kharidia, S.C. Brown, D.C. Gorecki, Enhanced expression of the P2X4 receptor in Duchenne muscular dystrophy correlates with macrophage invasion. *Neurobiol Dis* 15 (2004) 212-220.
- [56] A. Kaufmann, B. Musset, S.H. Limberg, V. Renigunta, R. Sus, A.H. Dalpke, K.M. Heeg, B. Robaye, P.J. Hanley, "Host tissue damage" signal ATP promotes non-directional migration and negatively regulates toll-like receptor signaling in human monocytes. *The Journal of biological chemistry* 280 (2005) 32459-32467.
- [57] K. Wirkner, D. Stanchev, L. Koles, M. Klebingat, H. Dihazi, G. Flehmig, C. Vial, R.J. Evans, S. Furst, P.P. Mager, K. Eschrich, P. Illes, Regulation of human recombinant P2X3 receptors by ecto-protein kinase C. *J Neurosci* 25 (2005) 7734-7742.
- [58] R. Placido, G. Auricchio, S. Falzoni, L. Battistini, V. Colizzi, E. Brunetti, F. Di Virgilio, G. Mancino, P2X(7) purinergic receptors and extracellular ATP mediate apoptosis of human monocytes/macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* reducing the intracellular bacterial viability. *Cell Immunol* 244 (2006) 10-18.
- [59] A. Franceschini, S.K. Hullugundi, A.M. van den Maagdenberg, A. Nistri, E. Fabbretti, Effects of LPS on P2X3 receptors of trigeminal sensory neurons and macrophages from mice expressing the R192Q *Cacna1a* gene mutation of familial hemiplegic migraine-1. *Purinergic signalling* 9 (2013) 7-13.
- [60] G.G. Yegutkin, Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et biophysica acta* 1783 (2008) 673-694.
- [61] M. Kronlage, J. Song, L. Sorokin, K. Isfort, T. Schwerdtle, J. Leipziger, B. Robaye, P.B. Conley, H.C. Kim, S. Sargin, P. Schon, A. Schwab, P.J. Hanley, Autocrine purinergic receptor signaling is essential for macrophage chemotaxis. *Sci Signal* 3 (2010) ra55.

- [62] F. Kukulski, F. Ben Yebdri, J. Lecka, G. Kauffenstein, S.A. Levesque, M. Martin-Satue, J. Sevigny, Extracellular ATP and P2 receptors are required for IL-8 to induce neutrophil migration. *Cytokine* 46 (2009) 166-170.
- [63] Y. Chen, R. Corriden, Y. Inoue, L. Yip, N. Hashiguchi, A. Zinkernagel, V. Nizet, P.A. Insel, W.G. Junger, ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* 314 (2006) 1792-1795.
- [64] S.P. Chaves, E.C. Torres-Santos, C. Marques, V.R. Figliuolo, P.M. Persechini, R. Coutinho-Silva, B. Rossi-Bergmann, Modulation of P2X(7) purinergic receptor in macrophages by *Leishmania amazonensis* and its role in parasite elimination. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 11 (2009) 842-849.
- [65] P. Pelegrin, C. Barroso-Gutierrez, A. Surprenant, P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1beta in mouse macrophage. *J Immunol* 180 (2008) 7147-7157.
- [66] M.D. Wewers, A. Sarkar, P2X(7) receptor and macrophage function. *Purinergic signalling* 5 (2009) 189-195.
- [67] C. Marques-da-Silva, M.M. Chaves, S.P. Chaves, V.R. Figliuolo, J.R. Meyer-Fernandes, S. Corte-Real, C. Lameu, H. Ulrich, D.M. Ojcius, B. Rossi-Bergmann, R. Coutinho-Silva, Infection with *Leishmania amazonensis* upregulates purinergic receptor expression and induces host-cell susceptibility to UTP-mediated apoptosis. *Cellular microbiology* 13 (2011) 1410-1428.
- [68] C. Marques-da-Silva, M.M. Chaves, J.C. Rodrigues, S. Corte-Real, R. Coutinho-Silva, P.M. Persechini, Differential modulation of ATP-induced P2X7-associated permeabilities to cations and anions of macrophages by infection with *Leishmania amazonensis*. *PLoS ONE* 6 (2011) e25356.
- [69] R.F. Santos, M.A. Possa, M.S. Bastos, P.M. Guedes, M.R. Almeida, R. Demarco, S. Verjovski-Almeida, M.T. Bahia, J.L. Fietto, Influence of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase Activity on *Trypanosoma cruzi* Infectivity and Virulence. *PLoS neglected tropical diseases* 3 (2009) e387.
- [70] T. Asai, S. Miura, L.D. Sibley, H. Okabayashi, T. Takeuchi, Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *The Journal of biological chemistry* 270 (1995) 11391-11397.
- [71] V. Nakaar, C.J. Beckers, V. Polotsky, K.A. Joiner, Basis for substrate specificity of the *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. *Molecular and biochemical parasitology* 97 (1998) 209-220.
- [72] C.R. Torres, E.G. Vasconcelos, S.T. Ferreira, S. Verjovski-Almeida, Divalent cation dependence and inhibition of *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase by fluorosulfonylbenzoyl adenosine. *European journal of biochemistry / FEBS* 251 (1998) 516-521.
- [73] E.C. Fernandes, J.M. Granjeiro, H. Aoyama, F.V. Fonseca, J.R. Meyer-Fernandes, A.E. Vercesi, A metallo phosphatase activity present on the surface of *Trypanosoma brucei* procyclic forms. *Veterinary parasitology* 118 (2003) 19-28.
- [74] J.A. Silverman, H. Qi, A. Riehl, C. Beckers, V. Nakaar, K.A. Joiner, Induced activation of the *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase leads to depletion of host cell ATP levels and rapid exit of intracellular parasites from infected cells. *The Journal of biological chemistry* 273 (1998) 12352-12359.
- [75] P.M. Leite, R.S. Gomes, A.B. Figueiredo, T.D. Serafim, W.L. Tafuri, C.C. de Souza, S.A. Moura, J.L. Fietto, M.N. Melo, F. Ribeiro-Dias, M.A. Oliveira, A. Rabello, L.C. Afonso, Ecto-nucleotidase activities of promastigotes from *Leishmania* (Viannia)

braziliensis relates to parasite infectivity and disease clinical outcome. PLoS neglected tropical diseases 6 (2012) e1850.

[76] M.S. Bastos, EXPRESSÃO HETERÓLOGA E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E BIOLÓGICA DA NTPDase-1 DE *Leishmania infantum chagasi*, Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, 2011.

[77] C. Mariotini-Moura, M.S. Bastos, F.F. de Castro, M.L. Trindade, R. de Souza Vasconcellos, M.A. Neves-do-Valle, B.P. Moreira, R. de Freitas Santos, C.M. de Oliveira, L.C. Cunha, X.M. Souto, G.C. Bressan, A. Silva-Junior, M.M. Baqui, M.T. Bahia, M.R. de Almeida, J.R. Meyer-Fernandes, J.L. Fietto, Trypanosoma cruzi nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion. Acta Trop 130C (2014) 140-147.

[78] J.R. Meyer-Fernandes, 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, T. Souto-Padron, A Mg-dependent ecto-ATPase is increased in the infective stages of Trypanosoma cruzi. Parasitology research 93 (2004) 41-50.

[79] D.F. Bisaggio, C.E. Peres-Sampaio, J.R. Meyer-Fernandes, T. Souto-Padron, Ecto-ATPase activity on the surface of Trypanosoma cruzi and its possible role in the parasite-host cell interaction. Parasitology research 91 (2003) 273-282.

[80] C.M. Pinheiro, E.S. Martins-Duarte, R.B. Ferraro, A.L. Fonseca de Souza, M.T. Gomes, A.H. Lopes, M.A. Vannier-Santos, A.L. Santos, J.R. Meyer-Fernandes, *Leishmania amazonensis*: Biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. Exp Parasitol 114 (2006) 16-25.

[81] M.L. Detoni, M.R. Fessel, A.C. Maia, G.N. Porcino, L.R. Quellis, P. Faria-Pinto, M.J. Marques, M.A. Juliano, L. Juliano, V.A. Diniz, S. Corte-Real, S.C. Goncalves-da-Costa, C.S. Souza, E.G. Vasconcelos, An antigenic domain of the *Leishmania amazonensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is associated with disease progression in susceptible infected mice. Parasitology research 112 (2013) 2773-2782.

[82] G.N. Porcino, C. Carvalho-Campos, A.C. Maia, M.L. Detoni, P. Faria-Pinto, E.S. Coimbra, M.J. Marques, M.A. Juliano, L. Juliano, V.A. Diniz, S. Corte-Real, E.G. Vasconcelos, *Leishmania (Viannia) braziliensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1): Localization and in vitro inhibition of promastigotes growth by polyclonal antibodies. Exp Parasitol (2012).

[83] D. Moreira, N. Santarem, I. Loureiro, J. Tavares, A.M. Silva, A.M. Amorim, A. Ouaissi, A. Cordeiro-da-Silva, R. Silvestre, Impact of continuous axenic cultivation in *Leishmania infantum* virulence. PLoS neglected tropical diseases 6 (2012) e1469.

[84] A.C. Maia, G.N. Porcino, L. Detoni Mde, N.B. Emidio, D.G. Marconato, P. Faria-Pinto, M.R. Fessel, A.B. Reis, L. Juliano, M.A. Juliano, M.J. Marques, E.G. Vasconcelos, An antigenic domain within a catalytically active *Leishmania infantum* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is a target of inhibitory antibodies. Parasitol Int 62 (2013) 44-52.

[85] J. Sambrook, D.W. Russell, Molecular cloning : a laboratory manual, 2001.

[86] R.S. Vasconcelos, Expressão Heteróloga e Caracterização bioquímica da Nucleosídeo Trifosfohidrolase - 2 (NTPDase-2) de *Leishmania infantum chagasi*, Universidade federal de Viçosa, 2010.

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

[88] P.A. Manque, U. Woehlbier, A.M. Lara, F. Tenjo, J.M. Alves, G.A. Buck, Identification and characterization of a novel calcium-activated apyrase from

Cryptosporidium parasites and its potential role in pathogenesis. PLoS ONE 7 (2012) e31030.

[89] P. Ekman, O. Jager, Quantification of subnanomolar amounts of phosphate bound to seryl and threonyl residues in phosphoproteins using alkaline hydrolysis and malachite green. *Anal Biochem* 214 (1993) 138-141.

[90] ATCC, COS-7, 2014.

[91] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 (1976) 248-254.

[92] C. Mariotini-Moura, M.S. Bastos, F.F. de Castro, M.L. Trindade, R. de Souza Vasconcellos, M.A. Neves-do-Valle, B.P. Moreira, R. de Freitas Santos, C.M. de Oliveira, L.C. Cunha, X.M. Souto, G.C. Bressan, A. Silva-Junior, M.M. Baqui, M.T. Bahia, M.R. de Almeida, J.R. Meyer-Fernandes, J.L. Fietto, Trypanosoma cruzi nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion. *Acta Trop* (2013).

[93] J. Chen, Y. Liu, Y. Wang, H. Ding, Z. Su, Different effects of L-arginine on protein refolding: suppressing aggregates of hydrophobic interaction, not covalent binding. *Biotechnol Prog* 24 (2008) 1365-1372.

[94] M.N. Munkonda, G. Kauffenstein, F. Kukulski, S.A. Levesque, C. Legendre, J. Pelletier, E.G. Lavoie, J. Lecka, J. Sevigny, Inhibition of human and mouse plasma membrane bound NTPDases by P2 receptor antagonists. *Biochem Pharmacol* 74 (2007) 1524-1534.

[95] R. Coutinho-Silva, D.M. Ojcius, D.C. Gorecki, P.M. Persechini, R.C. Bisaggio, A.N. Mendes, J. Marks, G. Burnstock, P.M. Dunn, Multiple P2X and P2Y receptor subtypes in mouse J774, spleen and peritoneal macrophages. *Biochem Pharmacol* 69 (2005) 641-655.

[96] F. Jacob, C. Perez Novo, C. Bachert, K. Van Crombruggen, Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. *Purinergic signalling* 9 (2013) 285-306.

[97] M.R. Elliott, F.B. Cheken, P.C. Trampont, E.R. Lazarowski, A. Kadl, S.F. Walk, D. Park, R.I. Woodson, M. Ostantkovich, P. Sharma, J.J. Lysiak, T.K. Harden, N. Leitinger, K.S. Ravichandran, Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461 (2009) 282-286.

[98] C. Marques-da-Silva, G. Burnstock, D.M. Ojcius, R. Coutinho-Silva, Purinergic receptor agonists modulate phagocytosis and clearance of apoptotic cells in macrophages. *Immunobiology* 216 (2011) 1-11.

14. ANEXOS

14.1. ANEXO 1 – ARTIGO: Leishmania infantum ECTO-NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE DIPHOSPHOHYDROLASE-2 is an APYRASE INVOLVED in MACROPHAGE INFECTION and EXPRESSED in INFECTED DOGS

PLOS Neglected Tropical Diseases
Leishmania infantum ECTO-NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE
DIPHOSPHOHYDROLASE-2 is an APYRASE INVOLVED in MACROPHAGE
INFECTION and EXPRESSED in INFECTED DOGS
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Leishmania infantum ECTO-NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE DIPHOSPHOHYDROLASE-2 is an APYRASE INVOLVED in MACROPHAGE INFECTION and EXPRESSED in INFECTED DOGS
Short Title:	Leishmania infantum NTPDase-2 characterization
Article Type:	Research Article
Keywords:	Leishmania infantum, Ecto-Nucleotidase, Apyrase, CD39, Recombinante Protein, Biochemical Characterization, Immunolocalization, Macrophage Infection, Naturally Infected Dogs.
Corresponding Author:	Juliana Lopes Rangel Fietto Universidade Federal de Viçosa Viçosa, Minas Gerais BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal de Viçosa
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Raphael de Souza Vasconcellos
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Raphael de Souza Vasconcellos Christiane Mariotini-Moura Vasconcellos Rodrigo Saar Gomes Tiago Donatelli Serafim Rafaela de Cássia Firmino Matheus Silva Bastos Felipe Freitas de Castro Claudia Miranda de Oliveira Lucas Borges Pereira Anna Cláudia Alves de Souza Ronny Francisco de Souza Gabriel Andres Tafur Gómez Aimara da Costa Pinheiro Talles Eduardo Ferreira Maciel Abelardo Silva Júnior Gustavo Costa Bressan Márcia Rogéria Almeida Munira Muhammad Abdel Baqui Luís Carlos Crocco Afonso

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

14.2. ANEXO 2 – ARTIGO: TRYPANOSOMA CRUZI NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE DIPHOSPHOHYDROLASE 1 (TCNTPDASE-1) BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION, IMMUNOLocalIZATION AND POSSIBLE ROLE IN HOST CELL ADHESION

Acta Tropica 130 (2014) 140–147



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica



Trypanosoma cruzi nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion[☆]



Christiane Mariotini-Moura^{a,b}, Matheus Silva e Bastos^{a,b}, Felipe Freitas de Castro^{a,1}, Mellina Lanna Trindade^a, Raphael de Souza Vasconcelos^{a,b}, Myrian Augusta Araújo Neves-do-Valle^{a,b}, Bernardo Pereira Moreira^{a,1}, Ramon de Freitas Santos^{a,b,1}, Claudia Miranda de Oliveira^{a,b}, Luana Celina Seraphim Cunha^{a,3}, Xênia Macedo Souto^{a,2}, Gustavo Costa Bressan^a, Abelardo Silva-Júnior^g, Munira Muhammad Abdel Baqui^c, Maria Terezinha Bahia^d, Márcia Rogéria de Almeida^a, José Roberto Meyer-Fernandes^{e,f}, Juliana Lopes Rangel Fietto^{a,b,*}

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, CEP 36570-000 MG, Brazil

^b Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças Infecciosas – INBEQMeDI, Brazil

^c Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade De Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, CEP 14090-900 SP, Brazil

^d Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas – NUPEB, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, CEP 35400-000 MG, Brazil

^e Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, CEP 21941-590 RJ, Brazil

^f Instituto Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem, IMBEB, Brazil

^g Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, CEP 36570-000 MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 January 2013

Received in revised form 5 November 2013

Accepted 11 November 2013

Available online 19 November 2013

Keywords:

Recombinant protein

Trypanosoma cruzi

Nucleoside triphosphate

diphosphohydrolase

Immunolocalization

Adhesion

ABSTRACT

Previous work has suggested that *Trypanosoma cruzi* diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) may be involved in the infection of mammalian cells and serve as a potential target for rational drug design. In this work, we produced recombinant TcNTPDase-1 and evaluated its nucleotidase activity, cellular localization and role in parasite adhesion to mammalian host cells. TcNTPDase-1 was able to utilize a broad range of triphosphate and diphosphate nucleosides. The enzyme's K_m for ATP (0.096 mM) suggested a capability to influence the host's ATP-dependent purinergic signaling. The use of specific polyclonal antibodies allowed us to confirm the presence of TcNTPDase-1 at the surface of parasites by confocal and electron microscopy. In addition, electron microscopy revealed that TcNTPDase-1 was also found in the flagellum, flagellum insertion region, kinetoplast, nucleus and intracellular vesicles. The presence of this enzyme in the flagellum insertion region and vesicles suggests that it may have a role in nutrient acquisition, and the widespread distribution of TcNTPDase-1 within the parasite suggests that it may be involved in other biological process. Adhesion assays using anti-TcNTPDase-1 polyclonal antibodies as a blocker or purified recombinant TcNTPDase-1 as a competitor revealed that the enzyme has a role in parasite–host cell adhesion. These data open new frontiers to future studies on this specific parasite–host interaction and other unknown functions of TcNTPDase-1 related to its ubiquitous localization.

© 2013 The Authors. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: NTPDas, nucleoside triphosphate diphosphohydrolase; TcNTPDase-1, *T. cruzi* NTPDase-1; NDP, nucleoside diphosphate; NTP, nucleoside triphosphate.

[☆] This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs, s/n, Viçosa, CEP-36570-000 MG, Brazil. Tel: +55 031 31 38993042; fax: +55 031 31 38992374.

E-mail addresses: jufietto@ufv.br, jufietto@gmail.com (J.L.R. Fietto).

¹ Present address: Faculdade De Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, CEP 14090-900 SP, Brazil.

² Present address: Instituto Oswaldo Cruz-IOC-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, CEP 21040-360 RJ, Brazil.

³ Present address: Faculdade de Sergipe, FaSe – Faculdade de Sergipe, Aracaju, CEP 49020-490 SE, Brazil.

0001-706X/\$ – see front matter © 2013 The Authors. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.008>