

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

NANCY DA ROCHA TORRES PAVIONE

**NTPDase2 DE *Leishmania (Viannia) braziliensis*: EXPRESSÃO HETERÓLOGA,
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ANÁLISE DE INIBIDORES DERIVADOS
DA QUERCETINA**

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

NANCY DA ROCHA TORRES PAVIONE

**NTPDase2 DE *Leishmania (Viannia) braziliensis*: EXPRESSÃO HETERÓLOGA,
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ANÁLISE DE INIBIDORES DERIVADOS
DA QUERCETINA**

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

Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto

Coorientadores: Gustavo Costa Bressan

Raphael de Souza Vasconcellos

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

P338n
2022

Pavione, Nancy da Rocha Torres, 1989-
NTPDase2 de *Leishmania (Viannia) braziliensis*: expressão heteróloga, caracterização bioquímica e análise de inibidores derivados da quercetina / Nancy da Rocha Torres Pavione. – Viçosa, MG, 2022.

1 tese eletrônica (143 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.146>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Leishmania braziliensis*. 2. Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase-2. 3. Bioquímica. 4. Quercetina. I. Fietto, Juliana Lopes Rangel, 1971-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 616.9364

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

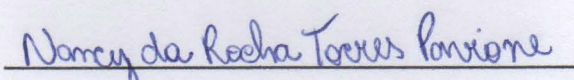
NANCY DA ROCHA TORRES PAVIONE

**NTPDase2 DE *Leishmania (Viannia) braziliensis*: EXPRESSÃO HETERÓLOGA,
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ANÁLISE DE INIBIDORES DERIVADOS
DA QUERCETINA**

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

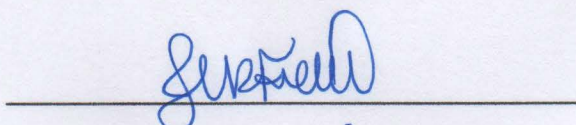
APROVADA: 23 DE FEVEREIRO DE 2022.

Assentimento:



Nancy da Rocha Torres Pavione

(Autora)



Juliana Lopes Rangel Fietto

(Orientadora)

A Deus, o criador de todas as coisas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o Autor e Consumador da minha fé, que faz Seus caminhos mais altos que os meus.

Sou grata à minha mãe, que me sustentou com sua fé e amor até aqui.

Aos meus familiares que, juntos, tornaram esse sonho possível: meu padrinho Walnir e tia Jaine, madrinha Iara, tia Wanda, Cynthia e Júnior, Patrícia e Tia Núbia (*in memoriam*).

Agradeço a Daniel, meu maior apoiador, por estar ao meu lado nos momentos difíceis, sendo minha paz no meio do caos, força e coragem quando eu precisei.

Sou grata à minha irmã, por suas orações neste período final.

À minha amiga Layla, por acolher meus medos e ser minha referência profissional e acadêmica. À minha amiga Elizabeth, que vivenciou junto comigo cada momento desta caminhada.

Agradeço à minha orientadora Juliana por me receber, me direcionar e me moldar como pesquisadora. O caminho não foi fácil, mas saio dele transformada.

Ao Sr. Valdir (*in memoriam*) por ter sido nosso ajudador e alegria no dia a dia. O senhor faz muita falta.

Agradeço ao meu amigo João por ter sido calma, direção e minha companhia nesta jornada. Obrigada pelo seu apoio, pela amizade e pelas incontáveis horas de trabalho dedicadas. Agradeço à Isa por incansavelmente me guiar e à Raissa por sempre ser ajuda e apoio. Agradeço a Joice e Amanda pelos conhecimentos compartilhados na pesquisa e na vida. Neste período, vocês foram minhas referências de conhecimento e dedicação.

Agradeço a todos os amigos com quem pude compartilhar um café e momentos de leveza, enquanto carregávamos o peso da responsabilidade de fazer a diferença com nosso trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES)- Código de financiamento 001.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa que me acolheu por mais de uma década e me preparou profissionalmente. Ao CNPq, FAPEMIG, BIOAGRO, Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA) e Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos (LBB) pela estrutura e auxílio para o desenvolvimento da pesquisa.

À Viçosa, por ser lugar de transformação e significado, onde pude moldar meu olhar para uma nova visão sobre mim e sobre a vida.

Porque assim como os céus são mais altos do que a terra, assim são os meus caminhos mais altos do que os vossos caminhos, e os meus pensamentos mais altos do que os vossos pensamentos (Isaías 55:9).

RESUMO

PAVIONE, Nancy da Rocha Torres, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022. **NTPDase2 de *Leishmania (Viannia) braziliensis*: expressão heteróloga, caracterização bioquímica e análise de inibidores derivados da quercetina.** Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto. Coorientadores: Gustavo Costa Bressan e Raphael de Souza Vasconcellos.

Leishmania (Viannia) braziliensis é o principal causador da Leishmaniose Tegumentar Americana. Os tratamentos não são sempre efetivos e apresentam efeitos adversos, sendo necessário o desenvolvimento de novas terapias. Correlação entre atividade ectonucleotidásica e virulência, em diferentes espécies de *Leishmania*, apontam para a importância das NTPDases como fatores de virulência do parasito. Neste trabalho, estudamos as variantes para rLbNTPDase2 dos isolados ET e NSL de *L. (V.) braziliensis*, com o objetivo de avaliar se diferenças bioquímicas podem estar relacionadas a diferenças na virulência desses isolados e avaliamos o potencial de inibição da rET-NTPDase2 por compostos derivados da quercetina. A sequência do ectodomínio (S43-E425) foi expressa em sistema bacteriano e as proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade a níquel. Nossos resultados mostram que as enzimas possuem 5 regiões conservadas de apirase (ACRs). As 4 mutações de rNSL-NTPDase-2 estão fora das ACRs e a mutação Q99P se localiza dentro do domínio B (R82-Y121), região antigênica conservada. Após expressão e purificação, foram identificadas bandas previstas de 45 KDa. Os resultados de atividade enzimática mostram que ambas são genuínas ENTPDases, pois hidrolisam nucleotídeos tri e difosfatados, mas não AMP. O perfil geral de hidrólise foi UDP>GDP>ADP>ATP=UTP para rET-NTPDase2 e GDP=UDP>ADP=ATP=UTP para rNSL-NTPDase2, sendo ambas difosfatases. rNSL-NTPDase2 apresenta maior taxa de hidrólise NTP:NDP, sugerindo que as mutações possam direcionar uma maior hidrólise de nucleotídeos trifosfatados. Adicionalmente, rNSL-NTPDase2 apresenta maior hidrólise de ATP, o que pode explicar, pelo menos parcialmente, sua maior virulência. Continuamos os ensaios de caracterização com a enzima rET-NTPDase2 e avaliamos o potencial de inibição de compostos derivados da quercetina. Nossos resultados mostram que a enzima foi inibida por suramina e DIDS, inibidores de outras ENTPDases. Altos valores de K_m para ATP, ADP e UDP sugerem improvável atuação na desativação de receptores purinérgicos. Contudo, sugerimos que a enzima tenha importância em situações específicas de alta concentração de nucleotídeos ou no ambiente intracelular. Dois compostos, IL-09 e IL-05, inibiram a atividade enzimática em 92,88% e 88,41% com excesso de substrato. Baixo valor de IC_{50} para o IL-09 (6.56 μ M), indica uma alta afinidade do composto com a enzima, ideia

reforçada pela cinética enzimática na presença de IL-09, que indica um perfil de inibição do tipo misto. Sua composição química sugere que a presença de benzilas nos grupamentos fenólicos possa ser determinante para a alta afinidade de interação do composto. Esperamos que este estudo possa contribuir para o entendimento das NTPDases em *L. braziliensis* e auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos para tratamento da leishmaniose tegumentar.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*. Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase-2. Bioquímica. Quercetina.

ABSTRACT

PAVIONE, Nancy da Rocha Torres, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2022. ***Leishmania (Viannia) braziliensis* NTPDase2: heterologous expression, biochemical characterization and analysis of quercetin derivative inhibitors.** Adviser: Juliana Lopes Rangel Fietto. Co-advisers: Gustavo Costa Bressan and Raphael de Souza Vasconcellos.

Leishmania (Viannia) braziliensis is a pathogenic protozoan causative of American Tegumentary Leishmaniasis. Treatments are not always effective and present adverse effects, requiring the development of new therapies. Correlation between ectonucleotidase activity and virulence in different species of *Leishmania*, point to NTPDases as important virulence factors of parasite. In this work, we study the rLbNTPDase2 variants of ET and NSL strains from *L. (V.) braziliensis* in order to evaluate if biochemical differences could be related to differences in virulence and evaluated the inhibition potential of rET-NTPDase2 by quercetin derivative compounds. The ectodomain sequence (S43-E425) was expressed in bacterial system and the recombinant proteins were purified by nickel affinity chromatography. Our results show that the enzymes have 5 apyrase conserved regions (ACRs). The 4 mutations of rNSL-NTPDase-2 are outside of ACRs and the Q99P mutation are located inside Domain B (R82-Y121), a conserved antigenic region. After expression and purification, predict bands of 45 KDa were identified. Enzymatic activity show that both enzymes are genuine ENTPDases, since they hydrolyze tri and diphosphates nucleotides, but not AMP. The overall hydrolysis was UDP>GDP>ADP>ATP=UTP for rET-NTPDase2 and GDP=UDP>ADP=ATP=UTP for rNSL-NTPDase2, both being diphosphatases. rNSL-NTPDase2 present a higher rate NTP:NDP, suggesting that the mutations could direct a higher hydrolysis of triphosphate nucleotides. Additionally, rNSL-NTPDase2 variant present a higher ATP hydrolysis, which could explain, at least partially, its higher virulence. We continue the characterization tests with rET-NTPDase2 and evaluated the inhibition potential of quercetin derivative compounds. Our results show that the enzyme was inhibited by suramin and DIDS, inhibitors of others NTPDases. High K_m values for ATP, ADP e UDP suggests unlikely role in the deactivation of purinergic receptors. However, we suggest relevant role in specific situations of high nucleotide concentration and in intracellular environment. Two compounds, IL-09 e IL-05, inhibited enzymatic activity by 92,88% and 88,41% using excess of substrate. Low IC_{50} value for IL-09 (6.56 μ M), indicates a high affinity of the compound, idea reinforced by the kinetic data in the presence of IL-09 compound, which indicates a mixed-type inhibition profile. Its chemical composition suggests that the benzil on the phenolic groups can be determinant for the high

affinity interaction of the compound. We hope that this study can contribute to understanding of NTPDases in *L. braziliensis* and help in the development of new drugs for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania braziliensis*. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2. Biochemistry. Quercetin.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
CAPÍTULO 1.....	17
RESUMO.....	17
ABSTRACT.....	18
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Leishmanioses.....	19
1.2. NTPDases de mamíferos e suas funções na sinalização purinérgica.....	22
1.3. NTPDases e suas funções em kinetoplastídeos.....	25
1.4. Variantes enzimáticas em <i>L. braziliensis</i> e sua possível associação com o desenvolvimento de diferentes formas clínicas.....	28
2. OBJETIVOS.....	31
2.1. Objetivo geral.....	31
2.2. Objetivos específicos.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Predição de região transmembrana e peptídeo sinal.....	31
3.2. Otimização de códons, desenho da construção e obtenção da síntese.....	32
3.3. Alinhamento múltiplo das NTPDases recombinantes com NTPDases de tripanossomatídeos e mamíferos.....	32
3.4. Predição de ponto isoelétrico e Massa Molecular.....	33
3.5. Avaliação das melhores condições de expressão.....	33
3.6. Testes de purificação da NTPDase2 de ET partir da fração solúvel.....	34
3.6.1. Purificação da rET-NTPDase2 por cromatografia de afinidade em steps.....	34
3.6.2. Teste de precipitação com sulfato de amônio.....	35
3.7. Expressão da NTPDase2 dos isolados ET e NSL e purificação das proteínas a partir dos corpos de inclusão.....	36
3.7.1. Teste de solubilização com Ureia.....	36
3.7.2. Testes de pré-purificação.....	36
3.7.3. Testes de purificação.....	37
3.7.4. Purificação da rETNTPdase2 na coluna HisTrap FF crude 5mL.....	38
3.8. Renaturação.....	39

3.9. Atividade enzimática.....	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1. Predição de região transmembrana e peptídeo sinal.....	40
4.2. Otimização de códons, desenho da construção e obtenção da síntese.....	42
4.3. Alinhamento múltiplo das NTPDases recombinantes com NTPDases de tripanossomatídeos e mamíferos.....	47
4.4. Predição de ponto isoelétrico e massa molecular.....	48
4.5. Avaliação das melhores condições de expressão.....	50
4.6. Teste de purificação da NTPDase2 de ET a partir da fração solúvel.....	51
4.6.1. Purificação da rET-NTPDase2 por cromatografia de afinidade e eluição em steps.....	51
4.6.2. Teste de precipitação com sulfato de amônio.....	54
4.7. Expressão da NTPDase2 dos isolados ET e NSL, purificação das proteínas a partir dos corpos de inclusão e renaturação.....	55
4.7.1. Teste de solubilização com Ureia.....	55
4.7.2. Testes de pré-purificação.....	56
4.7.3. Testes de purificação.....	57
4.7.4. Purificação das proteínas utilizando a coluna HisTrap FF crude 5 mL.....	59
4.8. Renaturação da NTPDase2 dos isolados ET e NSL.....	61
4.9. Atividade enzimática.....	63
5. DISCUSSÃO.....	66
6. CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXOS.....	77
CAPÍTULO 2.....	93
RESUMO.....	93
ABSTRACT.....	95
1. INTRODUÇÃO.....	96
2. OBJETIVOS.....	100
2.1. Objetivo geral.....	100
2.2. Objetivos específicos.....	100
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	100
3.1. Alinhamento múltiplo de sequências.....	100
3.2. Expressão heteróloga e purificação da rLbNTPDase2.....	101

3.3. Caracterização bioquímica da rLbNTPDase2.....	102
3.4. Determinação de K_m and V_{max}	103
3.5. Inibição da rLbNTPDase2 por compostos derivados da quercetina.....	104
3.6. Determinação de IC_{50} , K_m and V_{max} utilizando IL-09.....	104
4. RESULTADOS.....	105
4.1. Alinhamento da LbNTPDase2 com NTPDases de mamíferos e tripanossomatídeos.....	105
4.2. Expressão e purificação da rLbNTPDase2.....	106
4.3. Caracterização bioquímica da rLbNTPDase2.....	107
4.4. Ensaio de atividade com inibidores parciais de NTPDases.....	111
4.5. Cinética enzimática da rLbNTPDase2.....	114
4.6. Inibição da rLbNTPDase2 por compostos derivados da quercetina.....	116
4.7. Determinação de IC_{50} , K_m e V_{max} na presença de IL-09.....	119
4. DISCUSSÃO.....	121
5. CONCLUSÃO.....	130
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
ANEXOS.....	137

INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. São classificadas pela Organização Mundial de Saúde como Doenças Tropicais Negligenciadas (NTDs- Neglected Tropical Diseases) e estão associadas à pobreza, desnutrição, habitação precária e deslocamento populacional (CASULLI, 2021; WHO, 2021). Estima-se que haja de 700 mil a 1 milhão de novos casos da doença a cada ano, sendo 50 mil a 90 mil casos de leishmaniose visceral e 600 mil a 1 milhão de casos da forma cutânea (WHO, 2021).

Os tratamentos atuais são baseados em antimoniais pentavalentes, todavia estes compostos exibem alta toxicidade e potencial letalidade relacionada a efeitos adversos (DA JUSTA NEVES; CALDAS; SAMPAIO, 2009; LIMA et al., 2007; LYRA; PASSOS; PIMENTEL, 2016). Devido à complexidade da infecção, que envolve diferentes espécies e isolados e também a resposta imune do hospedeiro, os tratamentos não são sempre efetivos, sendo necessário o desenvolvimento de novas terapias (NOVAIS; AMORIM; SCOTT, 2021). Assim, o conhecimento sobre fatores de virulência do parasito pode contribuir não apenas para o desenvolvimento de novos fármacos, mas também para medidas de diagnóstico e prevenção.

NTPDases são enzimas pertencentes à família GDA1_CD39, que compartilham 5 regiões conservadas de apirase (ACRs) (KNOWLES, 2011). Estas enzimas hidrolisam nucleotídeos tri e difosfatados em nucleotídeos monofosfatados, na presença de cátions divalentes como cálcio e magnésio (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006). Em mamíferos são conhecidas 8 NTPDases (NTPDase1 a 8) que diferem em suas localizações e propriedades catalíticas (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006).

Em *Leishmania*, duas isoformas são descritas. A isoforma maior possui cerca de 70 kDa e a isoforma menor cerca de 42 kDa (FIETTO et al., 2004; VASCONCELLOS et al., 2014).

O papel das NTPDases tem sido intensivamente estudado ao longo dos anos e evidências apontam para seu papel na virulência, infecciosidade e modulação da resposta imune do hospedeiro (BERRÊDO-PINHO et al., 2001; FIETTO et al., 2004; MAIOLI et al., 2004; MARQUES-DA-SILVA et al., 2008; PAES-VIEIRA et al., 2021). Uma vez que essas enzimas são importantes fatores de virulência em *Leishmania*, o estudo de suas características estruturais e bioquímicas pode auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento das leishmanioses.

Há muitos anos o nosso grupo de pesquisa estuda as NTPDases de *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi*, contribuindo para a compreensão de suas características bioquímicas, de seus papéis no contexto da infecção (MARIOTINI-MOURA et al., 2014; SANTOS et al., 2009;

VASCONCELLOS et al., 2014) e no desenvolvimento e aplicação de novos produtos biotecnológicos (DA SILVA et al., 2020; DE SOUZA et al., 2020; FRANCISCO et al., 2013).

Pesquisas em desenvolvimento pelo nosso grupo buscam compreender como as características estruturais destas enzimas se relacionam com suas características de hidrólise. Além disso, parceria com colaboradores tem nos permitido investigar a atuação de novas moléculas com capacidade de inibição das NTPDases. Em parceria com o professor Gaspar Diaz Muñoz, uma série de compostos derivados da quercetina foi sintetizada e atualmente estão em testes em nosso laboratório.

Neste trabalho, apresentamos os resultados do estudo desenvolvido para NTPDase2 de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. No capítulo 1, abordamos o estudo da NTPDase2 dos isolados ET e NSL, mostrando os principais objetivos e resultados obtidos para a expressão heteróloga e purificação destas proteínas. No capítulo 2, descrevemos os resultados de caracterização bioquímica da NTPDase2 do isolado ET, bem como a avaliação do potencial de inibição desta enzima por compostos não naturais derivados da quercetina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERRÊDO-PINHO, M. et al. A Mg-Dependent Ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and Its Possible Role in Adenosine Acquisition and Virulence. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 391, n. 1, p. 16–24, 2001.
- CASULLI, A. New global targets for ntds in the who roadmap 2021–2030. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 5, p. 1–10, 2021.
- DA JUSTA NEVES, D. B.; CALDAS, E. D.; SAMPAIO, R. N. R. Antimony in plasma and skin of patients with cutaneous leishmaniasis - Relationship with side effects after treatment with meglumine antimoniate. **Tropical Medicine and International Health**, v. 14, n. 12, p. 1515–1522, 2009.
- DA SILVA, W. et al. ENTPDases from Pathogenic Trypanosomatids and Purinergic Signaling: Shedding Light towards Biotechnological Applications. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 213–226, 2020.
- DE SOUZA, A. C. A. et al. High Performance of ELISA test using recombinant rLiNTPDase2 from *Leishmania infantum*: a Phase II diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 209, n. January, p. 105535, 2020.
- FIETTO, J. L. R. et al. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, n. 2, p. 454–460, 2004.
- FRANCISCO, R. et al. Acta Tropica Recombinant *Leishmania (Leishmania) infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase NTPDase-2 as a new antigen in canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Acta Tropica**, v. 125, n. 1, p. 60–66, 2013.
- KNOWLES, A. F. The GDA1_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. **Purinergic Signalling**, v. 7, n. 1, p. 21–45, 2011.
- LIMA, M. V. N. DE et al. Leishmaniose cutânea com desfecho fatal durante tratamento com antimonial pentavalente. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 3, p. 269–271, 2007.
- LYRA, M. R.; PASSOS, S. R. L.; PIMENTEL, M. I. F. Pancreatic Toxicity As an Adverse Effect Induced By Meglumine Antimoniate. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, n. 5, 2016.
- MAIOLI, T. et al. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL / 6 mice. **Parasitology Research**, v. 94, p. 207–212, 2004.
- MARIOTINI-MOURA, C. et al. *Trypanosoma cruzi* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion. **Acta Tropica**, v. 130, n. 1, p. 140–147, 2014.
- MARQUES-DA-SILVA, E. D. A. et al. Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. **Microbes and Infection**, v. 10, p. 850–857, 2008.
- NOVAIS, F. O.; AMORIM, C. F.; SCOTT, P. Host-Directed Therapies for Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. March, p. 1–8, 2021.
- PAES-VIEIRA, L. et al. Differential regulation of E-NTPdases during *Leishmania amazonensis* lifecycle and effect of their overexpression on parasite infectivity and virulence.

Parasitology International, v. 85, 2021.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 409–430, 2006.

SANSOM, F. M. et al. Golgi-Located NTPDase1 of *Leishmania major* Is Required for Lipophosphoglycan Elongation and Normal Lesion Development whereas Secreted NTPDase2 Is Dispensable for Virulence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, 2014.

SANTOS, R. F. et al. Influence of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase Activity on *Trypanosoma cruzi* Infectivity and Virulence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 3, 2009.

VASCONCELLOS, R. D. S. et al. *Leishmania infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 is an Apyrase Involved in Macrophage Infection and Expressed in Infected Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, p. e3309., 2014.

WHO, 2021. Leishmaniasis. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 8 de janeiro de 2021.

CAPÍTULO 1

EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DA NTPDase2 DOS ISOLADOS ET e NSL de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

RESUMO

Leishmania (Viannia) braziliensis é o principal causador da Leishmaniose Tegumentar Americana. Esta doença exibe um espectro de manifestações clínicas associadas a diferentes isolados do parasito. Isolados de *L. (V.) braziliensis* apresentam diferenças de atividade ectonucleotidásica, o que pode influenciar a apresentação da doença pela modulação da resposta imune no hospedeiro. Neste sentido, ENTPDases são sugeridas como fatores de virulência e infecciosidade. A descoberta de variantes para ENTPDase2 em isolados de *L. (V.) braziliensis* levantou a hipótese de que algumas mutações pontuais possam explicar diferenças de atividade ectonucleotidásica e virulência. Neste trabalho, estudamos as enzimas recombinantes de ET e NSL, isolados que apresentam virulência diferenciada em modelo murino (NSL mais virulento), características polares quanto à hidrólise de nucleotídeos extracelulares (NSL tem maior atividade ectoATPDásica) e polimorfismos na sequência da NTPDase2. Nossos resultados indicam uma alta probabilidade de existência de uma única região transmembrana na porção N-terminal e ausência de peptídeo sinal. O alinhamento mostra que as enzimas recombinantes possuem 5 regiões conservadas de apirase (ACRs), presentes em outras NTPDases e que as 4 mutações de rNSL-NTPDase2 não estão presentes dentro de ACRs. Além disso, a mutação Q99P em rNSL-NTPDase2 se localiza dentro do domínio B (R82-Y121), região antigênica conservada. Após expressão em sistema bacteriano e purificação por cromatografia de afinidade, foi identificada a banda de tamanho predito de 45 KDa. Os resultados de atividade enzimática mostram que ambas são genuínas ENTPDases, pois hidrolisam nucleotídeos tri e difosfatados, mas não monofosfatados como AMP. O perfil geral de hidrólise foi $UDP > GDP > ADP > ATP = UTP$ para rET-NTPDase2 e $GDP = UDP > ADP = ATP = UTP$ para rNSL-NTPDase2, sendo ambas difosfatases. rNSL-NTPDase2 apresenta maior taxa de hidrólise NTP:NDP, sugerindo que as mutações possam direcionar uma maior hidrólise de nucleotídeos trifosfatados. Adicionalmente, rNSL-NTPDase2 apresenta maior hidrólise de ATP, o que pode explicar, pelo menos parcialmente, sua maior virulência. Contudo, novos experimentos devem ser realizados a fim de elucidar as características de hidrólise da variante enzimática de NSL de forma mais apurada.

ABSTRACT

Leishmania (Viannia) braziliensis is a pathogenic protozoan causative of American Tegumentary Leishmaniasis. The disease exhibit a spectrum of clinical manifestations related to different strains. Also, differences in ectonucleotidase activity of *L. (V.) braziliensis* strains was observed and could influence on clinical presentation by modulation of immune response in the host. In this sense, higher ecto-ATPDasic activity of ENTPDases is suggested as virulence factor and infectivity. Discovery of ENTPDase2 variants in *L. (V.) braziliensis* strains, raised the hypothesis that some point mutations could explain differences in activity and virulence. In this work, we study the recombinant enzymes of ET and NSL, strains that present different virulence in murine model (NSL more virulent), polar extracellular nucleotides hydrolysis (NSL has higher ectoATPDasic activity) and polymorphisms in NTPDase2 sequence. Our results indicate a high probability of a single N-terminal transmembrane region and absence of a signal peptide. The alignment show that the recombinant enzymes have 5 apyrase conserved regions (ACRs) present in other NTPDases and rNSL-NTPDase2 mutations are not within ACRs. Furthermore, the Q99P mutation in NSL enzyme is located on Domain B (R82-Y121), an antigenic conserved region. After expression in bacterial system and purification by affinity chromatography, the predict band of 45 kDa was identified. The enzymatic activity results show that both are genuine ENTPDases, once they hydrolyse nucleotides tri and diphosphate, but not AMP. rNSL-NTPDase2 present a higher rate NTP:NDP, suggesting that the mutations could direct a higher hydrolysis of triphosphate nucleotides. Additionally, rNSL-NTPDase2 variant present a higher ATP hydrolysis, which could explain, at least partially, its higher virulence. However, further experiments should be performed in order to elucidate the hydrolysis characteristics of NSL enzymatic variant in a more accurate way.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmanioses

Leishmanioses compreendem um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidos por insetos flebotomíneos (HARHAY et al., 2011)

Estes protozoários são parasitas digenéticos, que desenvolvem seu ciclo de vida em hospedeiros flebotomíneos e vertebrados. No Velho Mundo, os hospedeiros invertebrados são insetos hematófagos dos gêneros *Phlebotomus* e no Novo Mundo do gênero *Lutzomyia* (MAROLI et al., 2013). Os hospedeiros vertebrados incluem cães, roedores, equinos e o homem (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

Estima-se que mais de 20 espécies de *Leishmania* sejam responsáveis pela doença e pelas diferentes formas de manifestação clínica observadas (WHO, 2021). As principais espécies causadoras de leishmaniose visceral são *Leishmania infantum chagasi* nas Américas, Mediterrâneo, Oriente Médio, África Ocidental e Ásia Central e *Leishmania donovani* na Índia e África (HARHAY et al., 2011). As principais espécies causadoras leishmaniose tegumentar no Velho Mundo são *L. aethiopica*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major* e *L. tropica*. No Novo Mundo as espécies causadoras pertencem aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, sendo as principais: *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) venezuelensis* e *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana* e em alguns casos *L. shawi*, *L. naiffi*, *L. lainsoni* and *L. lindenbergi* (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013).

Os parasitos alternam entre diferentes formas evolutivas denominadas promastigota procíclica, promastigota metacíclica e amastigota (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999). O ciclo no hospedeiro invertebrado se inicia durante o repasto sanguíneo, no qual a fêmea do vetor ingere as formas amastigotas presentes nos macrófagos. No intestino, os amastigotas são liberados, se diferenciam em formas promastigotas procíclicas e iniciam o processo de divisão celular. Moléculas de LPG expressas na superfície celular atuam na adesão do parasito ao epitélio e, juntamente com gp63, protegem o parasito contra enzimas hidrolíticas do hospedeiro (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999). Alterações na estrutura do LPG são importantes para a diferenciação e liberação das formas infectantes promastigotas metacíclicas (SACKS et al., 1995). Adicionalmente LPG e aumento na expressão de gp63 auxiliam na resistência ao sistema complemento no hospedeiro vertebrado (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999).

Promastigotas metacíclicas, após inoculadas no hospedeiro vertebrado, podem ser fagocitadas por diferentes tipos celulares como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas,

eosinófilos e fibroblastos. Esse processo é mediado pela interação com diversos receptores do hospedeiro, como receptores de complemento (CR1, CR3 e CR4), receptor de manose-fucose, receptor de fibronectina e outros. Intracelularmente, dentro do vacúolo parasitóforo, desenvolvem-se em para formas denominadas amastigotas (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999; MCCONVILLE; NADERER, 2011).

As leishmanioses exibem um espectro de manifestações clínicas, podendo apresentar-se nas formas visceral, cutânea, mucosa, cutânea disseminada e cutânea difusa. Além destas formas principais, o acometimento cutâneo pode ocorrer na leishmaniose dérmica pós calazar após o tratamento de pacientes com leishmaniose visceral e na leishmaniose recidiva, que acomete cerca de 3-10% dos casos de leishmaniose cutânea, gerando lesões em torno ou dentro de cicatrizes de uma lesão curada previamente (VOLPEDO et al., 2021).

A infecção por *L. (V.) braziliensis* pode ocasionar o aparecimento de lesões ulcerosas no local da picada, que evoluem para cura, mas também pode levar ao surgimento de lesões com destruição progressiva de mucosas e à forma disseminada da doença (PIRMEZ, 1992; VOLPEDO et al., 2021). A evolução para diferentes formas clínicas está associada à resposta imune do hospedeiro e a fatores genéticos do parasito (ALVES-FERREIRA et al., 2015; VOLPEDO et al., 2021). No contexto imunológico, a evolução clínica está associada a um espectro de resposta imunológica, no qual um extremo é caracterizado por uma forte resposta imune de células T, com produção de altos níveis de IFN- γ e baixa carga parasitária e o outro extremo envolve a produção de anticorpos, deficiência da resposta mediada por células T do tipo Th1 e alta carga parasitária (SCOTT; NOVAIS, 2016). A figura 1 mostra o perfil de resposta imunológica envolvido na evolução das diferentes formas clínicas.

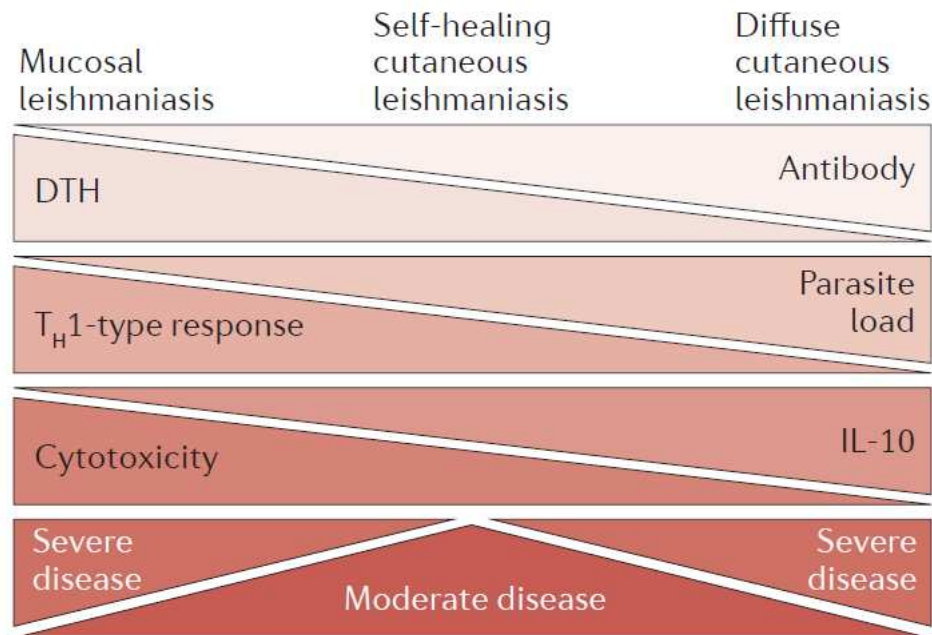


Figura 1: Perfil de resposta imunológica nas diferentes formas de apresentação clínica. A forma branda da doença envolve um balanço das repostas Th1 e Th2, como ocorre na leishmaniose cutânea. Apesar de uma forte resposta Th1 estar relacionada com a cura, a presença de uma resposta inflamatória exacerbada com presença de linfócitos TCD8⁺ está associada a intensa destruição tecidual com acometimento de mucosas e surgimento de lesões desfigurantes. No outro extremo do espectro, a forma difusa apresenta uma baixa resposta Th1, com teste de hipersensibilidade tardia (DTH: Delayed-type Hypersensitive) negativo, produção de anticorpos e alta carga parasitária. Fonte: Scott; Novais, 2016.

A forma mucosa (ML- Mucocutaneous leishmaniasis) pode surgir concomitantemente à forma cutânea ou se desenvolver meses ou anos depois da cura das lesões primárias, com o aparecimento de lesões ulcerosas graves desfigurantes que acometem as regiões do nariz, boca e garganta (VOLPEDO et al., 2021). Esta forma representa um extremo do espectro imunológico e está associada a uma resposta inflamatória exacerbada com polarização para as respostas Th1 e Th17 com produção de IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-17, presença de linfócitos TCD8⁺ e baixa produção de IL-10, o que leva a intensa destruição tecidual (VOLPEDO et al., 2021).

A forma cutânea localizada (LCL- Localized cutaneous leishmaniasis) é caracterizada pelo surgimento de lesões no local da picada do inseto vetor ou próximas e, dependendo da resposta imune do hospedeiro e da espécie de *Leishmania* envolvida, podem evoluir espontaneamente para cura, sem necessidade de tratamento (VOLPEDO et al., 2021). Este tipo de evolução está relacionado com uma forte resposta Th1, com produção de IL-12, IFN- γ , TNF- α e produção de ROS. Contudo, uma resposta Th2 com produção de IL-4 e IL-5 parece

influenciar na resolução desta forma clínica, promovendo remodelamento tecidual e cura das lesões (VOLPEDO et al., 2021).

A forma disseminada (DL- Disseminated leishmaniasis) é caracterizada pela presença de lesões múltiplas acneiformes, papulares, nodulares ou ulcerativas em diferentes regiões do corpo, podendo haver acometimento nasal em 44% dos pacientes. Diferente da forma difusa, apresenta resultado positivo para o teste cutâneo com antígeno de *leishmania* e apresenta poucos parasitos nas lesões. Esta forma está relacionada a uma menor produção de TNF- α e IFN- γ do que ocorre nos casos das formas LCL e ML, contudo a níveis similares de IL-5 e IL-10. Adicionalmente, parasitos isolados de pacientes com DL infectam e se multiplicam menos em neutrófilos do que parasitos isolados de pacientes com LCL. Além disso, neutrófilos infectados com isolados de pacientes com DL apresentam diminuição nos marcadores de ativação e de resposta oxidativa (VOLPEDO et al., 2021).

A forma difusa (ADCL- Anergic diffuse cutaneous leishmaniasis) leva ao desenvolvimento de lesões papulares não ulcerosas e ocorre pela infecção por *L. amazonenses* e *L. mexicana* nas Américas e por *L. aethiopica* na África. No contexto imunológico, se caracteriza por anergia de células T, com liberação de TGF- β por macrófagos, altos níveis de citocinas Th2 como IL-4, IL-5 e IL-10 e baixos níveis de IFN- γ (VOLPEDO et al., 2021).

Apesar do conhecimento sobre os aspectos imunológicos que envolvem as diferentes formas clínicas da doença, pouco se sabe sobre a influência de fatores do parasito que contribuem para este processo (ALVES-FERREIRA et al., 2015). Para *L. braziliensis*, análise de expressão gênica mostrou que isolados de lesões cutânea e mucosa não exibem grandes diferenças genômicas, contudo análise proteômica mostrou que LbrPGF2S (prostaglandin f2-alpha Synthase) e HSP70 foram superexpressas em isolados cutâneos. Superexpressão de LbrPGF2S foi correlacionada com aumento da infecção e do número de amastigotas intracelulares, sugerindo que esta enzima pode participar do perfil de patogênese no hospedeiro (ALVES-FERREIRA et al., 2015).

1.2. NTPDases de mamíferos e suas funções na sinalização purinérgica

Na sinalização purinérgica, as respostas são desencadeadas pela interação de nucleotídeos extracelulares com receptores purinérgicos. Os receptores do tipo P1 (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3) são acoplados à proteína G e respondem à ligação de adenosina. Os receptores do tipo P2 podem ser do tipo P2X ou P2Y. Os receptores P2X (P2X₁₋₇) são receptores do tipo canal e respondem primariamente ao ATP. Os receptores do tipo P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6,

P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄) são receptores acoplados a proteína G e se ligam a uma variedade de nucleotídeos (BOURS et al., 2006; BURNSTOCK, 2007).

Diversos trabalhos mostram a importância de nucleotídeos extracelulares na geração de respostas celulares. ATP estimula a migração e adesão de neutrófilos pela regulação de E-selectinas e ativação dos receptores P2Y₂ e P2X₇ estimula a degranulação e a produção de ROS, respectivamente (BOURS et al., 2006). Em monócitos, o ATP estimula a migração, adesão ao endotélio e a transmigração. Além disso, promove a produção de citocinas, quimiocinas, eicosanoides e regula processos como fagocitose, secreção de enzimas proteolíticas e produção de óxido nítrico (BOURS et al., 2006). A adenosina, por sua vez, promove redução da expressão de E-selectinas no endotélio, inibindo o rolamento e migração, e inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IFN- γ em macrófagos (BOURS et al., 2006). O UDP age como sinal de dano em células do epitélio bronquial e leva à liberação de citocinas pró-inflamatórias via ativação do receptor P₂Y₆ (HAO et al., 2014). Em monócitos, o UDP e sua interação com o receptor P₂Y₆ levam à expressão e produção de IL-8 (WARNY et al., 2001).

Neste contexto, é importante ressaltar a importância das NTPDases na mediação destes processos pela hidrólise de nucleotídeos extracelulares. Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases) são enzimas pertencentes à superfamília de proteínas GDA1_CD39 (apirase, EC 3. 6. 1. 5) e codificadas por genes ENTPD (KNOWLES, 2011; SANSOM, 2012). Em mamíferos foram identificados 8 tipos (NTPDase1 a 8), dos quais quatro são enzimas de superfície celular (NTPDase1, NTPDase2, NTPDase3 e NTPDase8) e quatro intracelulares (NTPDase4, NTPDase5, NTPDase6 e NTPDase7), porém formas secretadas de NTPDase 5 e 6 têm sido identificadas (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006; SANSOM, 2012). Classicamente, as NTPDases se diferenciam com relação à topologia de membrana, à presença de peptídeo sinal secretório e às características nucleotidásicas, como mostrado na figura 2.

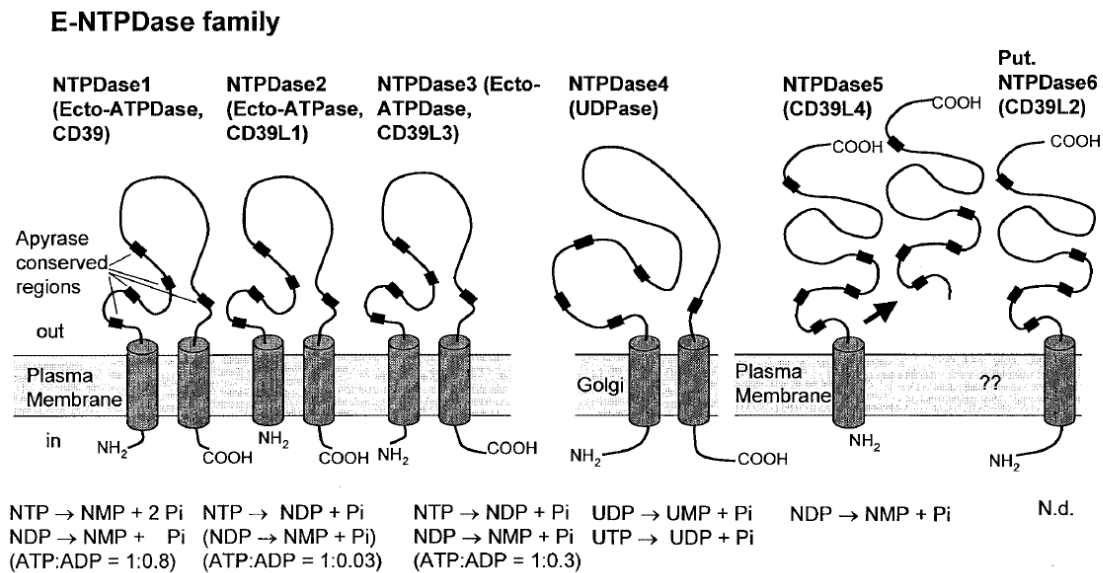


Figura 2: Topologia de membrana e propriedades catalíticas de membros da família E-NTPDase. NTPDases possuem regiões conservadas de apirase (ACR) e diferem nas características catalíticas, quantidade de domínios transmembrana e possibilidade de secreção (seta isoforma 5). Fonte: Zimmermann, 2000, adaptado.

NTPDases hidrolisam nucleotídeos tri e difosfatados em nucleotídeos monofosfatados, na presença de cátions divalentes como cálcio e magnésio. Compartilham 5 regiões conservadas de apirase (ACRs), cujas seqüências possuem resíduos de aminoácidos essenciais à sua função (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006; ZIMMERMANN, 2000; ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012).

Assim, possuem papel importante no organismo, regulando a concentração de nucleotídeos extracelulares, atuando na terminação da sinalização de nucleotídeos e na via de salvação de purinas (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012).

A atuação de NTPDases em conjunto com a 5' ectonucleotidase leva à produção de adenosina pela segunda enzima. A adenosina, por sua vez, pode se ligar a receptores A1, A2A, A2B e A3, gerando diversas respostas (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012). Em células T reguladoras, NTPDase 1/CD39 e 5' nucleotidase/CD73 têm papel importante na geração de adenosina, como também para supressão da resposta imune em outros conjuntos de linfócitos T (DEAGLIO et al., 2007).

1.3. NTPDases e suas funções em kinetoplastídeos

Considerando o papel das E-NTPDases na modulação de resposta imune e a presença destas enzimas em patógenos, é importante compreender seus papéis como possíveis mediadoras de infecção.

As NTPDases de *T. cruzi* (NTPDase1) e *Leishmania* (NTPDase1 e NTPDase2) se assemelham mais às isoformas 5 e 6 de mamíferos, como mostrado na figura 3 (FIETTO et al., 2004; VASCONCELLOS et al., 2014).

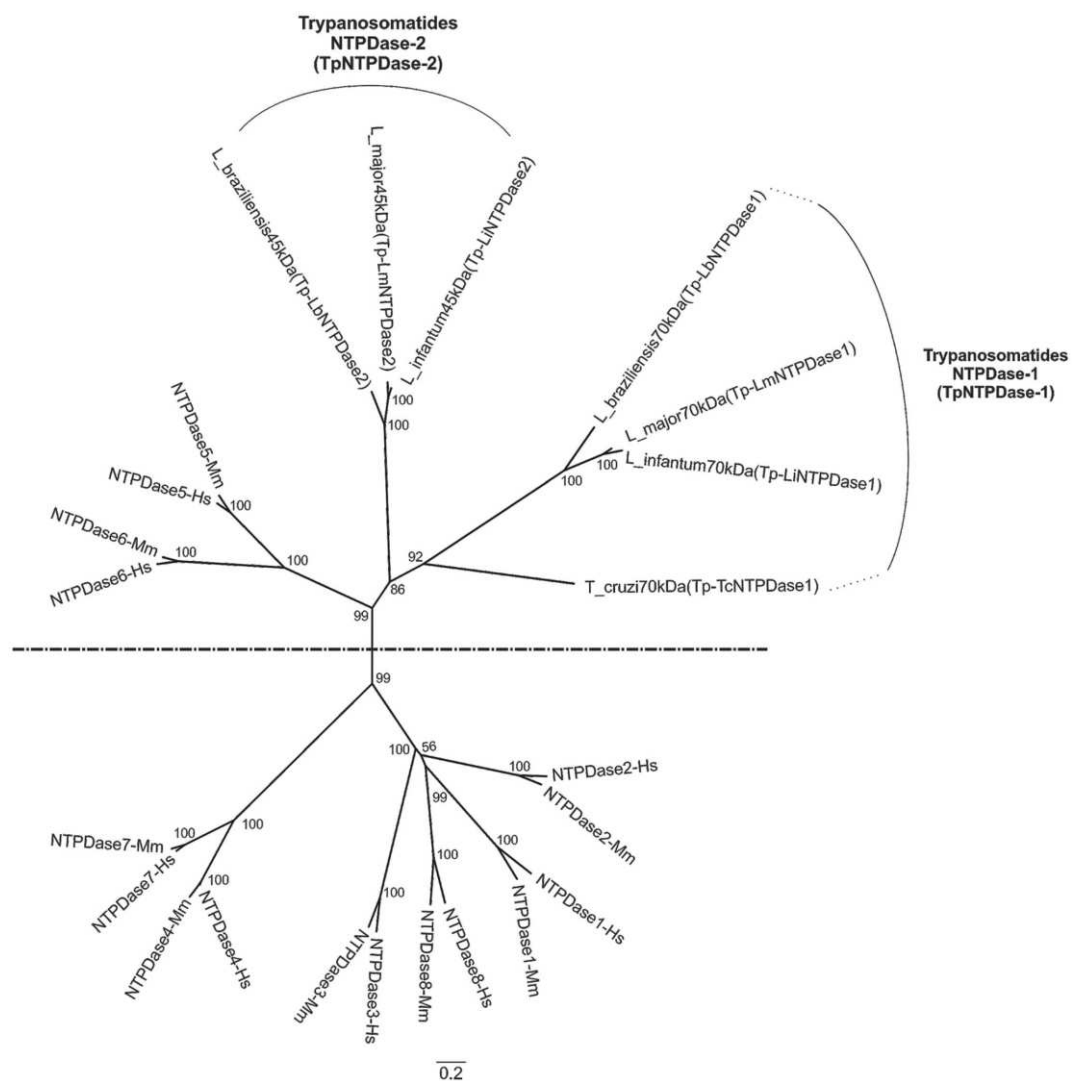


Figura 3: Árvore filogenética usando E-NTPDases de mamíferos e tripanosomatídeos (*Leishmania* e *T. cruzi*). As sequências das NTPDases foram alinhadas no programa CLC worbench e usadas para construir a árvore filogenética usando o método *Neighbor Joining* com análises *bootstrap* (números nas ramificações). *Mus musculus* (Mm); *Homo sapiens* (Hs). Tripanosomatídeos tem duas ENTDPases com exceção de *T. cruzi*, que tem apenas uma ENTDPase no banco de dados. ENTDPases de tripanosomatídeos são mais similares às isoformas 5 e 6 de mamíferos e estão agrupadas no ramo superior da árvore. Fonte: Vasconcellos et al., 2014, adaptado.

Em *T. cruzi*, a TcNTPDase foi identificada na superfície celular, flagelo, inserção flagelar, cinetoplasto, núcleo e vesículas intracelulares (MARIOTINI-MOURA et al., 2014).

A ampla distribuição celular das NTPDases em *Leishmania* é uma característica comum observada em diferentes espécies (DETONI et al., 2013; MAIA et al., 2019; PORCINO, 2016; PORCINO et al., 2012; VASCONCELLOS et al., 2014). Em *L. braziliensis* e *L. infantum chagasi*, a NTPDase2 foi identificada em formas amastigotas (MAIA et al., 2019; PORCINO, 2016) e em diferentes locais em formas promastigotas, como membrana plasmática, bolso flagelar, flagelo, mitocôndria, cinetoplasto, núcleo e vesículas citoplasmáticas (PORCINO et al., 2012; VASCONCELLOS et al., 2014). Em formas promastigotas de *L. amazonensis*, a isoforma de 58 KDa-63 KDa foi identificada na membrana celular, mitocôndria, núcleo, flagelo, bolso flagelar e vesículas citoplasmáticas (DETONI et al., 2013).

Em *L. major*, a isoforma menor (40 KDa) se localiza do aparelho de Golgi, com função relacionada à elongação do LPG e papel nos estágios iniciais da infecção. Esse trabalho sugere que a enzima atue indiretamente em vias de glicosilação no Golgi, levando à síntese de LPG menores. Os autores identificaram que a isoforma maior (70 kDa) é secretada e sugerem que sua função é dispensável para a virulência nesta espécie, uma vez que o gene deletado não impactou significativamente no curso da infecção em modelo murino (SANSOM et al., 2014).

Estudos mostram a possível participação das NTPDases na adesão e na proliferação celular. Em *L. amazonensis* o uso de adenosina e anticorpos anti-NTPDase levaram a menor interação dos parasitas com macrófagos, sugerindo a participação dessas enzimas na adesão do parasito à célula hospedeira (PINHEIRO et al., 2006). Para *L. braziliensis*, anticorpos policlonais, produzidos contra epítomos conservados dentro do domínio B da LbNTPDase2, foram capazes de reduzir a atividade da enzima e a proliferação *in vitro*, apontando sua importância para o crescimento do parasito (PORCINO et al., 2012). Estudo com *L. infantum chagasi* demonstra que a enzima recombinante e anticorpos policlonais foram capazes de reduzir a adesão e a infecção, sugerindo seu papel da LicNTPDase2 nestes processos (VASCONCELLOS et al., 2014). Em ensaios com *T. cruzi*, o uso de anticorpos policlonais e da NTPDase1 recombinante foram capazes de reduzir a adesão dos parasitos, sugerindo a existência de sítios de interação com a enzima no hospedeiro (MARIOTINI-MOURA et al., 2014).

O papel das NTPDases na infecciosidade e na virulência em tripanossomatídeos é amplamente descrito na literatura. Estudo identificou atividade ecto-ATPásica dependente de magnésio na superfície de *T. cruzi* e demonstrou que as formas infecciosas (tripomastigotas e amastigotas) apresentam maior atividade que epimastigotas (MEYER-FERNANDES et al.,

2004). Além disso, o uso de inibidores de ATPases (DIDS e suramina) levou à inibição da atividade, da adesão e da internalização do parasito em macrófagos (BISAGGIO et al., 2003).

NTPDase com ampla especificidade para nucleotídeos tri e difosfatados foi identificada na superfície de *T. cruzi*. Foi observada maior taxa de hidrólise ATP/ADP nas formas infecciosas tripomastigotas, sugerindo que esta enzima participe na modulação de processos na infecção (FIETTO et al., 2004). Outro estudo demonstrou que o uso de inibidores de ecto-ATPDases foi capaz de reduzir a atividade ecotonucleotidásica e a infecção *in vitro* e *in vivo* em modelo murino (SANTOS et al., 2009).

Mariottini-Moura e colaboradores avaliaram as características cinéticas da NTPDase I recombinante de *T. cruzi* e observaram baixo valor de K_m para o ATP (0.096 mM), sugerindo sua participação na modulação da sinalização purinérgica durante a infecção (MARIOTTINI-MOURA et al., 2014).

Em *L. amazonenses*, atividade ATPásica foi caracterizada na superfície celular e foi demonstrado que parasitas virulentos hidrolisam mais ATP que avirulentos (BERRÊDO-PINHO et al., 2001).

Estudo comparando a infecção por *L. amazonenses* e *L. braziliensis* em camundongos C57BL/6 demonstrou que a infecção por *L. amazonenses* levou ao desenvolvimento de lesões crônicas, maior quantidade de parasitos e menor produção de INF- γ e TNF. Maior hidrólise de AMP foi observada para esta espécie e os autores sugerem que a imunossupressão observada possa estar relacionada com maior geração de adenosina (MAIOLI et al., 2004).

Comparando a infecção por diferentes espécies em modelo murino, foi observado que *L. braziliensis* e *L. major*, causadoras de uma apresentação clínica mais branda em camundongos C57BL6, também apresentaram menor hidrólise de nucleotídeos extracelulares, quando comparadas com *L. amazonensis*. Interessantemente, quando promastigotas de *L. braziliensis* foram tratadas com molibdato de amônio, um inibidor da 5' ectonucleotidase, foi observado aumento na hidrólise de AMP, sugerindo um aumento da expressão da enzima na presença do inibidor. Estes parasitos foram capazes de gerar maior lesão e parasitismo quando inoculados em camundongos C57BL/6. Adicionalmente, adição de adenosina no inóculo levou a maior parasitismo, aumento no tamanho das lesões, menor infiltrado inflamatório e atraso na resolução da infecção. O uso de MRS 1754, antagonista de receptores A_{2B} , foi relacionado com menor parasitismo e tamanho das lesões. Esses resultados indicam que a adenosina nos estágios iniciais da infecção promove aumento no tamanho das lesões, provavelmente relacionado ao controle da resposta imune (MARQUES-DA-SILVA et al., 2008).

Gomes e colaboradores demonstraram que, em *L. amazonensis*, a atividade ectonucleotidásica está relacionada à modulação de citocinas inflamatórias, redução da produção de óxido nítrico e manutenção da infecção de macrófagos (GOMES et al., 2015).

1.4. Variantes enzimáticas em *L. (V.) braziliensis* e sua possível associação com o desenvolvimento de diferentes formas clínicas

Diferenças na atividade ectonucleotidásica intra-espécie em *L. (V.) braziliensis* e sua associação com o desenvolvimento para diferentes formas clínicas têm sido investigado (LEITE et al., 2012). Isolados com maior hidrólise de nucleotídeos extracelulares (ATP, ADP e AMP) estão associadas a atraso no desenvolvimento de lesões e alta carga parasitária, sugerindo o papel das ectonucleotidases no controle da resposta imune nos estágios iniciais da infecção, favorecendo a multiplicação do parasito. Interessantemente, foi observado que isolados de lesões mucosas apresentam maior hidrólise de nucleotídeos e atraso no pico de desenvolvimento das lesões (LEITE et al., 2012).

A fim de compreender a infecciosidade e a resposta imune em modelo murino, os autores avaliaram a infecção por dois isolados: PPS6m, isolado mucoso de alta atividade de hidrólise de nucleotídeos de adenina e SSF, isolado cutâneo de baixa atividade. A infecção por PPS6m promoveu atraso no desenvolvimento das lesões, maior carga parasitária e menor infiltrado celular nos primeiros estágios da infecção, enquanto a infecção por SSF demonstrou características de remodelamento tecidual e baixo parasitismo. Esses resultados indicam que a maior hidrólise de nucleotídeos extracelulares promove atraso no recrutamento de linfócitos para o sítio de lesão (LEITE et al., 2012). PPS6m também foi capaz de modular a resposta imune reduzindo a ativação de células dendríticas e a produção de óxido nítrico, indicando a possível relação entre atividade enzimática e desenvolvimento da forma clínica (LEITE et al., 2012). Interessantemente, quando avaliaram o isolado cutâneo de alta atividade (HPV6), os autores observaram comportamento similar ao PPS6m, sugerindo que a atividade possa ser mais determinante para a resistência a ativação do macrófago do que para o tipo de lesão. Contudo, lesões mucosas se desenvolvem após uma lesão cutânea primária, e os autores sugerem que isolados cutâneos de alta atividade como HPV6 possam progredir para a forma mucosa, contudo esta hipótese ainda necessita de investigação (LEITE et al., 2012).

Com o objetivo de explicar as diferentes atividades ecto-ATPase e ADPase, os autores investigaram a sequência primária da LbNTPDase2 de diferentes isolados e encontraram polimorfismos de base única (SNPs) que poderiam, em parte, justificar as diferenças observadas

na hidrólise de ATP e ADP, e talvez, estarem associados ao perfil de virulência (LEITE et al., 2012). Contudo, associação específica entre os polimorfismos e a atividade enzimática não foi avaliada.

Este estudo motivou nosso grupo de pesquisa a estudar os isolados ET e NSL de *L. (Viannia) braziliensis* a fim de avaliar como a estrutura primária e características bioquímicas poderiam estar relacionadas às diferenças de hidrólise observadas.

Em nossos estudos no Mestrado, isolamos o DNA genômico dos isolados, amplificamos o gene que codifica para a NTPDase2 e clonamos no vetor pJET 1.2/*blunt*. Os clones obtidos foram confirmados e analisados quanto à presença de polimorfismos de base única (TORRES, 2017).

Identificamos duas sequências distintas para o isolado NSL e apenas uma sequência idêntica para o isolado ET. Em todos os 4 clones obtidos para ET foram encontrados SNPs silenciosos nas posições 861 e 879. Esses mesmos SNPs foram encontradas em dois dos seis clones NSL, porém os demais apresentaram SNPs silenciosos na posição 213 e não silenciosos nas posições 296, 377, 554 e 1126. A tradução das sequências mostrou que esses SNPs apresentam mudança na sequência de aminoácidos nas posições 99, 126, 185 e 376. Diferentemente as posições 861 e 879 nos clones ET não levam à alteração na sequência de aminoácidos, confirmando os dados obtidos previamente por Leite e colaboradores (LEITE et al., 2012; TORRES, 2017).

Nesta Tese, uma vez que observamos que a variante mutada está presente apenas na cepa de NSL, vamos denominá-la como NSL-NTPDase2 e a variante não mutada será denominada ET-NTPDase2.

Com o objetivo de avaliar a localização das mutações na estrutura tridimensional, foram construídos modelos no programa I-TASSER. Nossos resultados mostraram que as ACRs estão em regiões de alfa hélices e folhas beta no interior da estrutura e que as mutações Q99P, S126F e N185S em NSL-NTPDase2 estão na superfície da enzima e a mutação T376A se localiza internamente (Figura 4 A e B) (TORRES, 2017).

Com o objetivo de verificar se a mutação interna se posicionava próximo à região de ligação ao substrato, alinhamos as estruturas com o cristal da NTPDase2 de *Rattus norvegicus* em complexo com AMPPNP (Rn-NTPDase2-3cja) (ZEBISCH; STRÄTER, 2008). A mutação interna T376A se localiza próximo a um resíduo de tirosina na estrutura 3D (Y398), predito como importante para interação com a base nitrogenada do substrato na Rn-NTPDase2 (Figura 4C e 4D). Assim, a enzima NSL-NTPDase2 apresenta uma alanina nessa região e a enzima ET-NTPDase2 uma treonina (Figura 4) (TORRES, 2017).

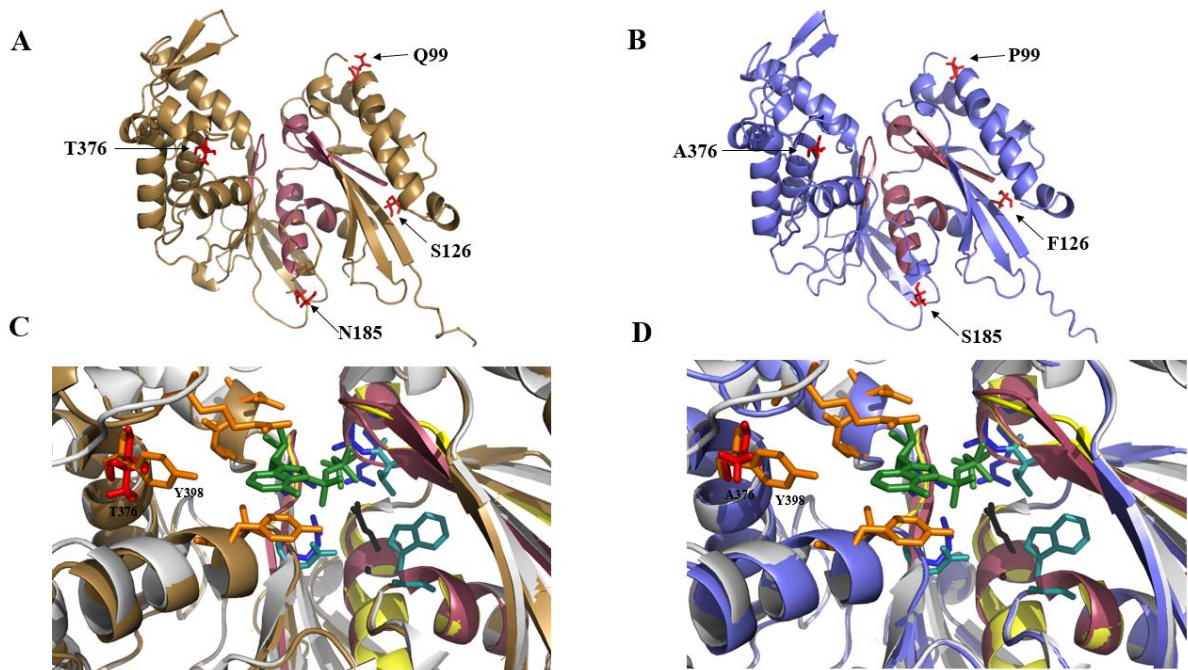


Figura 4: Análise das mutações na estrutura 3D. (A) Modelo da ET-NTPDase2 evidenciando os resíduos de glutamina, serina, asparagina e treonina (vermelho) e as ACRs no interior na estrutura (rosa). (B) Modelo da NSL-NTPDase2 evidenciando os resíduos mutados de prolina, fenilalanina, serina e alanina (vermelho) e as ACRs no interior da estrutura (rosa). (C) Modelo ET-NTPDase2 (marrom) alinhado à Rn-NTPDase2 (cinza) em complexo com AMPPNP, mostrando o resíduo de treonina alinhado com Y398 e os resíduos na enzima de rato importantes para ligação ao substrato (laranja), posicionamento da água nucleofílica (azul), coordenação do cálcio (ciano) e o resíduo catalítico E165 (preto). (D) Alinhamento do modelo NSL-NTPDase2 (azul) com Rn-NTPDase2 (cinza) em complexo com AMPPNP, mostrando o resíduo de alanina da enzima de NSL (vermelho) alinhado com Y398 da enzima de rato (laranja). Fonte: Torres, 2017.

Considerando o exposto até aqui e os resultados observados por Leite e colaboradores para isolados ET e NSL (LEITE et al., 2012), hipotetizamos que as mutações pudessem influenciar nas características catalíticas destas enzimas. Sugerimos que a presença da alanina próxima da região de ligação ao substrato em NSL-NTPDase2 possa afetar a interação, levando a maior hidrólise de nucleotídeos trifosfatados (TORRES, 2017).

Assim iniciamos estudos experimentais para obter as proteínas recombinantes expressas em *E. coli*. Após análise dos clones obtidos no pJET, as duas variantes encontradas foram subclonadas no vetor de expressão pET21b para avaliar a expressão das proteínas. Contudo, após indução com IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactoside) não foi possível a identificação das enzimas com anticorpo monoclonal anti-polyHistidine (anti-His) nem com anticorpo policlonal anti-rLicNTPDase2, o que indicava que as enzimas não foram expressas. Assim decidimos fazer a otimização de códons e mudança de vetor para iniciar novamente o estudo destas enzimas recombinantes.

O capítulo 1 desta tese sumariza as metodologias para obtenção das construções no vetor pET28a, utilizando as sequências otimizadas para expressão em *E. coli*. Além disso, apresentamos os testes realizados a fim de obter as melhores condições de expressão e purificação, bem como algumas análises de caracterização enzimática das enzimas recombinantes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Expressão heteróloga e caracterização bioquímica da NTPDase2 dos isolados ET e NSL de *L. (V.) braziliensis*.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a presença de peptídeo sinal e domínio transmembrana.
- Avaliar a presença de regiões conservadas de apirase, comparando com NTPDases de mamíferos e outros tripanossomatídeos.
- Avaliar as melhores condições de expressão das enzimas recombinantes em sistema bacteriano.
- Padronizar a purificação das enzimas por cromatografia de afinidade a níquel.
- Avaliar as proteínas recombinantes quanto às suas características de hidrólise em diferentes condições de temperatura e preferência por substrato.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Predição de região transmembrana e peptídeo sinal

A sequência da ATP difosfohidrolase de *L. braziliensis* (LbrM.15.0030) disponível no TriTrypDB, foi utilizada como base para obtenção do ectodomínio. A predição de peptídeo sinal foi feita na plataforma SignalP 5.0 (NIELSEN, 2017) e de região transmembrana na plataforma TMHMM 2.0 (KROGH et al., 2001).

3.2. Otimização de códons, desenho da construção e obtenção da síntese

As sequências que codificam para o ectodomínio (S43-425E) foram otimizadas para expressão em *E. coli* utilizando a ferramenta Codon Optimization na plataforma Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/pages/tools/codon-optimization-tool#get-started-target>). Em seguida, as sequências em modelo FASTA foram importadas para o programa Geneious 6.0.6, para confirmação do produto gerado pelas sequências otimizadas e análise de restrição para escolha dos sítios de restrição a serem utilizados no vetor. Além disso, foi feita uma clonagem virtual para análise do frame e obtenção das sequências das enzimas recombinantes.

As sequências foram quimicamente sintetizadas e subclonadas no vetor pET28a pela empresa FastBio, usando os sítios de restrição de *Hind* III e *Nde* I. As construções no vetor pET28a adicionam uma Hexa-His tag na região N-terminal das proteínas recombinantes. As construções foram confirmadas por sequenciamento e digestão enzimática e transformadas em células DH5-Alpha para amplificação do plasmídeo. O sequenciamento foi alinhado com as sequências otimizadas, com a sequência referência e traduzido para confirmação no programa Geneious 6.0.6.

3.3. Alinhamento múltiplo das NTPDases recombinantes com NTPDases de tripanossomatídeos e mamíferos

Alinhamento múltiplo de sequências foi feito no programa Clustal W usando o software MEGA X, versão 10.2.5. As sequências das NTPDases recombinantes dos isolados ET e NSL foram alinhadas com as sequências de NTPDases de parasitos e mamíferos, obtidas em bancos de dados. TriTrypDB foi usado para as seguintes sequências: *L. braziliensis* (LbrM.15.0030), *L. major* (LmjF.15.0030), *L. infantum* (LINF_150005200), *L. amazonenses* (LAMA_000225600), *L. panamensis* (LPAL13_150005200), *L. donovani* (LdBPK_150030.1), *Leishmania aethiopica* (LAEL147_000207800), *Leishmania tropica* (LTRL590_150005200) and *Leishmania mexicana* (LmxM.15.0030). UniProtKB foi utilizado para NTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi* (Q6QHT8), NTPDase2 de *Rattus norvegicus* (O35795-1) e para NTPDases humanas NTPDase 1 (P49961), NTPDase 2 (Q9Y5L3-1) NTPDase 3 (O75355), NTPDase 4 (Q9Y227-1), NTPDase 5 (O75356), NTPDase 6 (O75354), NTPDase 7 (Q9NQZ7-1) e NTPDase 8 (Q5MY95-1). O alinhamento foi editado utilizando o software BioEdit versão 7.2.5 (HALL, 1999), para evidenciar as ACRs e a região do Domínio B, que foram anotadas como descrito na literatura (PORCINO et al., 2012; ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012).

3.4. Predição de ponto isoelétrico e Massa Molecular

O ponto isoelétrico e a massa molecular teóricos das enzimas recombinantes foram obtidos utilizando a ferramenta *Compute PI/MW* disponível através do servidor *ExPASy* (GASTEIGER et al., 2005).

3.5. Avaliação das melhores condições de expressão

As construções foram utilizadas para transformar células de *E. coli* BL21 (DE3) RIL competentes para expressão das proteínas. O pré-inóculo foi crescido com 50 µg/mL de canamicina por 12 a 16 h. A cultura foi então transferida para 400 mL de meio LB e crescida à 37 °C, 180 rpm até DO₆₀₀ entre 0,6 e 0,8 e peletizada a 11.627 g por 10 minutos.

Para análise do tempo de expressão, a cultura foi induzida com 0,6 mM de IPTG e pellets de 50 mL foram obtidos a cada tempo para análise do extrato total. O extrato total foi obtido pela ressuspensão dos pellets em 2 mL de tampão de lise (50 mM Tris; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol). Lisozima (50 mg/ml) e os inibidores de proteases foram adicionados (Pepstatina A 1 µg/mL, Aprotinina 2 µg/mL, Leupeptina 2 µg/mL). A ressuspensão foi mantida à 4°C por 30 minutos e sonicada em ciclos de 10 segundos por 2 minutos com amplitude de 20 Hz. As amostras foram dosadas por Bradford e 20 µg de proteína total foi analisada por SDS-PAGE e western blotting utilizando anticorpo monoclonal anti-His tag, produzido em camundongo, como anticorpo primário (SIGMA - H1029), na diluição de 1:2000 sob agitação por 2h e anticorpo policlonal anti-mouse IgG, produzido em coelho, conjugado com HRP, como anticorpo secundário (SIGMA - A9044), na diluição de 1:10.000 sob agitação por 2 h. A revelação foi feita utilizando 3, 3' diaminobenzidine (SIGMA-D8001) e peróxido de hidrogênio. Para a repetição do teste de tempo para rET-NTPDase2, 40ug de proteína foi adicionado ao gel e revelado com anticorpo monoclonal anti-His tag, produzido em camundongo, como anticorpo primário (SIGMA - H1029), na diluição de 1:1000 sob agitação por 2h e anticorpo policlonal anti-mouse IgG, produzido em coelho, conjugado com HRP, como anticorpo secundário (SIGMA - A9044), na diluição de 1:10.000 sob agitação por 2 h. A revelação foi feita utilizando 3, 3' diaminobenzidine (SIGMA-D8001) e peróxido de hidrogênio.

Para avaliar se os fragmentos observados nas amostras poderiam ser resultantes de uma alta taxa de expressão das proteínas, foi feita a avaliação da indução em concentrações menores de IPTG (0,2 mM, 0,1 mM e 0,05 mM). As induções foram feitas nos melhores tempos para cada proteína, variando a concentração de IPTG. Os pellets foram processados e analisados

como descrito anteriormente para análise do teste de tempo e analisados por SDS-PAGE e western blotting.

Para análise da presença da proteína na fração solúvel e corpo de inclusão as amostras foram expressas nas melhores condições e processadas como descrito a seguir. Para obtenção da fração solúvel 300 mL de indução foi ressuspensa em 30 mL de tampão de lise (50 mM Tris; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol), lisozima (50 mg/ml) e os inibidores de proteases foram adicionados (Pepstatina A 1 µg/mL, Aprotinina 2 µg/mL, Leupeptina 2 µg/mL). A ressuspensão foi mantida à 4°C por 30 min e sonicada em ciclos de 10 segundos por 2 minutos com amplitude de 20 Hz e centrifugado a 11.627 g por 15 min. O sobrenadante foi filtrado em filtro 0,45 µm e purificado por cromatografia de afinidade e analisado por SDS-PAGE e western blotting. Para análise da presença da proteína nos corpos de inclusão, pellets de 300 mL foram lisados como descrito anteriormente. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensa em 20 mL de tampão de solubilização. O solubilizado foi filtrado em filtro 0,45 µm e purificado por cromatografia de afinidade e analisado por SDS-PAGE e western blotting.

Para o western blotting utilizamos anticorpo monoclonal anti-His tag, produzido em camundongo, como anticorpo primário (SIGMA - H1029), na diluição de 1:1000 sob agitação por 2h e anticorpo policlonal anti-mouse IgG, produzido em coelho, conjugado com HRP, como anticorpo secundário (SIGMA - A9044), na diluição de 1:10.000 sob agitação por 1 h. A revelação foi feita utilizando 3, 3' diaminobenzidina (SIGMA-D8001) e peróxido de hidrogênio.

3.6. Testes de purificação da NTPDase2 de ET partir da fração solúvel

3.6.1. Purificação da rET-NTPDase2 por cromatografia de afinidade em steps

Como havíamos observado a expressão da proteína sem a adição do indutor no tempo de 0h e como a superexpressão leva a formação de agregados em corpos de inclusão, 1600 mL de cultura foram crescidos até a DO_{600} 0,6 e em seguida centrifugada à 11.627 g por 10 minutos para sedimentação celular. Os sedimentos de 400 mL foram ressuspensa em 40mL de tampão de lise e processados para obtenção da fração solúvel como descrito anteriormente na secção anterior (Tópico 3.5). Em seguida o lisado foi filtrado em membrana 0,45 µm e purificado por cromatografia de afinidade ao níquel utilizando o sistema Akta Purifier (GE), utilizando uma coluna HisTrap FF crude 5 ml. Após a aplicação da amostra foi feita uma lavagem com tampão A (Tris 50 mM; NaCl 500 mM; Imidazol 10 mM, pH 7,5) até UV próxima de 0 mAU e eluída em steps de concentrações de tampão B (50 mM Tris; 500 mM NaCl; 350

mM Imidazol; pH 7,5), 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 80% e 100%. As alíquotas correspondentes às diferentes frações foram analisadas por SDS-PAGE com coloração com comassie blue e western blotting utilizando anticorpo monoclonal anti-His tag, produzido em camundongo, como anticorpo primário (SIGMA - H1029), na diluição de 1:7000 sob agitação por 1h e anticorpo policlonal anti-mouse IgG, produzido em coelho, conjugado com HRP, como anticorpo secundário (SIGMA - A9044), na diluição de 1:10.000 sob agitação por 1 h. A revelação foi feita utilizando 3, 3' diaminobenzidine (SIGMA-D8001) e peróxido de hidrogênio.

3.6.2. Teste de precipitação com sulfato de amônio

Uma vez que a purificação em STEPS não foi capaz de remover os contaminantes, utilizamos as alíquotas purificadas nas quais foi observada a marcação da rET-NTPDase2. Imaginamos que, utilizando a amostra parcialmente purificada, seria possível obter a separação da proteína de interesse com mais facilidade.

Sulfato de amônio foi adicionado na quantidade requerida para atingir as porcentagens desejadas 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% e 70%. Os cálculos das quantidades de sulfato de amônio sólido adicionados à solução contendo a proteína foram feitos a partir da plataforma Ammonium Sulfate Calculator (EnCor Biotechnology, Inc.) disponível em: <https://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>.

Sulfato de amônio foi adicionado para obter a concentração de 10%. A amostra permaneceu sob agitação por 30 minutos à 4°C e em seguida foi centrifugada à 18894 g por 15 minutos à 4°C. O pellet resultante foi resuspendido em 300 µL de tampão de lise (50 mM Tris; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol) e armazenado. Uma alíquota do sobrenadante foi armazenada para análise posterior. O volume restante foi medido em uma proveta e depois foi adicionado sulfato de amônio para obter a concentração de 20% e a amostra foi agitada e depois centrifugada nas mesmas condições já descritas. O mesmo foi realizado para as demais concentrações. Para as concentrações de 60% e 70%, o pellet foi resuspendido em 1mL de tampão de lise para melhorar a solubilização.

As amostras foram analisadas por SDS-PAGE, coradas com comassie blue e avaliadas por western blotting utilizando anticorpo monoclonal anti-His tag, produzido em camundongo, como anticorpo primário (SIGMA - H1029), na diluição de 1:5000 sob agitação por 1h e anticorpo policlonal anti-mouse IgG, produzido em coelho, conjugado com HRP, como anticorpo secundário (SIGMA - A9044), na diluição de 1:10.000 sob agitação por 1 h. A

revelação foi feita utilizando 3, 3' diaminobenzidina (SIGMA-D8001) e peróxido de hidrogênio.

3.7. Expressão da NTPDase2 dos isolados ET e NSL e purificação das proteínas a partir dos corpos de inclusão

3.7.1. Teste de solubilização com Ureia

As proteínas foram expressas nas melhores condições para análise de solubilização em diferentes concentrações de ureia. Para cada teste, pellets correspondentes a 100 mL de indução foram ressuspensos em 4 mL de tampão de lise (50 mM Tris; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol) e adicionados os inibidores de protease (Pepstatina A 1 µg/mL, Aprotinina 2 µg/mL, Leupeptina 2 µg/mL) e lisozima 1 mg/ml. A ressuspensão foi mantida à 4 °C por 30 minutos e sonicada à 30 Hz, por 2 minutos, em ciclos de 10 segundos, à 4°C. Tampão de lise foi adicionado no volume final de 10 mL e as amostras foram centrifugadas à 11,627 g por 15 minutos e o sobrenadante descartado. Foram realizadas duas lavagens com tampão de lise, seguidas de centrifugações de 10 minutos. Os pellets contendo os corpos de inclusão foram ressuspensos em condições desnaturantes com 10 mL de tampão Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 500 mM, Imidazol 10 mM contendo 2M, 4M, 6M ou 8M de ureia, aquecidos à 50°C por 20 minutos e centrifugados a 20.000 g por 20 minutos. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE, coradas com comassie blue, e western blotting utilizando anticorpo monoclonal anti-His tag produzido em camundongo como anticorpo primário (SIGMA - H1029), na diluição de 1:5000 sob agitação por 1h e anticorpo policlonal anti-mouse IgG produzido em coelho, conjugado com HRP, como anticorpo secundário (SIGMA - A9044), na diluição de 1:10.000 sob agitação por 1 h. A revelação foi feita utilizando 3, 3' diaminobenzidina (SIGMA-D8001) e peróxido de hidrogênio.

3.7.2. Testes de pré-purificação

Com o objetivo de obter uma amostra de solubilizado mais pura antes da purificação por cromatografia de afinidade, testamos o processamento com diferentes tampões: Tampão 1 (50 mM Tris; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol); Tampão 2 (50 mM Tris; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 2M Ureia); Tampão 3 (50 mM Tris; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 2M Ureia; 10mM β-mercaptoetanol) e Tampão 4 (50 mM Tris; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 10mM β-mercaptoetanol).

A proteína rET-NTPDase2 foi expressa num volume de 400 mL e os pellets obtidos foram processados. Os pellets foram ressuspensos em 16 mL de tampão de lise (50 mM Tris;

300 mM NaCl; 10 mM Imidazol) e adicionados os inibidores de protease (Pepstatina A 1 µg/mL, Aprotinina 2 µg/mL, Leupeptina 2 µg/mL) e lisozima 1 mg/ml. A ressuspensão foi mantida à 4 °C por 30 minutos e sonicada à 30 Hz, por 2 minutos, em ciclos de 10 segundos, à 4°C e centrifugadas à 11,627 g por 15 minutos. Para lavagem, os respectivos tampões foram adicionados no volume final de 20 mL e as amostras foram centrifugadas à 11,627 g por 15 minutos e os sobrenadantes armazenados para análise. Foi realizada uma lavagem adicional, seguida de centrifugação de 10 minutos e os sobrenadantes foram armazenados para análise. Os pellets contendo os corpos de inclusão foram ressuspensos em 30 mL de tampão (Tris 50 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 10 mM; 8M de Ureia; pH 7,5) aquecidos à 50 °C por 20 minutos e centrifugados a 20.000 g por 20 minutos. Os sobrenadantes contendo os corpos de inclusão solubilizados foram filtrados em membrana 0,45 µm e purificados por cromatografia de afinidade ao níquel utilizando a coluna HisTrap FF crude 5 ml. Após a aplicação da amostra foi feita uma lavagem com tampão A (Tris 50 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 10 mM, Ureia 8 M; pH 7,5) por 30 minutos e um passo de lavagem com 10% B por 1 hora e eluídas com 100% B (50 mM Tris; 500 mM NaCl; 350 mM Imidazol; Ureia 8 M; pH 7,5). As alíquotas correspondentes às diferentes frações foram analisadas por SDS-PAGE com coloração com comassie blue.

3.7.3. Testes de purificação

Inicialmente avaliamos se a lavagem com 2M de ureia antes da solubilização dos corpos de inclusão e as lavagens com 10% e 20% de B na purificação de afinidade levariam à lavagem e desligamento precoce das proteínas de interesse, respectivamente.

Um volume correspondente a 1,6 L de indução para rET-NTPDase2 e 800 mL para rNSL-NTPDase2 foram expressos com 0,2 mM de IPTG por 2h ou 4h, respectivamente. Os pellets foram processados da mesma forma descrita anteriormente (3.7.1), contudo, ajustando os volumes de tampão de acordo com os volumes de indução utilizados. Após a lise, os pellets foram lavados em tampão Tris 50 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 10 mM, pH 7,5, contendo 2M de ureia e foram centrifugados à 11,627 g por 15 minutos e o sobrenadante armazenado para análise. A solubilização dos corpos de inclusão foi realizada em tampão Tris 50 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 10 mM, Ureia 8M, pH 7,5, aquecidos à 50 °C por 20 minutos e centrifugados a 20.000 g por 20 minutos. Os corpos de inclusão solubilizados foram filtrados em membrana 0,45 µm e purificados por cromatografia de afinidade à níquel utilizando o sistema Akta purifier FPLC (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ) e os tampões A (Tris 50 mM, NaCl 500

mM, Imidazol 10 mM, Ureia 8 M; pH 7,5) e B (50 mM Tris; 500 mM NaCl; 350 mM Imidazol; Ureia 8 M; pH 7,5).

Para rET-NTPDase2 foi utilizada a coluna HisTrap FF crude 20 mL e após a aplicação da amostra foi feita lavagem com tampão A por 30 minutos, lavagem com 10%B por 1h e 15 minutos e 20%B por 40 minutos, seguida de eluição com 100%B. Para rNSL-NTPDase2 foi utilizada a coluna de 1 mL e após aplicação a amostra foi lavada com tampão A por 30 minutos, seguido da lavagem com 10%B por 30 minutos e eluída com 100%B. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE, coradas com comassie blue, e western blotting utilizando anticorpo monoclonal anti-His tag, produzido em camundongo, como anticorpo primário (SIGMA - H1029), na diluição de 1:7000 sob agitação por 1h e anticorpo policlonal anti-mouse IgG produzido em coelho, conjugado com HRP, como anticorpo secundário (SIGMA - A9044), na diluição de 1:10.000 sob agitação por 1 h. A revelação foi feita utilizando 3, 3' diaminobenzidine (SIGMA-D8001) e peróxido de hidrogênio.

3.7.4. Purificação da rETNTPdase2 na coluna HisTrap FF crude 5mL

Inicialmente um volume de 1,6 L de indução foi processado como já descrito para obtenção dos corpos de inclusão solubilizados. A purificação foi feita por cromatografia de afinidade ao níquel, utilizando a coluna HisTrap FF crude de 5 mL. Após a aplicação da amostra, foi feita lavagem com tampão A (Tris 50 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 10 mM, Ureia 8 M; pH 7,5) por 30 minutos, seguido de lavagem 10% B por 1 hora e eluição com 100% B (50 mM Tris; 500 mM NaCl; 350 mM Imidazol; Ureia 8 M; pH 7,5).

Para o segundo teste, objetivamos eliminar os contaminantes eluídos junto com a proteína no teste anterior. Assim, reduzimos o volume de amostra aplicada, que agora foi correspondente a um volume de 800 mL de indução. Os corpos de inclusão solubilizados foram purificados utilizando a coluna HisTrap FF crude de 5 mL. Após a aplicação de metade do volume de amostra, foi feita lavagem com tampão A (até UV=0 ou 20 a 30 minutos), seguida de lavagem com 10% B por 20 minutos. Posteriormente foi aplicado o volume restante de amostra, seguido de lavagem com tampão A (até UV=0 ou 20 a 30 minutos) e lavagem com 10% B por 20 minutos. Um passo adicional de lavagem 20% B por 20 minutos foi realizado e a proteína foi eluída com 100%B.

A pureza das amostras foi analisada por SDS-PAGE corado com coomassie e confirmadas por western blotting, como descrito por Sambrook e Russel (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). O western foi feito usando anticorpo monoclonal anti-His tag, produzido em camundongo, como anticorpo primário (SIGMA - H1029), na diluição de 1:5000 sob agitação

por 1h e anticorpo policlonal anti-mouse IgG conjugado com HRP, produzido em coelho, como anticorpo secundário (SIGMA - A9044), na diluição de 1:10.000 sob agitação por 1 h. A revelação foi feita utilizando 3, 3' diaminobenzidina (SIGMA-D8001) e peróxido de hidrogênio.

3.8. Renaturação

Para os testes de renaturação as amostras foram diluídas 20 vezes em diferentes tampões: tampão 1 (50 mM de Tris, 50 mM de HEPES, 2,7 mM de MgCl₂, 2 mM de CaCl₂, 116 mM de NaCl, 5,4 mM de KCl e 2,5 mM), tampão 2 (50 mM de Tris e 116 mM de NaCl) e tampão 3 (50 mM de Tris e 116 mM de NaCl, 1mM GSSG e 2 mM GSH) e armazenadas à 4°C por 5 dias.

O último tampão testado foi constituído de 100 mM Tris, 600 mM de NaCl, 1mM de GSSG, 2 mM de GSH, 33% de glicerol, como descrito para rLicNTPDase2 (VASCONCELLOS et al., 2014). Após diluição 20 vezes as amostras foram armazenadas à 4°C e a atividade foi avaliada após 48 horas.

Atividade ADPásica foi avaliada pelo método do verde malaquita (EKMAN, PIA; JAGER, 1993) usando 2.5 mM de substrato e tampão (Tris 50 mM, HEPES 50 mM, MgCl₂ 2.7 mM, CaCl₂ 2 mM, NaCl 116 mM e KCl 5.4 mM) pH 7.5, adaptado a partir da literatura (BARROS et al., 2000), em 10 minutos de reação. Todas as reações foram pré-aquecidas à 37°C por 3 minutos, disparadas com 1µg de proteína e paradas pela adição de 0,2 M de HCl, seguida pela adição de reagente colorimétrico (1:3 v/v de verde malaquita 0.2 % e molibdato de amônio 10 %, diluídos previamente em HCL 4 M). As absorbâncias foram mensuradas à 660 nm e convertidas para nmol de fosfato usando uma curva padrão de Na₃PO₄.

3.9. Atividade enzimática

Os testes referentes à caracterização bioquímica da enzima rET-NTPDase2 estão descritos no capítulo 2 desta tese. Aqui descreveremos a metodologia utilizada para os resultados preliminares para o teste de temperatura e substrato para a enzima rNSL-NTPDase2 e a para comparação adicionamos os resultados dos mesmos testes obtidos para rET-NTPDase2 que estão descritos no capítulo 2.

As enzimas foram renaturadas como descrito na seção anterior (Tópico 3.8) e atividade de hidrólise foi avaliada após 48 horas pelo método do verde malaquita (EKMAN, PIA; JAGER, 1993).

Para a determinação do efeito da temperatura o meio reacional foi composto por tampão de atividade (Tris 50 mM, HEPES 50 mM, MgCl₂ 2.7 mM, CaCl₂ 2 mM, NaCl 116 mM e KCl 5.4 mM) (BARROS et al., 2000) e 2.5 mM de ADP como substrato. As temperaturas testadas foram 30, 34 e 37 °C e para todas, o tempo de reação e pH foram fixados à 10 minutos e 7.5, respectivamente. O teste para hidrólise de diferentes substratos foi realizado utilizando tampão de atividade contendo apenas magnésio como cofator, em pH 7,5 à 37 °C por 10 minutos. Para o teste de substrato 2.5mM de ATP, ADP, GDP, UTP ou UDP foi utilizado. Todas as reações foram pré-aquecidas à 37°C por 3 minutos, disparadas com 1µg de proteína e paradas pela adição de 0,2 M de HCl, seguida pela adição de reagente colorimétrico (1:3 v/v de verde malaquita 0.2 % e molibdato de amônio 10 %, diluídos previamente em HCL 4 M). As absorbâncias foram mensuradas à 660 nm e convertidas para nmol de fosfato usando uma curva padrão de Na₃PO₄.

4. RESULTADOS

4.1.Predição de região transmembrana e peptídeo sinal

A determinação de peptídeo sinal e domínio transmembrana são passos importantes para guiar a escolha da estratégia de expressão. Assim, utilizamos a sequência da LbNTPDase2 referência (LbrM.15.0030) para avaliar estes parâmetros.

A predição de peptídeo sinal realizada na plataforma SignalP 5.0, indica uma alta probabilidade de que a sequência não possua peptídeo sinal, representado nos resultados como “Other” (Figura 5).

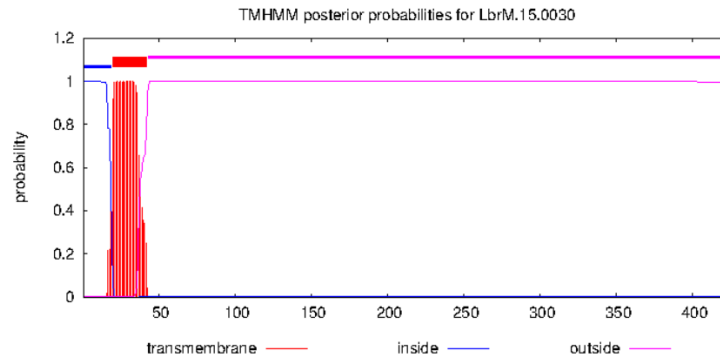
TMHMM - 2.0

Prediction of transmembrane helices in proteins

Submission Guide Downloads

TMHMM result

```
# LbrM.15.0030 Length: 425
# LbrM.15.0030 Number of predicted TMHs: 1
# LbrM.15.0030 Exp number of AAs in TMHs: 20.47905
# LbrM.15.0030 Exp number, first 60 AAs: 20.38776
# LbrM.15.0030 Total prob of N-in: 0.99925
# LbrM.15.0030 POSSIBLE N-term signal sequence
LbrM.15.0030 TMH#0/2.0 inside 1 19
LbrM.15.0030 TMH#0/2.0 TMhelix 20 42
LbrM.15.0030 TMH#0/2.0 outside 43 425
```



[plot](#) in postscript, [script](#) for making the plot in gnuplot, [data](#) for plot

Figura 6: Predição de domínio transmembrana para LbNTPDase2 no THMM. Os resultados mostram uma alta probabilidade de formação de região transmembrana dos resíduos 20 ao 42 (em vermelho).

Juntos, esses resultados indicam que a proteína possui uma região transmembrana N-terminal e uma baixa probabilidade de ser secretada.

A superexpressão de proteínas transmembrana em *E. coli* apresenta dificuldades, pois leva a formação de agregados insolúveis no citoplasma (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018). Assim, optamos por remover a porção transmembrana da sequência e expressar apenas o ectodomínio utilizando o sistema pET, como já descrito para a rLicNTPDase2 (VASCONCELLOS et al., 2014).

4.2. Otimização de códons, desenho das construções e obtenção das sínteses

As porções que codificam para o ectodomínio (S43-425E) da NTPDase2 dos isolados ET e NSL foram otimizadas utilizando a ferramenta Codon Optimization na plataforma Integrated DNA Technologies. As sequências otimizadas (Anexos A e B) foram importadas em modelo FASTA para o programa Geneious 6.0.6 para análise de restrição, clonagem e análise de frame. A análise de restrição avalia a presença de sítios de restrição internos na sequência de interesse e permite determinar a escolha do par de enzimas que irão flanquear a sequência após a ligação no vetor. Para nossa análise, escolhemos previamente as enzimas *Nde* I e *Hind* III. Como mostram as figuras 7 e 8, não foram reconhecidos sítios de restrição internos para

essas duas enzimas, apenas os adicionados manualmente nas extremidades da sequência de interesse para indicar o posicionamento para a construção no vetor pET28a.



Figura 7: Análise de restrição para a sequência otimizada da NTPDase2 do isolado ET. A figura mostra que não há sítios de restrição internos para as enzimas escolhidas, que aparecem em destaque apenas no início (Nde I) e final da sequência (Hind III) após adição manual.



Figura 8: Análise de restrição para a sequência otimizada da NTPDase2 do isolado NSL. A figura mostra que não há sítios de restrição internos para as enzimas escolhidas, que aparecem em destaque apenas no início (Nde I) e final da sequência (Hind III) após adição manual.

O vetor pET28a possui região policlonal que tem os sítios de restrição para diversas enzimas, dentre elas *Nde* I e *Hind* III. As construções neste vetor adicionam uma Hexa-His tag na região N-terminal das proteínas recombinantes e também possibilita a adição de uma cauda C-terminal, se houver a remoção do stop códon da sequência a ser clonada. Para nossa construção, mantivemos o stop códon para a produção de enzimas contendo Hexa-His tag apenas na região N-terminal.

O próximo passo consistiu na clonagem no programa Geneious, com o objetivo de avaliar o frame e obter as sequências de aminoácidos das enzimas recombinantes. A figura 9 mostra as construções ET-pET28a e NSL-pET28a obtidas após a clonagem no programa Geneious. As figuras 10 e 11 mostram em detalhes as regiões de início e término das construções.

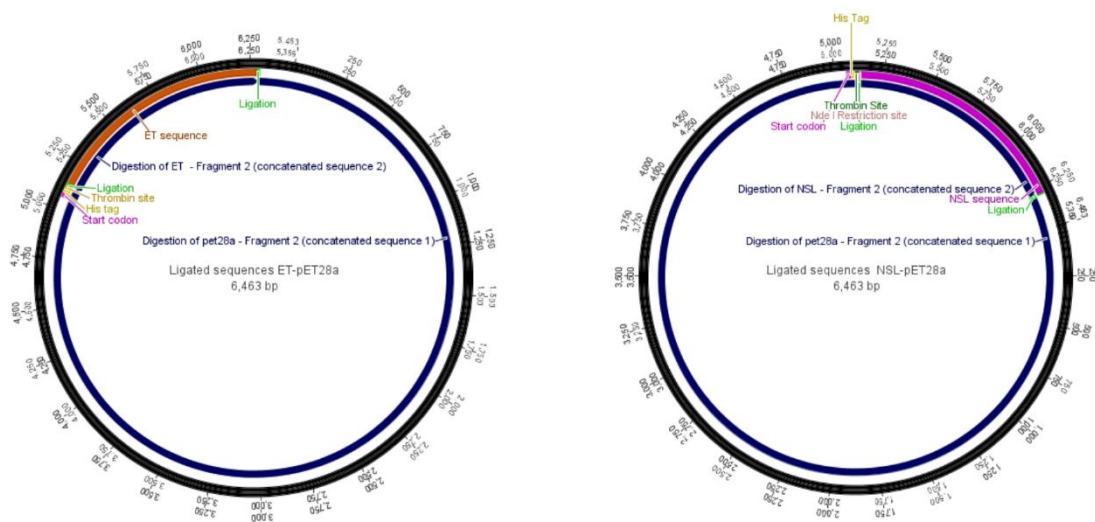


Figura 9: Clonagem realizada no programa Geneious 6.0.6. Construções obtidas para ET-pET28a (à direita) e NSL-pET28a (à esquerda) mostrando as anotações de regiões importantes nas sequências.

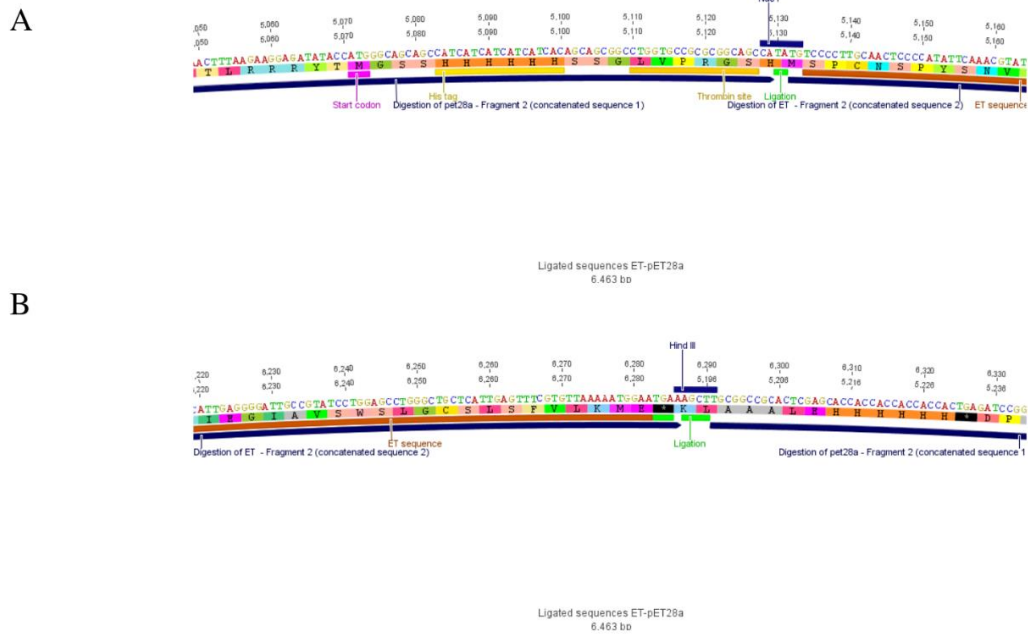


Figura 10: Clonagem da sequência da NTPDase2 do isolado ET no programa Geneious 6.0.6. Detalhes das regiões de ligação da sequência de interesse no vetor pET28a, mostrando o start códon, Hexa-His tag, sítio de trombina, sítio de Nde I, seguido pela sequência da NTPDase2 do isolado ET (A) e o stop códon (TGA) representado com um asterisco (*) na sequência, seguido pelo sítio de restrição de Hind III (B).

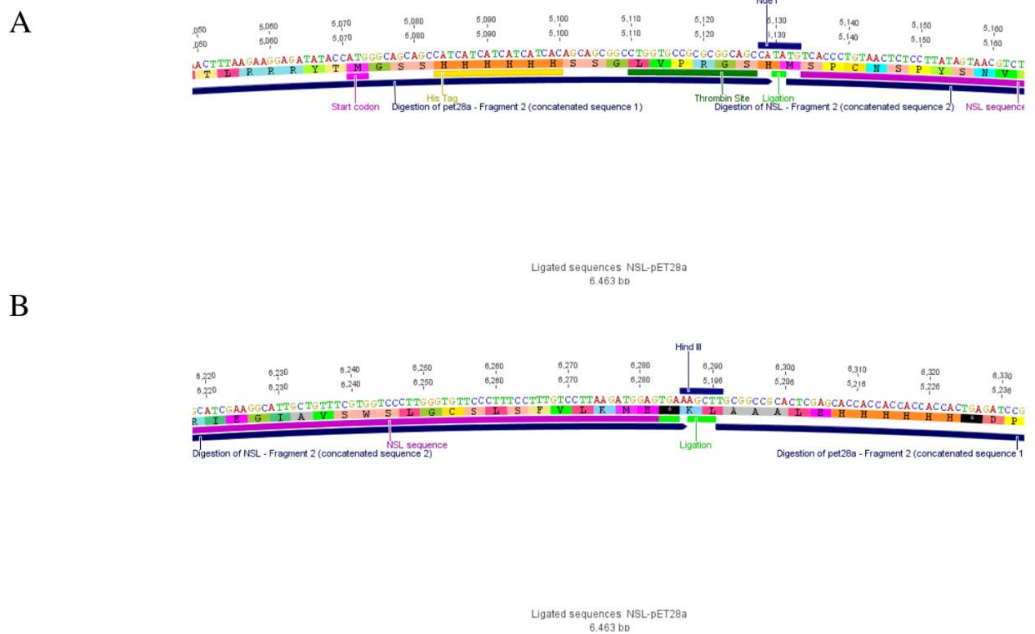


Figura 11: Clonagem da sequência da NTPDase2 do isolado NSL no programa Geneious 6.0.6. Detalhes das regiões de ligação da sequência de interesse no vetor pET28a, mostrando o start códon, Hexa-His tag, sítio de trombina, sítio de Nde I, seguido pela sequência da NTPDase2 do isolado NSL (A) e o stop códon (TGA) representado com um asterisco (*) na sequência, seguido pelo sítio de restrição de Hind III (B).

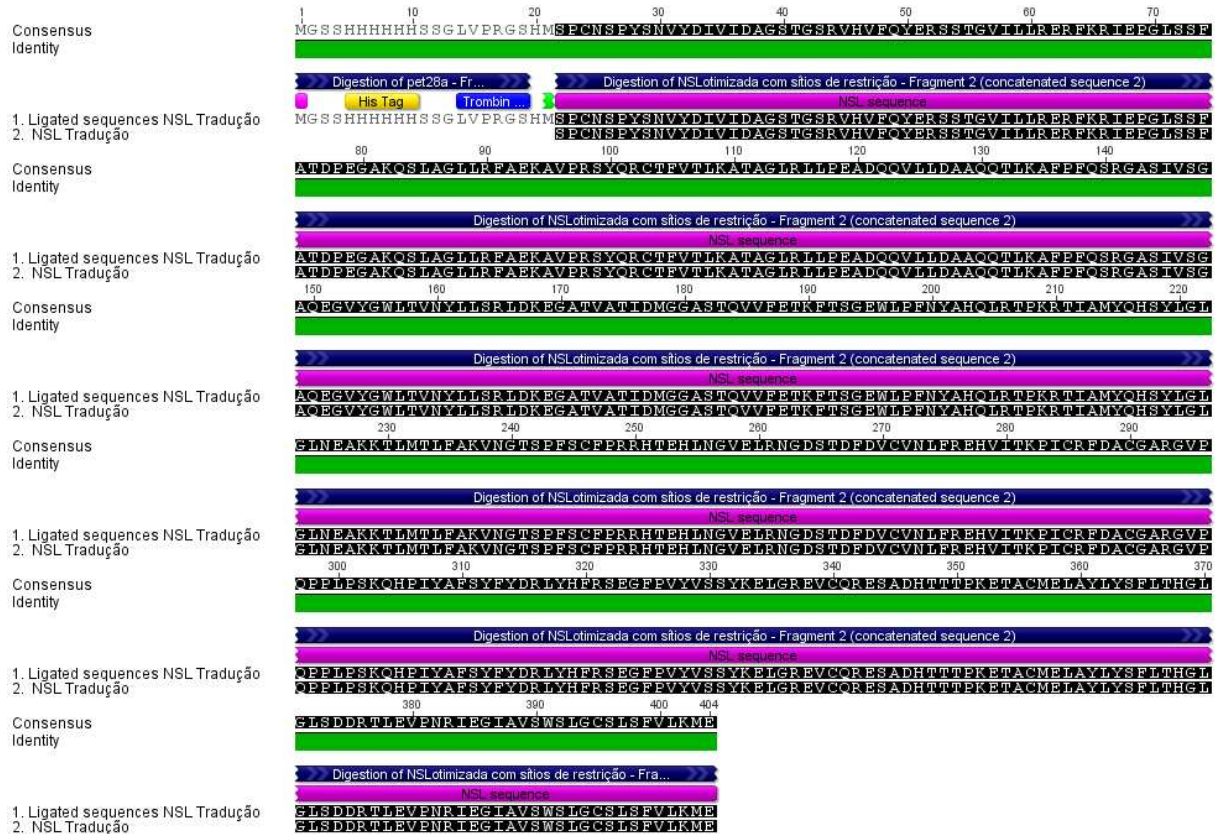


Figura 13: Tradução e alinhamento da LbNTPDase2 e da rLbNTPDase2 do isolado NSL. Após a clonagem a sequência da proteína recombinante foi traduzida e alinhada com a sequência original da enzima do isolado NSL. A figura mostra a identidade das sequências, representada pelos aminoácidos em mesma cor (preto), exceto pela região do vetor traduzida, que adiciona um peptídeo N-terminal, contendo a Hexa-His tag.

As sequências foram obtidas comercialmente e o sequenciamento foi alinhado com a sequência referência (LbrM.15.0030) para confirmação da sequência de aminoácidos (ANEXO C) e com as sequências otimizadas para confirmar a sequência de nucleotídeos, local de inserção e frame (ANEXOS D e E).

4.3. Alinhamento múltiplo das NTPDases recombinantes com NTPDases de tripanossomatídeos e mamíferos

As sequências das enzimas recombinantes foram alinhadas com sequências de NTPDases de tripanossomatídeos e mamíferos (Anexo F).

O alinhamento (Figura 14) evidencia que as enzimas dos isolados ET e NSL possuem as 5 regiões conservadas de apirase (ACRs), presentes em outras NTPDases. A enzima rET-NTPDase possui sequência idêntica à sequência referência (LbrM.15.0030) enquanto rNSL-NTPDase-2 possui 4 mutações que não estão presentes dentro de ACRs. As mutações Q99P e

S126F estão entre ACR1 e ACR2, a mutação N185S está entre ACR3 e ACR4 e a mutação T376A entre ACR4 e ACR5.

```

HsNTPDase1  IVLDAGSSHT-----ATAGMRLI--GQEEGAYGWITIN-----GALDLGGASTC-----WTLGYML
HsNTPDase2  IVLDAGSSHT-----ATAGMRLI--GQEEGVFGWVTAN-----GAMDLGGASTC-----WALGYML
HsNTPDase3  IVLDAGSSRT-----ATAGMRLI--GQEEGVYGWITAN-----GALDLGGASTC-----WSLGYML
HsNTPDase4  IVVDCGSSGS-----CTAGMRLI--GKQEGVYAWIGIN-----GILDMGGVSTC-----WTLGAIL
HsNTPDase5  IMFVAGSTGT-----ATAGLRLI--GSDEGILAWVTVN-----GTLDLGGASTC-----WALGATF
HsNTPDase6  IMFVAGSTGT-----ATAGLRLI--GTDEGVSAWITIN-----GMLDLGGGASTC-----WALGATF
HsNTPDase7  LVVDCGSSGS-----CTAGMRLI--GKQEGVYAWIGIN-----GILDMGGASTC-----WTLGAIL
HsNTPDase8  IVVDCGSSHT-----ATAGMRLI--GQEGAFGWITVN-----GALDMGGASTC-----WTLGYML
RnNTPDase2  IVLDAGSSHT-----ATAGMRPF--GQDEGVFGWVTAN-----GAMDLGGASTC-----WALGYML
TcNTPDase   IVVDCGSTGS-----ATAGLRLI--GWEEGPLAWLTVN-----TILDLGGGASTC-----WALGASL
LbNTPDase2  IVIDAGSTGS--Q--S--ATAGLRLI--GAQEGVYGWLTVN--N--ATIDMGGASTC--T--WSLGCSSL
rET-NTPDase2 IVIDAGSTGS--Q--S--ATAGLRLI--GAQEGVYGWLTVN--N--ATIDMGGASTC--T--WSLGCSSL
rNSL-NTPDase2 IVIDAGSTGS--P--F--ATAGLRLI--GAQEGVYGWLTVN--S--ATIDMGGASTC--A--WSLGCSSL
LmNTPDase2  VVIDAGSTGS-----ATAGLRLI--GAQEGVYGWLTVN-----ATIDMGGASTC-----WSLGSLL
LaeNTPDase2 VVIDAGSTGS-----ATAGLRLI--GAQEGVYGWLTVN-----ATIDMGGASTC-----WCLGSLL
LaNTPDase2  IVIDAGSTGS-----ATAGLRLI--GAQEGVYGWLTVN-----ATIDMGGASTC-----WSLGSLL
LtNTPDase2  VVIDAGSTGS-----ATAGLRLI--GAQEGVYGWLTVN-----ATIDMGGASTC-----WSLGSLL
LiNTPDase2  VVIDAGSTGS-----ATAGLRLI--GAQEGVYGWLTVN-----ATIDMGGASTC-----WSLGSLL
LmxNTPDase2 IVIDAGSTGS-----ATAGLRLI--GAQEGVYGWLTVN-----ATIDMGGASTC-----WSLGSLL
LpNTPDase2  IVIDAGSTGS-----ATAGLRLI--GAQEGVYGWLTVN-----ATIDMGGASTC-----WSLGCSSL
LdNTPDase2  VVIDAGSTGS-----ATAGLRLI--GAQEGVYGWLTVN-----ATIDMGGASTC-----WSLGSLL

```

Figura 14: Detalhe parcial do alinhamento das seqüências das enzimas recombinantes com NTPDases de tripanossomatídeos e de mamíferos evidenciando as ACRs e os aminoácidos referentes às mutações. O alinhamento foi feito no Clustal W no programa MEGA-X. As seqüências foram editadas no programa Bioedit 7.2.5 para evidenciar as ACRs (blocos sequenciais 1-5). As mutações em rNSL-NTPDase2 são mostradas em comparação aos aminoácidos presentes na rET-NTPDase2 e na seqüência da NTPDase2 referência (LbrM.15.0030).

Interessantemente, a mutação Q99P de NSL-NTPDase2 se localiza dentro do Domínio B (Figura 15). O domínio B (R82-Y121) é um domínio antigênico conservado, que não inclui as seqüências das ACRs, presente na NTPDase2 de *L. braziliensis* e compartilhado com NTPDases de plantas e organismos patogênicos (PORCINO et al., 2012). Isso pode apontar para alguma possível diferença de antigenicidade entre as duas enzimas, contudo isso ainda necessita de investigações.

```

LbNTPDase2  RERFKRIEPLGSSFATDQEGAKQSLAGLLRFAEKAVPRSY
rET-NTPDase2 RERFKRIEPLGSSFATDQEGAKQSLAGLLRFAEKAVPRSY
rNSL-NTPDase2 RERFKRIEPLGSSFATDPEGAKQSLAGLLRFAEKAVPRSY

```

*

Figura 15: Alinhamento do domínio B (R82-Y121) da NTPDase2 referência e das enzimas recombinantes. Após alinhamento das seqüências no programa Clustal W as seqüências foram editadas no programa Bioedit 7.2.5 para evidenciar a região do domínio B.

4.4. Predição de ponto isoelétrico e massa molecular

As seqüências das enzimas recombinantes foram submetidas a análise de ponto isoelétrico e massa molecular na plataforma ExPASy. Os resultados mostram que o tamanho

predito para rET-NTPDase2 foi 45.063 Da e para rNSL-NTPDase2 foi 45.035 Da e ambas com ponto isoelétrico em 8.48 (Figuras 16 e 17).

Compute pI/Mw

Theoretical pI/Mw (average) for the user-entered sequence:

```

      10      20      30      40      50      60
MGSSHHHHHH SSSLVPRGSH MSPCNSPYSN VYDIVIDAGS TGSRVHVFQY ERSSTGVILL

      70      80      90      100     110     120
RERFKRIEPG LSSFATDQEG AKQSLAGLLR FAEKAVPRSY QRCTSVTLKA TAGLRLLEPA

     130     140     150     160     170     180
DQQVLLDAAQ QTLKAFPFQS RGASIVSGAQ EGVYGWLTVN YLLNRLDKEG ATVATIDMGG

     190     200     210     220     230     240
ASTQVVFETK FTSGEWLPFN YAHQLRTPKR TIAMYQHSYL GLGLNEAKKT LMTLFAKVNG

     250     260     270     280     290     300
TSPFSCFPRR HTEHLNGVEL RNGDSTDFDV CVNLFREHVI TKPICRFDAC GARGVPQPPL

     310     320     330     340     350     360
PSKQHPYAF SYFYDRLYHF RSEGFPVYVS SYKELGREVC QRESADHTTT PKETTCMELA

     370     380     390     400
YLYSFLTHGL GLSDDRTLEV PNRIEGIAVS WSLGCSLSFV LKME

```

Theoretical pI/Mw: 8.48 / 45063.08

Figura 16: Predição de ponto isoelétrico e massa molecular para rET-NTPDase2 na plataforma ExPASy.

Compute pI/Mw

Theoretical pI/Mw (average) for the user-entered sequence:

```

      10      20      30      40      50      60
MGSSHHHHHH SSSLVPRGSH MSPCNSPYSN VYDIVIDAGS TGSRVHVFQY ERSSTGVILL

      70      80      90      100     110     120
RERFKRIEPG LSSFATDPEG AKQSLAGLLR FAEKAVPRSY QRCTFVTLKA TAGLRLLEPA

     130     140     150     160     170     180
DQQVLLDAAQ QTLKAFPFQS RGASIVSGAQ EGVYGWLTVN YLLSRLDKEG ATVATIDMGG

     190     200     210     220     230     240
ASTQVVFETK FTSGEWLPFN YAHQLRTPKR TIAMYQHSYL GLGLNEAKKT LMTLFAKVNG

     250     260     270     280     290     300
TSPFSCFPRR HTEHLNGVEL RNGDSTDFDV CVNLFREHVI TKPICRFDAC GARGVPQPPL

     310     320     330     340     350     360
PSKQHPYAF SYFYDRLYHF RSEGFPVYVS SYKELGREVC QRESADHTTT PKETACMELA

     370     380     390     400
YLYSFLTHGL GLSDDRTLEV PNRIEGIAVS WSLGCSLSFV LKME

```

Theoretical pI/Mw: 8.48 / 45035.12

Figura 17: Predição de ponto isoelétrico e massa molecular para rNSL-NTPDase2 na plataforma ExPASy.

4.5. Avaliação das melhores condições de expressão

As construções obtidas foram transformadas em células de *E. coli* BL21(DE3) RIL para expressão das proteínas recombinantes.

Nossos resultados mostram que as enzimas foram expressas em todos os tempos testados (Figura 18A e B), porém não foi observada marcação para tempo de 24 h para rET-NTPDase2 (Figura 18A). A enzima rET-NTPDase2 apresentou expressão semelhante nos tempos de 2 h e 4h de indução, contudo o tempo de 3 h ficou inconclusivo (Figura 18A). Assim repetimos o teste com o dobro de proteína total (40 µg) e este teste indicou a expressão da proteína também em 24 h e confirmou o tempo de 2 h como melhor tempo para continuação dos experimentos com esta enzima (Figura 18C). Diferentemente, rNSL-NTPDase2 apresentou expressão maior no tempo de 4 h de indução, que foi escolhido para continuação dos experimentos (Figura 18B).

Com o objetivo de verificar se os fragmentos presentes nas amostras poderiam ser resultado de alta expressão, avaliamos a expressão das enzimas em concentrações menores de IPTG (Figura 18D). Não observamos diminuição da presença dos fragmentos com a redução da concentração de indutor e, portanto, escolhemos a concentração de 0,2 mM de IPTG para prosseguir com os experimentos.

Em seguida as enzimas foram avaliadas quanto à presença na fração solúvel ou corpos de inclusão. As frações foram purificadas por cromatografia de afinidade por níquel e analisadas por SDS-PAGE e western blotting. Os resultados mostram que as proteínas estão presentes nas duas frações (Figuras 18E). As proteínas da fração solúvel, apesar de apresentarem marcação intensa no western blotting, apresentam bandas fracas no gel de poliacrilamida, juntamente com muitos contaminantes, mesmo após a cromatografia de afinidade (Figura 18E).

Foi possível observar que as proteínas apresentam padrões de bandas distintos após a purificação dos corpos de inclusão (Figura 18E). Ambas apresentam a banda mais forte de tamanho predito de 45 KDa, contudo rNSL-NTPDase2 apresenta outras duas bandas de forte intensidade entre 25 KDa e 37 KDa e entre 20 KDa e 15 KDa no western blotting, enquanto rET-NTPDase-2 apresenta um padrão mais contínuo de fragmentos de tamanhos menores.

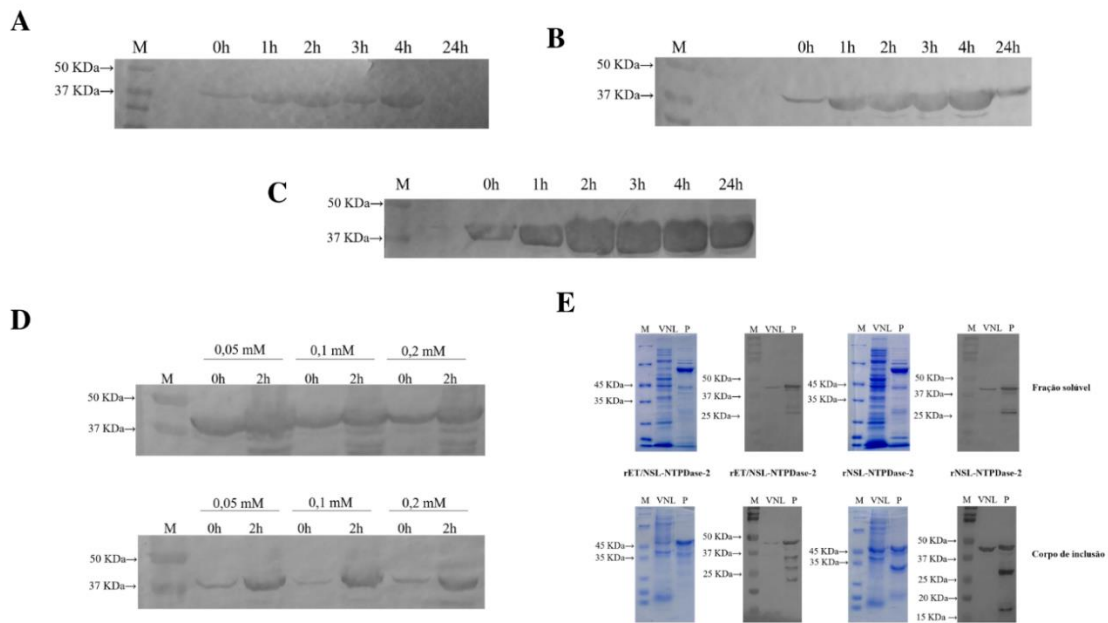


Figura 18: Expressão e purificação da NTPDase2 recombinante dos isolados ET e NSL. (A) Teste do tempo de expressão para rET-NTPDase2, induzida com 0,6 mM de IPTG (B) Teste do tempo de expressão para rNSL-NTPDase2, induzida com 0,6 mM de IPTG (C) Repetição do teste do tempo de expressão para rET-NTPDase2, induzida com 0,6 mM de IPTG (D) Teste de concentração de IPTG; rET-NTPDase2 acima e rNSL-NTPDase2 abaixo (E) Teste de purificação para avaliação das proteínas na fração solúvel e corpo de inclusão, mostrando rET-NTPDase2 à esquerda e rNSL-NTPDase2 à direita. SDS-PAGE foi feito em gel de poliacrilamida 10% com coloração por comassie blue. Western blotting com anticorpo monoclonal anti-polyHistidine na diluição 1:1000 e anticorpo policlonal anti-mouse IgG, acoplado à peroxidase na diluição de 1:10.000. M: Marcador Precision Plus Protein Standards Dual Color BIO-RAD (1610374) ou Unstained Protein Molecular Weight Marker (26610) Thermo Scientific.

4.6. Teste de purificação da NTPDase2 de ET a partir da fração solúvel

Uma vez que a ideia inicial do projeto consistia na avaliação comparativa da atividade enzimática entre as variantes, era importante que ambas enzimas fossem obtidas a partir da mesma fração e purificadas da mesma forma, a fim de evitar que as diferentes condições de dobramento e purificação influenciassem nos resultados obtidos. Assim, iniciamos os testes com a NTPDase2 de ET e não conseguimos resultados satisfatórios. Os tópicos abaixo mostram os resultados obtidos.

4.6.1. Purificação da rET-NTPDase2 por cromatografia de afinidade e eluição em steps

Como observamos que a proteína é expressa na fração solúvel e se liga na coluna, inicialmente tentamos a purificação por cromatografia de afinidade, imaginando que a adição de diferentes concentrações de tampão B fosse capaz de eliminar os contaminantes. Contudo,

o que observamos foi a diluição da proteína de interesse que saiu em diferentes frações na presença persistente de contaminantes. A figura 19 mostra os géis de algumas frações obtidas na purificação. No SDS-PAGE observamos a presença de uma banda na altura esperada, que é eluída a partir da alíquota 24 até a alíquota 50 (20% e 80% B) (Figuras 19 e 20). Contudo em todas as frações em que a proteína de interesse foi eluída havia a presença de contaminantes.

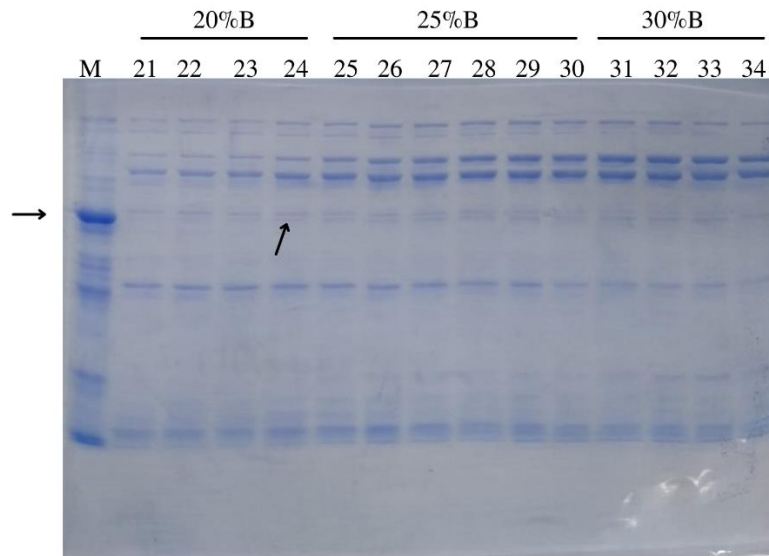


Figura 19: SDS-PAGE da purificação em steps da rET-NTPDase2 a partir da fração solúvel. Avaliação das alíquotas 21 a 34 em gel de poliacrilamida 10% e coloração com comassie blue. As setas indicam a altura esperada e o aparecimento de uma banda na altura de interesse a partir da alíquota 24.

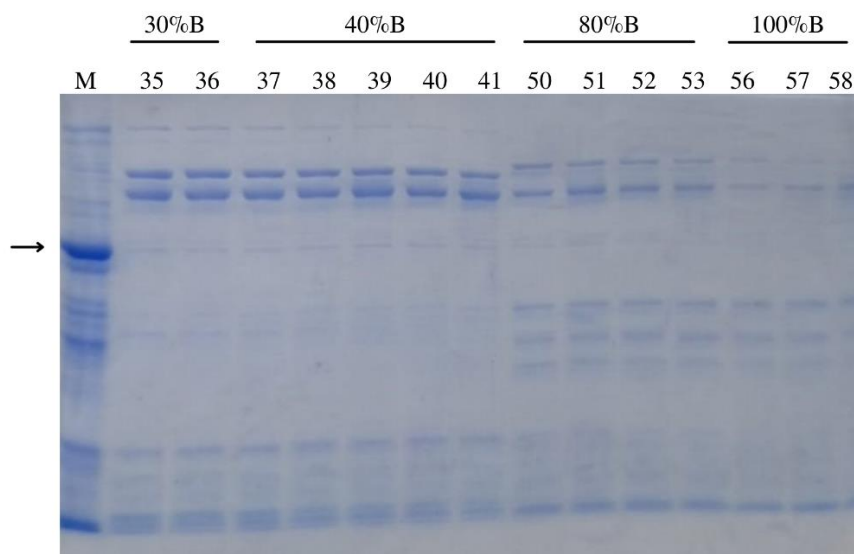


Figura 20: SDS-PAGE da purificação em steps da rET-NTPDase2 a partir da fração solúvel. Avaliação das alíquotas 35 a 41, 50 a 53, 56 a 58 em gel de poliacrilamida 10% e coloração com comassie blue. M: S: amostra de solubilizado de rET-NTPDase2 eluído a partir da coluna de níquel apenas com 100% B.

Para confirmar que as bandas observadas no gel correspondem à proteína recombinante, selecionamos amostras do início da purificação, intermediárias e finais para análise por SDS-PAGE e western blotting (Figuras 21 e 22).

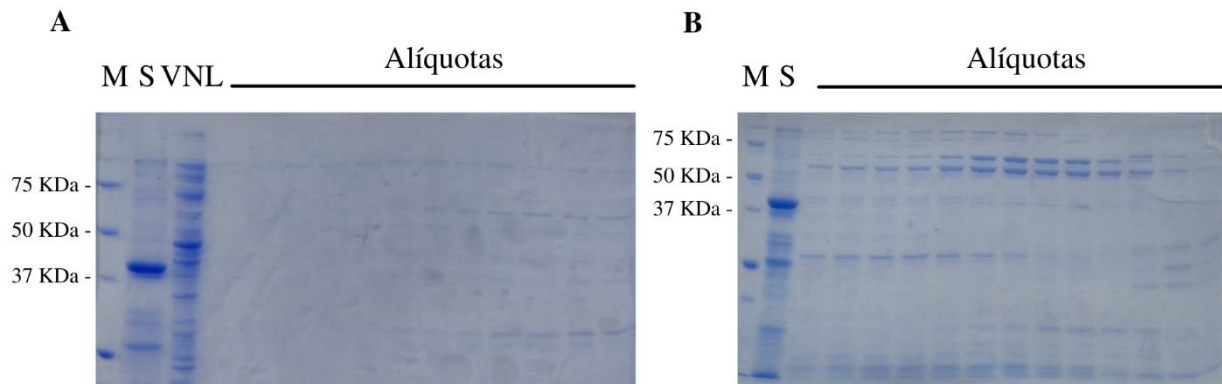


Figura 21: SDS-PAGE da purificação em steps da rET-NTPDase2 a partir da fração solúvel. SDS-PAGE e coloração com comassie blue. **(A)** alíquotas: 7 a 12 (10%B) e 13 a 18 (15%B). **(B)** alíquotas: 19 a 22 (20%B), 25 (25%B) 30 (25%B), 31 e 36 (30%B), 37 e 42 (40%B), 48 (60%B), 54 (80%B), 60 (100%B). M: Marcador Precision Plus Protein Standards Unstained BIO-RAD (1610363); S: amostra de solubilizado de rET-NTPDase2 eluído a partir da coluna de níquel apenas com 100% B; VNL: volume não ligado.

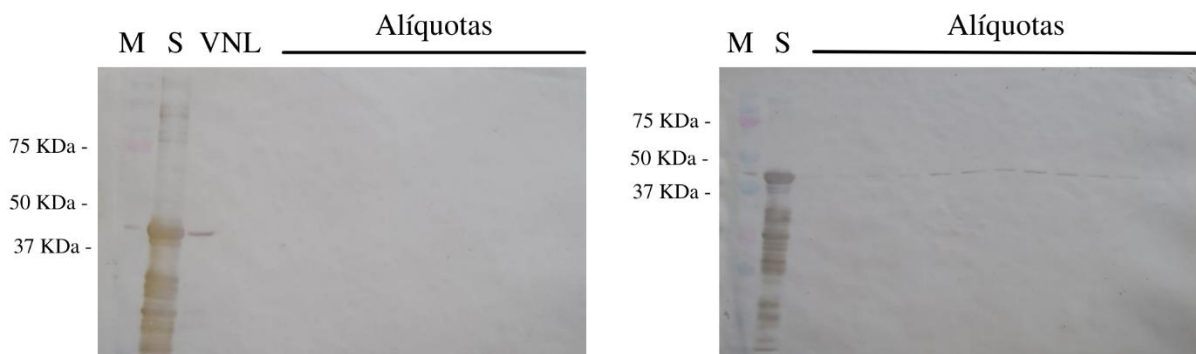


Figura 22: Western blotting da purificação em steps da rET-NTPDase2 a partir da fração solúvel. Anti-His tag foi utilizado como anticorpo primário (SIGMA - H1029), na diluição de 1:7000 e anti-mouse conjugado com HRP, como anticorpo secundário (SIGMA - A9044), na diluição de 1:10.000. A revelação foi feita utilizando 3, 3' diaminobenzidine (SIGMA-D8001) e peróxido de hidrogênio. **(A)** alíquotas: 7 a 12 (10%B) e 13 a 18 (15%B). **(B)** alíquotas: 19 a 22 (20%B), 25 (25%B) 30 (25%B), 31 e 36 (30%B), 37 e 42 (40%B), 48 (60%B), 54 (80%B), 60 (100%B). M: Marcador Precision Plus Protein Standands Dual Color BIO-RAD (1610374); S: amostra de solubilizado de rET-NTPDase2 eluído a partir da coluna de níquel apenas com 100% B; VNL: volume não ligado.

Os resultados confirmam que a proteína recombinante está presente nas amostras, não elui nas concentrações de 10 e 15% B e começa a eluir da coluna e a aparecer fracamente no western blotting a partir da concentração 20%B.

A marcação no volume não ligado indica que parte da proteína não se ligou à coluna e pode indicar dificuldade de exposição da cauda de histidina quando a proteína está na conformação nativa.

4.6.2. Teste de precipitação com sulfato de amônio

Como não conseguimos obter a proteína pura por meio da cromatografia de afinidade, avaliamos a possibilidade de obtenção a partir da precipitação com sulfato de amônio.

Esperávamos que a proteína pudesse permanecer no sobrenadante com a menor quantidade de contaminantes possível. Contudo, nossos resultados mostram que não foi possível obter a proteína pura em uma concentração de sulfato de amônio específica (Figura 23). O SDS-PAGE mostra a persistência de contaminantes de massa molecular maior em todas as frações e em maior concentração do que a proteína de interesse (Figura 23A). Bandas no western blotting mostram que ela está presente em pequena quantidade e com precipitação em todas as concentrações testadas (Figura 23B).

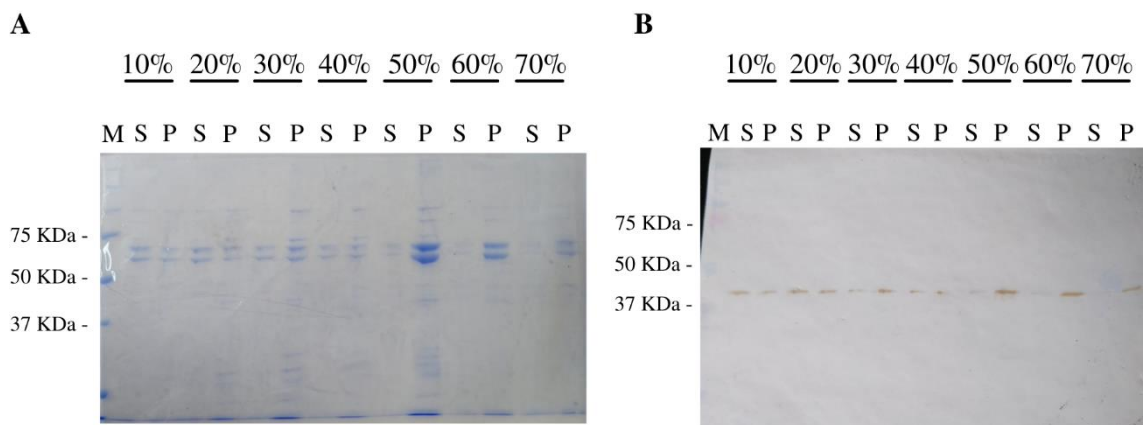


Figura 23: Precipitação da rETNTPDase2 a partir da fração solúvel parcialmente purificada. (A) SDS-PAGE corado com comassie blue (B) western blotting utilizando anticorpo monoclonal anti-His tag como anticorpo primário e anticorpo policlonal anti-mouse IgG, conjugado com HRP, como anticorpo secundário. M: Precision Plus Protein Standards Unstained BIO-RAD (1610363) e Precision Plus Protein Standads Dual Color BIO-RAD (1610374); S: sobrenadantes; P: precipitado.

Devido às dificuldades encontradas com a expressão da proteína solúvel que apesar de existir foi muito insipiente, optamos por avaliar a possibilidade de purificação e renaturação da

proteína a partir dos corpos de inclusão, uma vez que nossos resultados preliminares (tópico 4.5), demonstraram sua presença nesta fração e a capacidade de interação da proteína com a coluna de níquel.

4.7. Expressão da NTPDase2 dos isolados ET e NSL, purificação das proteínas a partir dos corpos de inclusão e renaturação

A literatura mostra que proteínas recombinantes foram obtidas a partir dos corpos de inclusão e renaturadas com sucesso para análise da atividade enzimática (FIETTO et al., 2004; IVANENKOV; MURPHY-PIEDMONTE; KIRLEY, 2003; MARIOTINI-MOURA et al., 2014; MURPHY-PIEDMONTE; CRAWFORD; KIRLEY, 2005; SANTOS et al., 2009; VASCONCELLOS et al., 2014). Adicionalmente, havíamos observado que as proteínas vindas dos corpos de inclusão se ligaram na coluna de níquel, em nossos testes preliminares (Tópico 4.5). Assim, realizamos testes a fim de verificar se as enzimas recombinantes em estudo, poderiam ser renaturadas e suas atividades detectadas.

Os tópicos abaixo resumizam os testes de purificação das proteínas a partir dos corpos de inclusão.

4.7.1. Teste de solubilização com Ureia

A solubilização de proteínas a partir de corpos de inclusão requer altas concentrações de agentes desnaturantes como ureia 6 a 8M ou cloreto de guanidina 6M (RUDOLPH; LILIE, 1996). A NTPDase2 recombinante de *L. infantum chagasi* foi caracterizada por nosso grupo de pesquisa e sua obtenção a partir de corpos de inclusão utilizou tampão contendo 8M de ureia (VASCONCELLOS et al., 2014).

Assim, testamos a solubilização dos corpos de inclusão utilizando tampões com diferentes concentrações de ureia. Nossos resultados mostram que ambas as proteínas apresentaram maior quantidade de proteína solubilizada na concentração de 8M. A figura 24 mostra o SDS-PAGE e coloração com comassie blue (Figura 24A) e o western blotting (Figura 24B), utilizando anti-His tag como anticorpo primário.

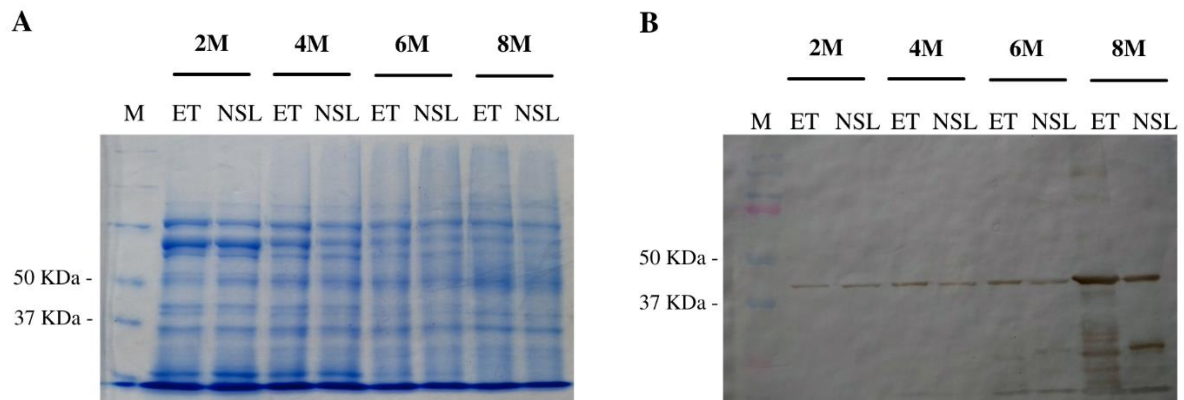


Figura 24: Teste de solubilização com ureia. (A) SDS-PAGE e coloração com comassie blue. M: Precision Plus Protein Standards Unstained BIO-RAD (1610363); 2M, 4M, 6M, 8M: concentrações de ureia utilizadas para solubilização; ET: rET-NTPDase2; NSL: rNSL-NTPDase2 (B) western blotting utilizando anti-His tag como anticorpo primário (SIGMA - H1029), na diluição de 1:5000 e anti-mouse conjugado com HRP, como anticorpo secundário (SIGMA - A9044), na diluição de 1:10.000. A revelação foi feita utilizando 3, 3' diaminobenzidine (SIGMA-D8001) e peróxido de hidrogênio. M: Precision Plus Protein Standards Dual Color BIO-RAD (1610374); 2M, 4M, 6M, 8M: concentrações de ureia utilizadas para solubilização; ET: rET-NTPDase2; NSL: rNSL-NTPDase2.

4.7.2. Testes de pré-purificação

Com o objetivo de avaliar se a adição de agentes desnaturantes ao tampão de lavagem (ureia e β -mercaptoetanol), levariam a uma maior pureza do solubilizado na pré-purificação, foram feitos testes com 4 tampões: Tampão 1 (50 mM Tris; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol); Tampão 2 (50 mM Tris; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 2M Ureia); Tampão 3 (50 mM Tris; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 2M Ureia; 10mM β -mercaptoetanol) e Tampão 3 (50 mM Tris; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 10mM β -mercaptoetanol). As frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE como mostra a Figura 25. Nossos resultados mostram que não houve diferenças significativas na pureza do solubilizado, com exceção de uma aparente e leve melhora com a utilização do tampão 3 (Figura 25C), contudo o uso deste tampão também levou a uma aparente menor quantidade de proteína obtida após a purificação. Assim, optamos por utilizar o tampão 1 durante o processamento da indução para evitar perdas da proteína na purificação.



Figura 25: Testes de pré-purificação. (A) Teste com tampão 1 (50 mM Tris; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol) (B) Teste com tampão 2 (50 mM Tris; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 2M Ureia) (C) Teste com tampão 3 (50 mM Tris; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 2M Ureia; 10mM β -mercaptoetanol) (D) Teste com tampão 4 (50 mM Tris; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 10mM β -mercaptoetanol). Após a linha em cinza estão comparados os volumes não ligados de cada purificação indicados como V1, V2, V3 e V4 (C) ou as amostras purificadas após cada teste, indicadas como P1, P2, P3 e P4 (D). M: Marcador Precision Plus Protein Standards Unstained BIO-RAD (1610363); Li: lisado; L1: lavagem 1; L2: lavagem 2; S: solubilização; P: amostra purificada.

4.7.3. Testes de purificação

Também reavaliamos se a lavagem com 2M de ureia durante a pré-purificação, levaria a perda das proteínas de interesse. Alíquotas da lavagem foram analisadas por SDS-PAGE e western blotting e estão descritas na Figura 26 como LAV. O solubilizado em tampão contendo 8M de ureia (descrito como S) foi purificado por cromatografia de afinidade e durante o processo foram feitas lavagens 10% B e 20% B (descritas na figura como 10% e 20%) para avaliar se a adição destas porcentagens de tampão B levaria a remoção de contaminantes sem levar a eluição das proteínas de interesse (Figura 26).

Nossos resultados mostram que, para rET-NTPDase2, as lavagens com 10% e 20% B durante a purificação não levaram a perda considerável de proteína (Figura 26A), como confirmado pelas marcações fracas no western blotting (Figura 26B). Assim, estes steps podem ser realizados para remoção de contaminantes sem perda da proteína.

Foi observada uma perda maior de proteína na lavagem feita durante a pré-purificação utilizando tampão com 2M de ureia (Figura 26A e B, indicado como LAV). Assim, optamos por não fazer esta lavagem para evitar perdas da proteína e realizar a lavagem durante a purificação em FPLC utilizando steps com porcentagem de 10% de tampão B.

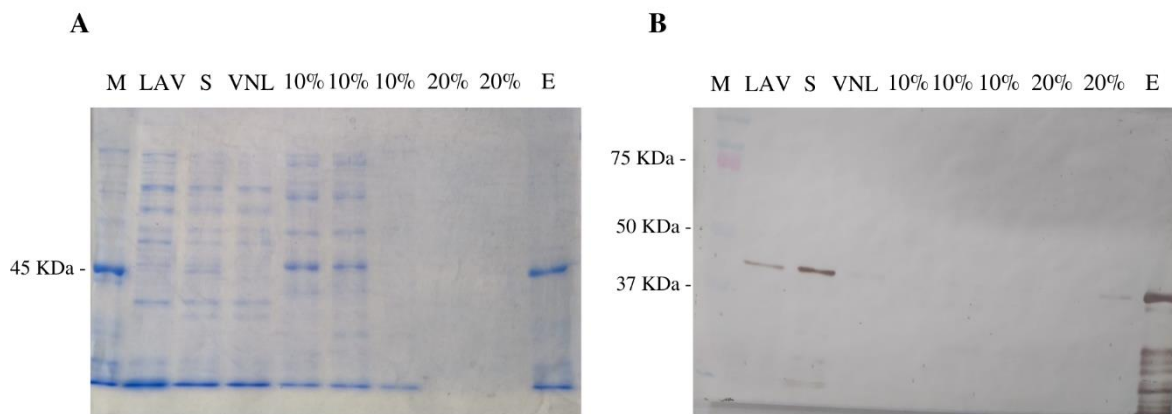


Figura 26: Teste de purificação rET-NTPDase2. (A) SDS-PAGE corado com comassie blue. M: amostra de solubilizado de rET-NTPDase2 eluído a partir da coluna de níquel apenas com 100% B, usado para comparar o tamanho da banda de interesse; LAV: lavagem com tampão 2M de ureia na pré-purificação; S: solubilização dos corpos de inclusão em tampão com 8M de ureia; VNL: volume não ligado da purificação; 10% e 20%: porcentagens de tampão B usadas para lavagem durante a purificação; E: Eluição (B) western blotting utilizando anti-His tag como anticorpo primário (SIGMA - H1029), na diluição de 1:7000 e anti-mouse conjugado com HRP, como anticorpo secundário (SIGMA - A9044), na diluição de 1:10.000. A revelação foi feita utilizando 3, 3' diaminobenzidina (SIGMA-D8001) e peróxido de hidrogênio. M: amostra de solubilizado de rET-NTPDase2 eluído a partir da coluna de níquel apenas com 100% B usado para comparar o tamanho da banda de interesse; LAV: lavagem com tampão 2M de ureia na pré-purificação; S: solubilização dos corpos de inclusão em tampão com 8M de ureia; VNL: volume não ligado da purificação; 10% e 20%: porcentagens de tampão B usadas para lavagem durante a purificação; E: Eluição.

Para rNSL-NTPDase2 foram obtidos resultados parecidos (Figura 27). Parte da proteína sai na lavagem com 2M de ureia na pré-purificação e uma marcação fraca é observada no western blotting para a lavagem com 10% B na purificação por afinidade (Figura 27B). Neste teste não avaliamos a lavagem com 20% B.

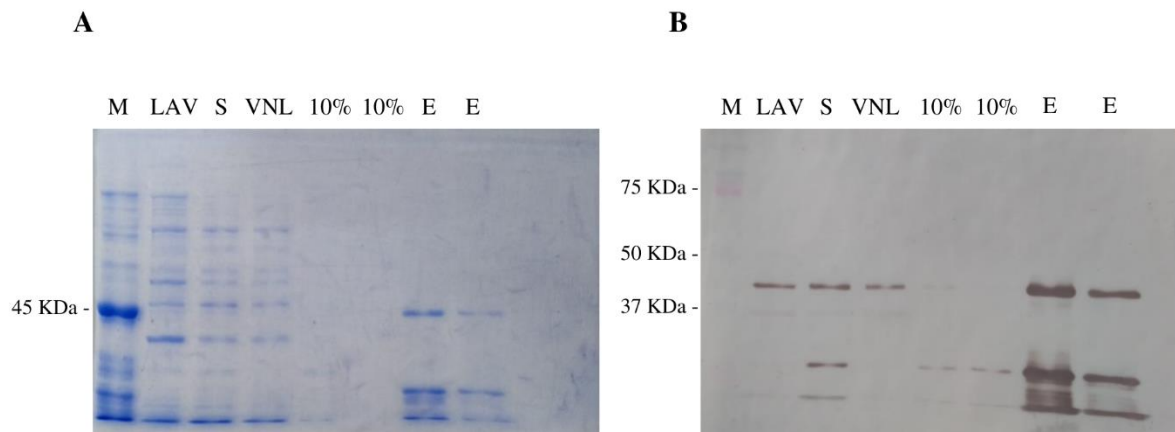


Figura 27: Teste de purificação rNSL-NTPDase2. (A) SDS-PAGE corado com comassie blue. M: amostra de solubilizado de rET-NTPDase2 eluído a partir da coluna de níquel apenas com 100% B, usado para comparar o tamanho da banda de interesse; LAV: lavagem com tampão 2M de ureia na pré-purificação; S: solubilização dos corpos de inclusão em tampão com 8M de ureia; VNL: volume não ligado da purificação; 10%: porcentagem de tampão B usada para lavagem durante a purificação; E: Eluição (B) western blotting utilizando anti-His tag como anticorpo primário (SIGMA - H1029), na diluição de 1:7000 e anti-mouse conjugado com HRP, como anticorpo secundário (SIGMA - A9044), na diluição de 1:10.000. A revelação foi feita utilizando 3, 3' diaminobenzidine (SIGMA-D8001) e peróxido de hidrogênio. M: amostra de solubilizado de rET-NTPDase2 eluído a partir da coluna de níquel apenas com 100% B, usado para comparar o tamanho da banda de interesse; LAV: lavagem com tampão 2M de ureia na pré-purificação; S: solubilização dos corpos de inclusão em tampão com 8M de ureia; VNL: volume não ligado da purificação; 10%: porcentagem de tampão B usada para lavagem durante a purificação; E: Eluição.

4.7.4. Purificação das proteínas utilizando a coluna HisTrap FF crude 5 mL

Neste ponto da pesquisa, havíamos decidido continuar os testes apenas com a proteína do isolado ET, uma vez que a proteína de NSL estava apresentando resultados muito divergentes de atividade nos testes preliminares. Hipotetizamos que variações na quantidade da banda menor, característica desta variante, estava influenciando estes resultados, contudo isso ainda precisa de avaliação. É necessário que a banda de 45 KDa seja isolada para uma comparação mais apurada da atividade. Assim, decidimos continuar os testes com a proteína do isolado ET que apresentava resultados de atividade mais consistentes.

Seria dispendioso manter a purificação de 1,6 L de indução na coluna de 20 mL, assim testamos a purificação utilizando a coluna de 5mL para purificar o correspondente a 800 mL de indução. Contudo, observamos que a purificação nesta coluna, mesmo na presença de um passo de lavagem de 10% B apresentava contaminantes (Figura 28).

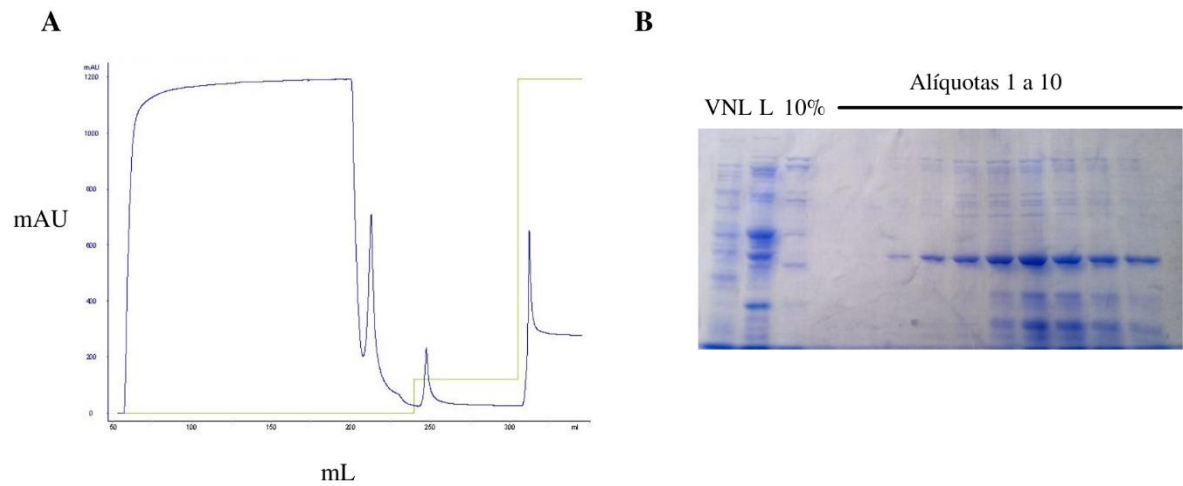


Figura 28: Teste de purificação rET-NTPDase2 na coluna de 5mL. (A) Cromatografia de afinidade ao níquel usando FPLC no sistema Akta Purifier (GE). O eixo X mostra os volumes de amostra e tampão. O eixo Y mostra a detecção de proteína por absorvância A280 (B) SDS-PAGE corado com comassie blue. VNL: volume não ligado da purificação; 10%: porcentagem de tampão B usada para lavagem durante a purificação. Alíquotas 1 a 10: alíquotas eluídas com 100% B.

Imaginamos que o volume de amostra poderia influenciar nestes resultados, uma vez que durante a lavagem com tampão A foi eluído um pico, o que indica a lavagem de grande quantidade de proteínas que interagem fracamente com a coluna. Assim, reduzimos a quantidade de amostra solubilizada a ser aplicada na coluna. Além disso, optamos por aplicar a amostra em dois momentos, intercalados com lavagens com tampão A, por até UV=0 ou 20 a 30 min e 10% B por 20 min. Uma vez que, nos testes anteriores, observamos que a lavagem com 20% B não leva à perda significativa de proteína, foi feito um passo de lavagem adicional com 20% B por 20 min antes da eluição. Como resultado, observamos melhora na amostra purificada e remoção dos contaminantes (Figura 29).

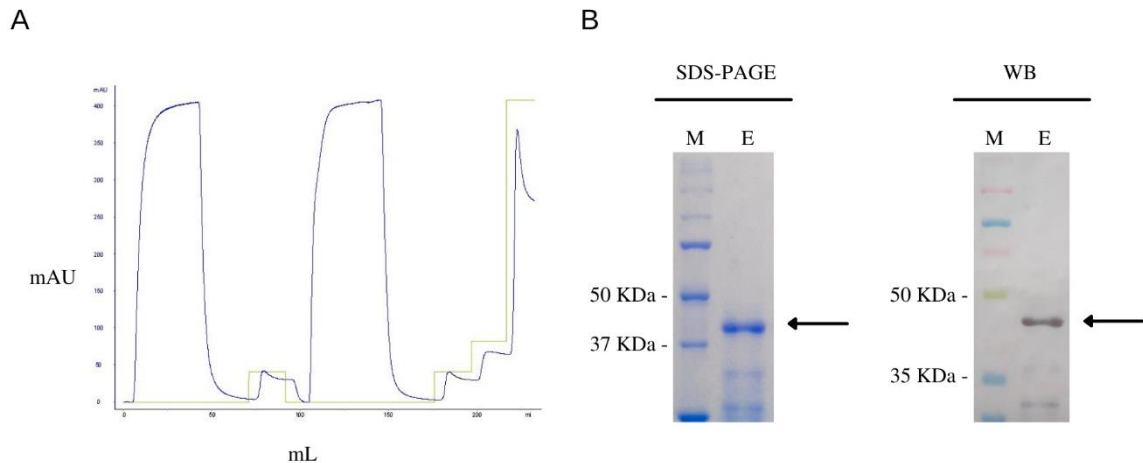


Figura 29: Teste de purificação rET-NTPDase2 na coluna de 5mL. (A) Cromatografia de afinidade ao níquel usando FPLC no sistema Akta Purifier (GE). O eixo X mostra os volumes de amostra e tampão. O eixo Y mostra a detecção de proteína por absorvância A280 (B) Coloração por Comassie do SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% e Western Blotting (WB), usando anticorpo primário anti-polihistidina e anticorpo secundário conjugado com HRP. As setas indicam a banda predita de 45 KDa. M- Marcador Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards #1610363 (BIO-RAD) e Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder #26634 (Thermo Scientific), E-Eluição.

4.8. Renaturação da NTPDase2 dos isolados ET e NSL

Após purificação por cromatografia de afinidade ao níquel o desafio seria obter uma condição na qual as enzimas pudessem se dobrar na conformação nativa. Portanto, realizamos testes a fim de avaliar a possibilidade de renaturação das proteínas recombinantes.

Inicialmente as amostras foram diluídas em tampão I (50 mM de Tris, 50 mM de HEPES, 2,7 mM de MgCl₂, 2 mM de CaCl₂, 116 mM de NaCl, 5,4 mM de KCl e 2,5 mM), em tampão II (50 mM de Tris e 116 mM de NaCl) ou tampão III (50 mM de Tris e 116 mM de NaCl, 1mM GSSG e 1mM GSH), armazenadas à 4°C por 5 dias, contudo houve precipitação e não foi possível avaliar a atividade (Tabela 1).

Assim, testamos o tampão IV, o mesmo utilizado para renaturação da rLicNTPDase2 contendo 100 mM Tris, 600 mM de NaCl, 1mM de GSSG, 1 mM de GSH, 33% de glicerol (VASCONCELLOS et al., 2014) (Tabela 1). A atividade foi avaliada após 48hs de renaturação (Figura 30).

Tabela 1: Tampões testados para renaturação das proteínas recombinantes. A tabela mostra os tampões testados, bem como os fatores de diluição e os resultados qualitativos observados.

Tampão	Diluição	Atividade
Tampão I: 50 mM de Tris, 50 mM de HEPES, 2,7 mM de MgCl ₂ , 2 mM de CaCl ₂ , 116 mM de NaCl, 5,4 mM de KCl e 2,5 mM	20 vezes	Precipitou
Tampão II: 50 mM de Tris e 116 mM de NaCl	20 vezes	Precipitou
Tampão III: 50 mM de Tris, 116 mM de NaCl, 1mM GSSG e 2 mM GSH	20 vezes	Precipitou
Tampão IV: 100 mM Tris, 600 mM de NaCl, 1mM de GSSG, 2 mM de GSH, 33% de glicerol.	20 vezes	Sim

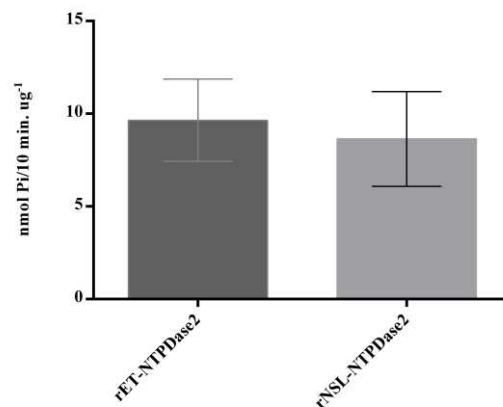


Figura 30: Teste de atividade pós renaturação. Atividade ADPásica foi avaliada pelo método do verde malaquita, utilizando 2,5mM de substrato e tampão contendo Tris 50 mM, HEPES 50 mM, MgCl₂ 2.7 mM, CaCl₂ 2 mM, NaCl 116 mM e KCl 5.4 mM, pH 7.5, em 10 minutos de reação.

4.9. Atividade enzimática

A próxima etapa do trabalho foi caracterizar bioquimicamente as enzimas recombinantes. Iniciamos a caracterização utilizando ADP como substrato por este ser um nucleotídeo amplamente utilizado pelas ENTPDases.

Os testes de atividade enzimática para rET-NTPDase2 mostraram resultados mais consistentes e são discutidos no capítulo 2 desta tese. Nesta seção, nos limitaremos a mostrar o teste preliminar de temperatura e substrato para rNSL-NTPDase2. A título de comparação adicionamos os resultados para os mesmos testes realizados com a enzima rET-NTPDase2.

Não observamos diferença significativa para as atividades avaliadas em diferentes temperaturas (Figura 30A e B). No teste de preferência pelo substrato (Tabela 2, Figura 30C), nossos resultados mostram que ambas enzimas demonstraram baixa atividade para os nucleotídeos trifosfatados testados, o que indica que elas são mais NDPases do que NTPases. Foi observada maior hidrólise dos nucleotídeos UDP (4936 nmolPi/ min/ mg e 3871 nmolPi/ min/ mg) e GDP (4296 nmolPi/ min/ mg e 4185 nmolPi/ min/ mg), seguida pela hidrólise de ADP (1829 nmolPi/ min/ mg e 1262 nmolPi/ min/ mg), para rET-NTPDase2 e rNSL-NTPDase2, respectivamente (Tabela 2). A ordem de atividade para os diferentes substratos para rET-NTPDase2 foi UDP>GDP>ADP>ATP=UTP e para rNSL-NTPDase2 GDP=UDP>ADP=ATP=UTP.

Quando comparamos a hidrólise de ATP, observamos diferença estatística significativa. Esta diferença pode levar à maior hidrólise geral de ATP e ADP e maior produção de AMP por NSL, o que poderia levar à maior produção de adenosina. Não observamos diferenças significativas para a hidrólise dos demais substratos, contudo, analisando a taxa de hidrólise NTP:NDP, nossos resultados sugerem que rNSL-NTPDase2 possua maior habilidade em hidrolisar nucleotídeos trifosfatados do que rET-NTPDase2 (Tabela 3).

Tabela 2: Atividade nucleotídica para hidrólise de substrato. Atividade de hidrólise foi avaliada pelo método do verde malaquita à 37°C, pH 7,5 na presença de 5 mM de MgCl₂ como cofator. A média dos valores de hidrólise são expressos em nmol Pi/min.mg⁻¹. Os valores em parênteses representam o desvio padrão de três ou mais experimentos independentes.

Substrato	rET-NTPDase2 (nmol Pi/ min.mg ⁻¹)	rNSL-NTPDase2 (nmol Pi/ min.mg ⁻¹)
ATP	132.19 (± 56.28)	377.05 (± 163.86)
ADP	1829.86 (± 203.45)	1262.95 (± 529.74)
GDP	4296.29 (± 152.39)	4185.17 (± 911.91)
UTP	80.91 (± 90.49)	261.28 (± 64.31)
UDP	4936.46 (± 212.30)	3871.17 (± 1133.088)

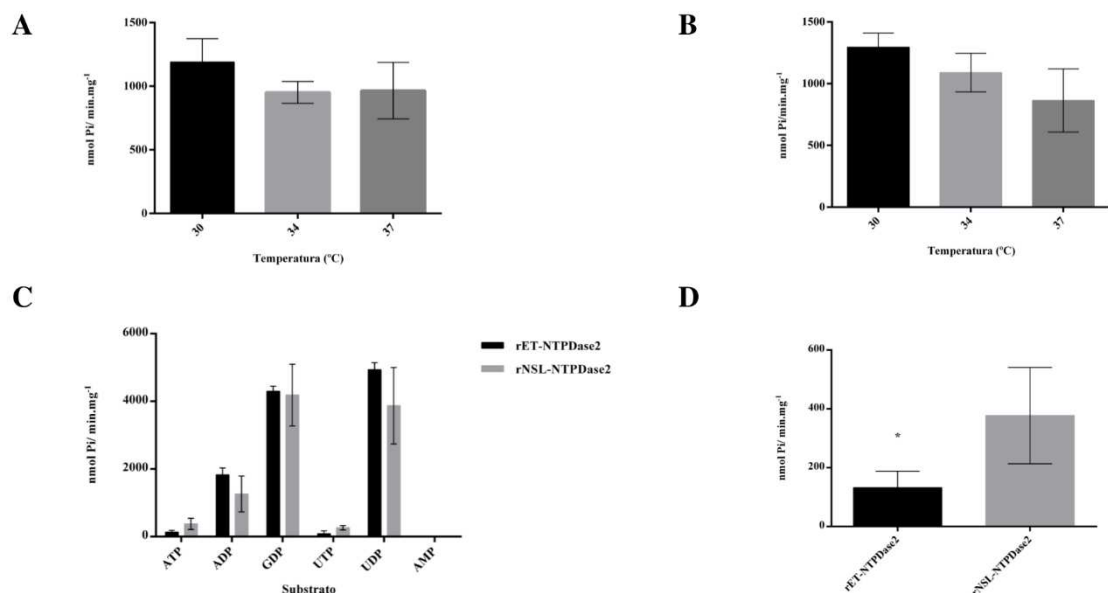


Figura 30: Testes de temperatura e para hidrólise de diferentes substratos. Teste de sensibilidade à temperatura para hidrólise de 2,5 mM ADP para (A) rET-NTPDase-2 e (B) rNSL-NTPDase-2, respectivamente, utilizando MgCl₂ 2,7 mM e CaCl₂ 2 mM como cofatores, no tempo de 10 minutos, pH 7,5. (C) Teste de preferência de substrato utilizando 2,5 mM de ATP, ADP, GDP, UTP e UDP, MgCl₂ 5 mM, pH 7,5 no tempo de 10 minutos (D) Comparação da atividade ATPásica. ANOVA foi utilizada como análise estatística e as barras representam média+ desvio padrão de três ou mais experimentos independentes. Diferenças significativas estão indicadas com asterisco ($p < 0,05$).

Tabela 3: Taxa NTP: NDP e NDP: NTP para os nucleotídeos de uridina e adenina.

Substrato	rET-NTPDase2	rNSL-NTPDase2
NTP: NDP		
ATP: ADP	0,072	0,298
UTP: UDP	0,016	0,067

Nossos resultados sugerem que essas enzimas possam apresentar diferenças catalíticas, reforçando a ideia de que as mutações possam alterar a capacidade de ligação dos substratos, como havíamos sugerido após análise das mutações na estrutura (TORRES, 2017). Além disso, observamos que rNSL-NTPDase2 apresenta uma tendência de sensibilidade à temperatura, contudo não observamos diferenças estatísticas significativas.

Novos testes devem ser realizados a fim de confirmar as características de hidrólise da enzima de NSL, uma vez que ela foi testada nas mesmas condições estabelecidas para a enzima de ET, porém com menor número de repetições experimentais, sendo necessária uma avaliação mais apurada de sua atividade.

5. DISCUSSÃO

A descoberta de variantes para ENTPDase-2 em isolados de *L. (V.) braziliensis* levantou a hipótese de que algumas mutações pontuais poderiam explicar diferenças de atividade ectonucleotidásica e suas correlações com a virulência (LEITE et al., 2012).

Em nossos estudos no Mestrado havíamos identificado variantes enzimáticas em *L. braziliensis*, confirmando resultados prévios descritos na literatura (LEITE et al., 2012). O isolado NSL, que apresenta maior hidrólise de nucleotídeos extracelulares de adenosina, possui duas variantes, uma delas com mutações não-silenciosas e o isolado ET possui apenas a sequência não mutada. Assim, NSL teria a capacidade de produzir duas isoenzimas NTPDase e ET somente uma (LEITE et al., 2012; TORRES, 2017).

A existência de duas variantes para NTPDase com diferentes atividades ectonucleotidásicas havia sido observada em estudo com *T. gondii*. Este trabalho identificou duas variantes de NTPDase denominadas NTPDase 1 e 3, com alta identidade (97%) e mesmo número de aminoácidos, que exibem diferenças significativas na hidrólise de ATP e ADP. A variante com menor hidrólise de ATP (NTPDase 1) é encontrada nas cepas virulenta e não virulenta enquanto a forma com maior hidrólise (NTPDase 3) apenas na virulenta (KRUG et al., 2012).

Diferenças no posicionamento da base de adenina são responsáveis pelas diferenças catalíticas entre as NTPDases de *T. gondii*. Foi demonstrado que a Arg⁴⁹² e Glu⁴⁹³ na região de ligação à base de adenina na TgNTPDase1 são substituídas por glicinas na TgNTPDase3 (KRUG et al., 2013).

Análise da estrutura 3D das enzimas dos isolados ET e NSL, mostra que Q99P, S126F e N185S estão na superfície da enzima. A mutação T376A se localiza internamente, próxima a região de ligação à base do nucleotídeo, local com maior possibilidade de interação com o substrato (TORRES, 2017).

Iniciamos estudos para expressar as proteínas recombinantes, contudo após subclonagem das sequências no vetor de expressão pET21b, não havíamos conseguido observar expressão (TORRES, 2017). Assim, otimizamos as sequências para expressão em *E. coli* e obtivemos comercialmente as construções no vetor pET28a, alvos de experimentação no Doutorado e descritos nesta tese.

Utilizamos a sequência referência para NTPDase2 de *L. braziliensis* (LbrM.15.0030) disponível no TriTrypDB para predição de peptídeo sinal e região transmembrana. Nossos resultados indicam uma alta probabilidade de que a sequência não possua peptídeo sinal e de uma única região transmembrana na porção N-terminal. Diferentemente, NTPDase2 de

Leishmania infantum (VASCONCELLOS et al., 2014), NTPDase1 de *T. cruzi* (MARIOTINI-MOURA et al., 2014) e NTPDase 5 e 6 humanas, filogeneticamente relacionadas às NTPDases de tripanossomatídeos, apresentam peptídeo sinal em suas sequências (IVANENKOV; MURPHY-PIEDMONTE; KIRLEY, 2003; MURPHY-PIEDMONTE; CRAWFORD; KIRLEY, 2005).

Uma vez que a superexpressão de proteínas transmembrana em *E. coli* leva a formação de agregados insolúveis no citoplasma (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018), optamos por expressar apenas o ectodomínio, uma estratégia utilizada para expressão de outras NTPDases (IVANENKOV; MURPHY-PIEDMONTE; KIRLEY, 2003; MURPHY-PIEDMONTE; CRAWFORD; KIRLEY, 2005; VASCONCELLOS et al., 2014).

As construções foram desenhadas no programa Geneious 6.0.6 e a análise do sequenciamento, após tradução das sequências sintetizadas, mostrou a identidade das sequências de aminoácidos em relação à sequência referência e confirmou a presença das mutações em rNSL-NTPDase2.

O alinhamento da sequência de aminoácidos das enzimas recombinantes com outras NTPDases evidencia que as enzimas dos isolados ET e NSL possuem as 5 regiões conservadas de apirase (ACRs), presentes em outras NTPDases. A enzima rET-NTPDase possui sequência idêntica à sequência referência (LbrM.15.0030) enquanto rNSL-NTPDase-2 possui 4 mutações que não estão presentes dentro de ACRs.

Uma região conservada denominada Domínio B (R82-Y121) é um domínio antigênico conservado, compartilhado entre apirase de batata e organismos patogênicos, que não inclui as sequências das ACRs (PORCINO et al., 2012).

O domínio B tem sido alvo de estudos, que demonstram sua importância na geração de uma resposta antigênica (DETONI et al., 2013; PORCINO et al., 2012). Anticorpos policlonais produzidos a partir de peptídeos sintéticos (LbB1LJ e LbB2LJ) relativos ao Domínio B da LbNTPDase2, foram capazes de reconhecer a proteína e reduzir sua atividade. Além disso, esses anticorpos reduziram a proliferação do parasito em ensaios *in vitro*, apontando para a importância desta enzima na infecção por *L. braziliensis* (PORCINO et al., 2012). Adicionalmente, anticorpos anti r-potDomainB e anti LbB1LJ e LbB2LJ identificaram banda de 58–63 kDa e 48 kDa em preparados totais, membrana, fração microssomal e flagelar de promastigotas de *L. amazonenses* (DETONI et al., 2013). Em modelo murino, após a infecção por *L. amazonenses*, os anticorpos produzidos foram capazes de reconhecer os peptídeos pertencentes ao Domínio B. Além disso, os autores observaram a produção de diferentes subtipos de IgG nos estágios iniciais e finais da infecção, sugerindo que este domínio seja capaz

de participar em diferentes respostas, contribuindo com imunomodulação e mecanismos que medeiam susceptibilidade ou resistência a infecção (DETONI et al., 2013).

Ainda não é completamente compreendido como a interação parasita-hospedeiro pode contribuir para a geração das diferentes repostas imunológicas e quadros clínicos na leishmaniose tegumentar. É plausível sugerir que a presença de mutações em proteínas que atuam como fatores de virulência em *Leishmania* possam influenciar no reconhecimento e resposta pelo sistema imune.

Nossos resultados mostram que a mutação na posição Q99P na enzima do isolado NSL se localiza dentro do Domínio B. É importante avaliar se esta mutação pode levar a diferenças de resposta antigênica. Além disso, uma vez que esta região é alvo de reconhecimento por anticorpos, a presença de outras mutações nesta região em outros isolados pode apontar para diferenças na resposta imune e merece uma investigação aprofundada.

As sequências das enzimas recombinantes foram submetidas a análise de ponto isoelétrico e massa molecular na plataforma ExPASy. Os resultados mostram que o tamanho predito para rET-NTPDase2 foi 45.063 KDa e para rNSL-NTPDase2 foi 45.035 KDa e ambas com ponto isoelétrico em 8.48. Após expressão em *E. coli* e purificação, o western blotting com anticorpo anti-His tag confirmou a presença das proteínas com marcação de bandas de tamanho predito de 45 KDa.

A literatura reporta a existência de bandas de 48 KDa e 43 KDa para LbNTPDase2 em estudos com a enzima nativa (PORCINO et al., 2012; REZENDE-SOARES et al., 2010). Quando purificamos as proteínas, observamos a presença de três bandas mais marcadas em rNSL-NTPDase2, uma de tamanho similar ao esperado para o ectodomínio (45KDa) e outras duas entre 25 KDa e 37 KDa e 20 KDa e 15 KDa, tamanhos menores ao esperado (40 KDa). Diferentemente, rET-NTPDase2 apresentou a banda predita (45 KDa) e um padrão mais contínuo de bandas de tamanhos menores.

A banda de 43 KDa havia sido sugerida como resultante de processamento proteolítico pós-traducional no parasito (PORCINO et al., 2012). Interessantemente, em *L. amazonenses*, a identificação da isoforma menor por anticorpos policlonais, produzidos contra o Domínio B, levou ao reconhecimento de uma banda de 58–63 KDa e uma banda adicional de 48 KDa (DETONI et al., 2013).

Posteriormente, realizamos testes objetivando a purificação da rET-NTPDase2 a partir da fração solúvel, mas sem sucesso. Na purificação por cromatografia de afinidade utilizando steps de tampão de B, a proteína de interesse eluiu em diferentes frações com a presença de

contaminantes e a precipitação com sulfato de amônio levou à precipitação da proteína em todas as porcentagens testadas.

Antes de prosseguir para análise da expressão em outros sistemas, decidimos avaliar a possibilidade de obter a proteína a partir dos corpos de inclusão, uma vez que outras que proteínas recombinantes foram obtidas a partir desta fração e renaturadas com sucesso para análise da atividade enzimática (IVANENKOV; MURPHY-PIEDMONTE; KIRLEY, 2003; MURPHY-PIEDMONTE; CRAWFORD; KIRLEY, 2005; VASCONCELLOS et al., 2014). Adicionalmente, havíamos observado que as proteínas obtidas a partir dos corpos de inclusão foram capazes de se ligar à coluna de afinidade em nossos testes preliminares.

Nos testes de pré-purificação nossos resultados mostram que as proteínas são melhor solubilizadas em tampão contendo 8M de ureia e a adição de agentes desnaturantes nas lavagens, não levou a diferenças significativas na pureza do solubilizado, mas a uma possível perda da proteína durante o processo, pois foi observado um aparente menor rendimento após a purificação. Após alguns testes verificamos que a lavagem durante a purificação com steps de 10% e 20% B eram uma melhor alternativa.

Um desafio em trabalhar com proteínas de corpos de inclusão é a renaturação para condições de dobramento nativas. Para esse fim são comumente utilizados aditivos que permitem a estabilização proteica (ALIBOLANDI; MIRZAHOSEINI, 2011).

A presença de sais auxilia na estabilização de interações eletrostáticas (ALIBOLANDI; MIRZAHOSEINI, 2011). Inicialmente testamos a renaturação em tampão 50 mM de Tris, 50 mM de HEPES, 2,7 mM de MgCl₂, 2 mM de CaCl₂, 116 mM de NaCl, 5,4 mM de KCl e 2,5 mM. A presença de cofatores frequentemente estabiliza a estrutura nativa da proteína pela coordenação com resíduos específicos e pode ser essencial para o dobramento (WITTUNG-STAFSHED, 2004). Uma vez que cátions divalentes de cálcio e magnésio atuam como cofatores de NTPDases avaliamos a renaturação na presença destes cofatores, contudo foi observada precipitação das proteínas.

A presença de sais também pode levar à precipitação de proteínas (ALIBOLANDI; MIRZAHOSEINI, 2011). Contudo, ao testarmos um tampão com menor quantidade de sais, contendo apenas Tris e NaCl (50 mM Tris; 116 mM NaCl), também observamos precipitação das amostras.

O dobramento correto é favorecido pela presença de um ambiente redox, que auxilia na formação de pontes dissulfeto. A renaturação é favorecida pela presença de thiois de baixo peso molecular (Glutathionas) em seus estados reduzido e oxidado (VALLEJO; RINAS, 2004).

Contudo o uso de tampão contendo glutathiona oxidada (GSSG) e reduzida (GSH), também levou a precipitação.

Glicerol é comumente utilizado para renaturação e auxilia na estabilização proteica, pelo fortalecimento das interações hidrofóbicas e ordenamento do solvente à superfície externa da proteína (ALIBOLANDI; MIRZAHOSEINI, 2011). A enzima rLicNTPDase2 estudada por nosso grupo de pesquisa, havia sido caracterizada com sucesso, após renaturação utilizando tampão contendo glicerol (VASCONCELLOS et al., 2014). Ao testar a renaturação para o tampão IV (100 mM Tris, 600 mM de NaCl, 1mM de GSSG, 1 mM de GSH, 33% de glicerol), observamos atividade ADPásica após 48 horas e seguimos os experimentos nesta condição.

Ao testar a atividade para hidrólise de diferentes substratos, observamos que as enzimas hidrolisaram muito pouco os substratos trifosfatados e em maior quantidade os substratos difosfatados UDP e GDP, podendo ser caracterizadas como preferencialmente difosfatases.

Interessantemente as enzimas de *T. cruzi* (MARIOTINI-MOURA et al., 2014) e *Leishmania infantum* (VASCONCELLOS et al., 2014), caracterizadas por nosso grupo de pesquisa, possuem relação filogenética próxima das NTPDases 5 e 6 humanas (IVANENKOV; MURPHY-PIEDMONTE; KIRLEY, 2003; MURPHY-PIEDMONTE; CRAWFORD; KIRLEY, 2005) e todas elas exibem acentuada hidrólise de nucleotídeos difosfatados.

A taxa de hidrólise NTP:NDP é utilizada como base para classificação de Ecto-ATPases em dois principais grupos: apirases que hidrolisam NTPs e NDPs a taxas semelhantes e ATPases que exibem maior hidrólise de NTPs (SMITH; LEWIS CARL; KIRLEY, 1999). Estudos mostram que mutações pontuais alteram a taxa de hidrólise NTP:NDP em NTPDases humanas, avaliando o efeito de mutações em regiões conservadas de apirase, conhecidamente importantes para catálise (KIRLEY; YANG; IVANENKOV, 2001; SMITH; LEWIS CARL; KIRLEY, 1999)

Havíamos hipotetizado que a presença da alanina, que possui um grupo R menor, próxima da região de ligação ao substrato em NSL-NTPDase2 poderia afetar a interação, levando a maior hidrólise de nucleotídeos trifosfatados (TORRES, 2017). Nossos resultados reforçam esta ideia, pois mostram que rNSL-NTPDase2 apresenta maior taxa NTPase:NDPase.

A maior hidrólise de ATP pela enzima de NSL poderia justificar, em parte, a diferença de hidrólise de nucleotídeos de adenina observada para o isolado, contribuindo para as diferenças de virulência. Esta diferença pode levar à maior hidrólise geral de ATP e ADP e maior produção de AMP por NSL. A produção de AMP gera substrato para ação da 5' ectonucleotidases, que podem hidrolisar AMP em adenosina. Adenosina possui papel conhecido na regulação das repostas imunes, restaurando a homeostase (HASKÓ; PACHER,

2012). Adenosina leva a diminuição de vários mediadores pro-inflamatórios em macrófagos como IL-12, óxido nítrico e superóxido (HASKÓ; PACHER, 2012). A ligação a receptores do tipo A2 leva a efeitos anti-inflamatórios como inibição da liberação de TNF- α e aumento da produção de IL-10 por macrófagos (BURNSTOCK; BOEYNAEMS, 2014). Além disso adenosina pode ser incorporada pelo parasito, uma vez que *Leishmania* não apresenta via *de novo* de purinas (MARR; BERENS; NELSON, 1978).

Contudo, mais estudos são necessários a fim de avaliar a atividade enzimática desta variante, de forma mais apurada. Ao longo dos testes observamos que a enzima rNSL-NTPDase2 começou a apresentar resultados divergentes, com valores de atividade mais baixos do que os observados previamente. Hipotetizamos que a presença da banda menor, característica desta enzima, quando mais representada na purificação, pudesse influenciar os resultados e levar à menor hidrólise. Isso sugeriria que esta banda menor não possui atividade ou possui atividade menor do que a banda de 45 KDa, contudo, não avaliamos esta hipótese. Para uma melhor caracterização desta enzima, é necessário o isolamento da banda de 45 KDa e avaliação de suas características de hidrólise. Além disso, neste teste a enzima de NSL foi renaturada nas mesmas condições estabelecidas para ET, sendo necessária uma avaliação mais apurada de sua atividade após a renaturação como foi feito para a outra enzima sendo possível que sua renaturação demande condições diferenciadas de ET.

6. CONCLUSÃO

Diante de tudo o que foi discutido até o momento, as enzimas dos isolados ET e NSL apresentam características comuns a NTPDases como presença de 5 regiões conservadas de apirase, hidrólise de substratos tri e difosfatados na presença de íons divalentes e ausência de hidrólise de AMP.

Observamos diferenças na hidrólise de ATP, sugerindo que a variante NSL-NTPDase2 possa contribuir para as diferenças observadas previamente nos ensaios com promastigotas. Além disso, a maior hidrólise de ATP por rNSL-NTPDase2 pode diminuir a disponibilidade desta molécula imunoestimulante, favorecendo o estabelecimento do parasita.

Nossos resultados sugerem que variantes em *L. (V.) braziliensis* podem representar diferentes perfis enzimáticos e apontam para o potencial das mutações em influenciar na virulência por meio de diferenças na catálise. Além disso, é importante investigar se mutações dentro do domínio B podem levar a diferenças de resposta imune.

Esperamos, no futuro, contribuir na elucidação das diferenças inerentes às variantes enzimáticas em *Leishmania braziliensis*, auxiliando na compreensão da relação parasita-hospedeiro na infecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. Leishmania species: Models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, v. 112, n. 18, p. 2993–3002, 1999.
- ALIBOLANDI, M.; MIRZAHOSEINI, H. Chemical assistance in refolding of bacterial inclusion bodies. **Biochemistry Research International**, v. 2011, 2011.
- ALVES-FERREIRA, E. V. C. et al. Differential Gene Expression and Infection Profiles of Cutaneous and Mucosal Leishmania braziliensis Isolates from the Same Patient. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 1–19, 2015.
- BARROS, F. S. et al. Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in Entamoeba histolytica. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 375, n. 2, p. 304–314, 2000.
- BERRÊDO-PINHO, M. et al. A Mg-Dependent Ecto-ATPase in Leishmania amazonensis and Its Possible Role in Adenosine Acquisition and Virulence. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 391, n. 1, p. 16–24, 2001.
- BISAGGIO, D. F. R. et al. Ecto-ATPase activity on the surface of Trypanosoma cruzi and its possible role in the parasite-host cell interaction. **Parasitology Research**, v. 91, n. 4, p. 273–282, 2003.
- BOURS, M. J. L. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 112, n. 2, p. 358–404, 2006.
- BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 12, p. 1471–1483, 2007.
- BURNSTOCK, G.; BOEYNAEMS, J. M. Purinergic signalling and immune cells. **Purinergic Signalling**, v. 10, n. 4, p. 529–564, 2014.
- DEAGLIO, S. et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 6, p. 1257–65, 2007.
- DETONI, M. L. et al. An antigenic domain of the Leishmania amazonensis nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is associated with disease progression in susceptible infected mice. **Parasitology Research**, v. 112, n. 8, p. 2773–2782, 2013.
- EKMAN, PIA; JAGER, O. Quantification of subnanomolar amounts of phosphate bound to seryl and threonyl residues in phosphoproteins using alkaline hydrolysis and malachite green. **Analytical Biochemistry**, v. 214, p. 138–141, 1993.
- FIETTO, J. L. R. et al. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of Trypanosoma cruzi. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, n. 2, p. 454–460, 2004.
- GASTEIGER, E. et al. The Proteomics Protocols Handbook. **The Proteomics Protocols Handbook**, p. 571–608, 2005.
- GOMES, R. S. et al. E-NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) of Leishmania amazonensis inhibits macrophage activation. **Microbes and Infection**, v. 17, n. 4, p. 295–303, 2015.

- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.
- HAO, Y. et al. P2Y6 receptor-mediated proinflammatory signaling in human bronchial epithelia. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.
- HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403–409, 2011.
- HASKÓ, G.; PACHER, P. Regulation of Macrophage Function by Adenosine. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 4, p. 865–869, 2012.
- IVANENKOV, V. V.; MURPHY-PIEDMONTE, D. M.; KIRLEY, T. L. Bacterial expression, characterization, and disulfide bond determination of soluble human NTPDase6 (CD39L2) nucleotidase: Implications for structure and function. **Biochemistry**, v. 42, n. 40, p. 11726–11735, 2003.
- KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 803–822, 2018.
- KIRLEY, T. L.; YANG, F.; IVANENKOV, V. V. Site-directed mutagenesis of human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3: The importance of conserved glycine residues and the identification of additional conserved protein motifs in eNTPDases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 395, n. 1, p. 94–102, 2001.
- KNOWLES, A. F. The GDA1_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. **Purinergic Signalling**, v. 7, n. 1, p. 21–45, 2011.
- KROGH, A. et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. **Journal of Molecular Biology**, v. 305, n. 3, p. 567–580, 2001.
- KRUG, U. et al. Structural insight into activation mechanism of *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate diphosphohydrolases by disulfide reduction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 5, p. 3051–3066, 2012.
- KRUG, U. et al. The ATP/ADP substrate specificity switch between *Toxoplasma gondii* NTPDase1 and NTPDase3 is caused by an altered mode of binding of the substrate base. **ChemBioChem**, v. 14, n. 17, p. 2292–2300, 2013.
- LEITE, P. M. et al. Ecto-Nucleotidase Activities of Promastigotes from *Leishmania (Viannia) braziliensis* Relates to Parasite Infectivity and Disease Clinical Outcome. v. 6, n. 10, 2012.
- MAIA, A. C. R. G. et al. *Leishmania infantum* amastigote nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase 1): Its inhibition as a new insight into mode of action of pentamidine. **Experimental Parasitology**, v. 200, n. February, p. 1–6, 2019.
- MAIOLI, T. et al. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. **Parasitology Research**, v. 94, p. 207–212, 2004.
- MARIOTINI-MOURA, C. et al. *Trypanosoma cruzi* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion. **Acta Tropica**, v. 130, n. 1, p. 140–147, 2014.
- MAROLI, M. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, n. 2, p. 123–

147, 2013.

MARQUES-DA-SILVA, E. D. A. et al. Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. **Microbes and Infection**, v. 10, p. 850–857, 2008.

MARR, J. J.; BERENS, R. L.; NELSON, D. J. Purine metabolism in *leishmania donovani* and *leishmania braziliensis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 544, n. 1978, p. 360–371, 1978.

MARZOCHI, M. C. DE A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, n. suppl 2, p. S359–S375, 1994.

MCCONVILLE, M. J.; NADERER, T. Metabolic pathways required for the intracellular survival of *Leishmania*. **Annual Review of Microbiology**, v. 65, p. 543–561, 2011.

MEYER-FERNANDES, J. R. et al. A Mg-dependent ecto-ATPase is increased in the infective stages of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 93, n. 1, p. 41–50, 2004.

MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Drugs**, v. 73, n. 17, p. 1889–1920, 2013.

MURPHY-PIEDMONTE, D. M.; CRAWFORD, P. A.; KIRLEY, T. L. Bacterial expression, folding, purification and characterization of soluble NTPDase5 (CD39L4) ecto-nucleotidase. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1747, n. 2, p. 251–259, 2005.

NIELSEN, H. Predicting secretory proteins with signalP. **Methods in Molecular Biology**, v. 1611, p. 59–73, 2017.

PINHEIRO, C. M. et al. *Leishmania amazonensis*: Biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. **Experimental Parasitology**, v. 114, n. 1, p. 16–25, 2006.

PIRMEZ, C. Immunopathology of American Cutaneous Leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. V, p. 105–109, 1992.

PORCINO, G. N. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1): Localization and in vitro inhibition of promastigotes growth by polyclonal antibodies. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 293–299, 2012.

PORCINO, G. N. **NTPDase 1 de *Leishmania braziliensis* como alvo terapêutico: Imunolocalização em formas promastigotas e amastigotas e susceptibilidade à leishmanicidas.** [s.l.] Universidade Federal de Juiz de Fora, 2016.

REZENDE-SOARES, F. A. et al. Cytochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes and identification of an antigenic and catalytically active isoform. **Parasitology**, v. 137, n. 5, p. 773–783, 2010.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 409–430, 2006.

RUDOLPH, R.; LILIE, H. In vitro folding of inclusion body proteins. **The FASEB Journal**, v. 10, n. 1, p. 49–56, 1996.

SACKS, B. D. L. et al. Stage-specific Binding of *Leishmania donovani* to the Sand Fly

Vector Midgut Is Regulated by Conformational Changes in the Abundant Surface Lipophosphoglycan. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 181, n. February, p. 685–697, 1995.

SAMBROOK, J. F.; RUSSELL, D. W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 1,2 and 3, p. 2231, 2001.

SANSOM, F. M. The role of the NTPDase enzyme family in parasites : what do we know, and where to from here ? **Parasitology**, v. 139, p. 963–980, 2012.

SANSOM, F. M. et al. Golgi-Located NTPDase1 of *Leishmania major* Is Required for Lipophosphoglycan Elongation and Normal Lesion Development whereas Secreted NTPDase2 Is Dispensable for Virulence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, 2014.

SANTOS, R. F. et al. Influence of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase Activity on *Trypanosoma cruzi* Infectivity and Virulence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 3, 2009.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592, 2016.

SMITH, T. M.; LEWIS CARL, S. A.; KIRLEY, T. L. Mutagenesis of two conserved tryptophan residues of the E-type ATPases: Inactivation and conversion of an ecto-apyrase to an ecto-NTPase. **Biochemistry**, v. 38, n. 18, p. 5849–5857, 1999.

TORRES, N. DA R. **Clonagem, avaliação de SNPs e expressão heteróloga da ATP difosfohidrolase 2 (NTPDase2) das cepas ET e NSL de Leishmania (Viannia) braziliensis**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2017.

VALLEJO, L. F.; RINAS, U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. **Microbial Cell Factories**, v. 3, n. 11, p. 1–12, 2004.

VASCONCELLOS, R. D. S. et al. *Leishmania infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 is an Apyrase Involved in Macrophage Infection and Expressed in Infected Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, p. e3309., 2014.

VOLPEDO, G. et al. Mechanisms of Immunopathogenesis in Cutaneous Leishmaniasis And Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL). **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. June, p. 1–16, 2021.

WARNY, M. et al. P2Y6 Nucleotide Receptor Mediates Monocyte Interleukin-8 Production in Response to UDP or Lipopolysaccharide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 28, p. 26051–26056, 2001.

WITTUNG-STAFSHEDE, P. Role of cofactors in metalloprotein folding. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 37, n. 3–4, p. 285–314, 2004.

ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. 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**, v. 105, n. 19, p. 6882–6887, 2008.

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

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 3, p. 437–502, 2012.

ANEXOS

ANEXO A. Sequência que codifica para o ectodomínio da NTPDase2 do isolado ET otimizada.

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          10          20          30          40          50
NTPDase2_E TCCCCTTGCA ACTCCCCATA TTCAAACGTA TATGACATCG TTATTGACGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          60          70          80          90          100
NTPDase2_E GGGCTCGACC GGGAGTCGTG TGCACGTGTT TCAATATGAG CGCTCTTCTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          110         120         130         140         150
NTPDase2_E CCGGCGTAAT TTTGCTGCGC GAGCGCTTTA AGCGCATCGA ACCGGGTTTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          160         170         180         190         200
NTPDase2_E TCGAGTTTTG CCACCGATCA AGAGGGTGCT AAACAGTCCT TGGCAGGTTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          210         220         230         240         250
NTPDase2_E ACTTCGCTTT GCTGAGAAAG CTGTTCCACG CTCTTACCAG CGTTGCACGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          260         270         280         290         300
NTPDase2_E CTGTTACTTT GAAAGCTACA GCGGGCTTAC GCCTGTTACC GGAGGCCGAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          310         320         330         340         350
NTPDase2_E CAGCAGGTAC TTCTTGACGC AGCGCAGCAG ACCCTTAAGG CGTTCCCCTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          360         370         380         390         400
NTPDase2_E CCAGAGCCGT GGGGCTTCTA TTGTTTCTGG CGCTCAAGAG GGTGTCTATG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          410         420         430         440         450
NTPDase2_E GTTGGTTGAC GGTTAATTAC CTGTAAACC GTTTGGATAA AGAAGGCGCG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          460         470         480         490         500
NTPDase2_E ACTGTGGCAA CGATCGATAT GGGTGGAGCG AGTACTCAGG TGGTGTTCGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          510         520         530         540         550

```

NTPDase2_E AACTAAATTT ACTTCAGGCG AATGGTTGCC ATTTAATTAT GCACACCAAC

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
560 570 580 590 600
NTPDase2_E TTCGCACGCC CAAACGCACG ATTGCGATGT ACCAACATAG CTATTTGGGG

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
610 620 630 640 650
NTPDase2_E CTTGGTCTGA ATGAGGCCAA GAAACTCTG ATGACGTTGT TCGCAAAGGT

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
660 670 680 690 700
NTPDase2_E GAACGGCACT TCTCCTTTTT CTTGCTTTCC ACGCCGCCAT ACTGAGCACC

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
710 720 730 740 750
NTPDase2_E TTAACGGCGT AGAGTTACGT AATGGAGATT CGACAGACTT TGATGTTTGC

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
760 770 780 790 800
NTPDase2_E GTTAATCTGT TCCGCGAGCA TGTGATCACC AAGCCTATCT GCCGTTTTGA

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
810 820 830 840 850
NTPDase2_E CGCATGTGGT GCGCGCGGGG TGCCGCAGCC CCCCCTGCCT AGCAAGCAGC

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
860 870 880 890 900
NTPDase2_E ATCCGATCTA CGCTTTTCAGT TACTTCTATG ATCGCCTGTA CCATTTCCGT

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
910 920 930 940 950
NTPDase2_E TCGGAGGGAT TCCCGGTGTA CGTATCTAGC TACAAAGAAC TGGGCCGCGA

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
960 970 980 990 1000
NTPDase2_E AGTTTGCCAA CGCGAGAGCG CTGACCACAC AACTACACCC AAAGAGACCA

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
1010 1020 1030 1040 1050
NTPDase2_E CGTGCATGGA GCTGGCCTAC CTGTACAGCT TTCTTACGCA TGGCTTAGGC

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
1060 1070 1080 1090 1100
NTPDase2_E TTGAGTGATG ATCGCACTTT GGAGGTGCCT AACCGCATTG AGGGGATTGC

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
1110 1120 1130 1140
NTPDase2_E CGTATCCTGG AGCCTGGGCT GCTCATTGAG TTTCGTGTTA AAAATGGAA

ANEXO B. Sequência que codifica para o ectodomínio da NTPDase2 do isolado NSL otimizada.

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          10          20          30          40          50
NTPDase2_N TCACCCTGTA ACTCTCCTTA TAGTAACGTC TACGACATTG TTATCGATGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          60          70          80          90         100
NTPDase2_N AGGCAGTACC GGGTCTCGTG TGCACGTATT TCAATACGAA CGTTCATCGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          110         120         130         140         150
NTPDase2_N CTGGAGTCAT TCTGCTTCGT GAACGTTTTA AGCGCATTGA ACCGGGATTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          160         170         180         190         200
NTPDase2_N TCCTCGTTTG CCACTGACCC TGAGGGAGCA AAACAGTCCC TGGCAGGTTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          210         220         230         240         250
NTPDase2_N ACTTCGTTTT GCTGAGAAAG CTGTACCCCG TTCTTACCAG CGTTGCACCT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          260         270         280         290         300
NTPDase2_N TTGTTACACT TAAGGCTACC GCCGGGTTGC GCTTACTGCC CGAAGCGGAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          310         320         330         340         350
NTPDase2_N CAGCAGGTTT TATTGGATGC GGCACAACAA ACCTTAAAGG CGTTCCCTTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          360         370         380         390         400
NTPDase2_N TCAAAGTCGT GGTGCAAGCA TCGTATCCGG GGCTCAAGAG GGGGTTTACG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          410         420         430         440         450
NTPDase2_N GGTGGTTGAC TGTA AATTAT CTTTTAAGCC GCCTTGACAA AGAAGGTGCG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          460         470         480         490         500
NTPDase2_N ACAGTTGCAA CGATCGACAT GGGGGGTGCA TCAACCCAGG TGGTATTTCGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          510         520         530         540         550
NTPDase2_N GACCAAGTTT ACTTCAGGGG AGTGGCTTCC ATTTAATTAT GCTCACCAAT

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      560      570      580      590      600
NTPDase2_N TACGTACGCC CAAACGCACT ATTGCTATGT ATCAACACTC ATACCTGGGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      610      620      630      640      650
NTPDase2_N CTTGGGTTAA ACGAAGCAAA GAAGACTCTT ATGACCCTGT TTGCAAAGGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      660      670      680      690      700
NTPDase2_N CAATGGTACG AGTCCCTTTT CGTGTTTCCC GCGTCGTCAT ACGGAGCACC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      710      720      730      740      750
NTPDase2_N TGAACGGGGT GGAGCTGCGC AATGGGGACA GCACTGATTT CGATGTCTGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      760      770      780      790      800
NTPDase2_N GTGAATTTGT TCCGTGAACA CGTGATTACA AAACCGATTT GCCGCTTTGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      810      820      830      840      850
NTPDase2_N TGCTTGTGGA GCACGTGGTG TGCCACAACC GCCCTTGCCC TCCAAGCAGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      860      870      880      890      900
NTPDase2_N ACCCGATCTA CGCCTTTAGC TATTTTTACG ATCGTCTTTA CCATTTCCGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      910      920      930      940      950
NTPDase2_N TCCGAGGGCT TCCCTGTGTA TGTTAGCAGC TACAAAGAGC TGGGGCGTGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      960      970      980      990     1000
NTPDase2_N GGTTTGTCAA CGTGAAAGTG CTGACCATAC GACCACTCCC AAGGAGACCG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     1010     1020     1030     1040     1050
NTPDase2_N CCTGTATGGA GCTGGCCTAT CTGTACAGCT TTCTGACACA TGGTTTAGGC

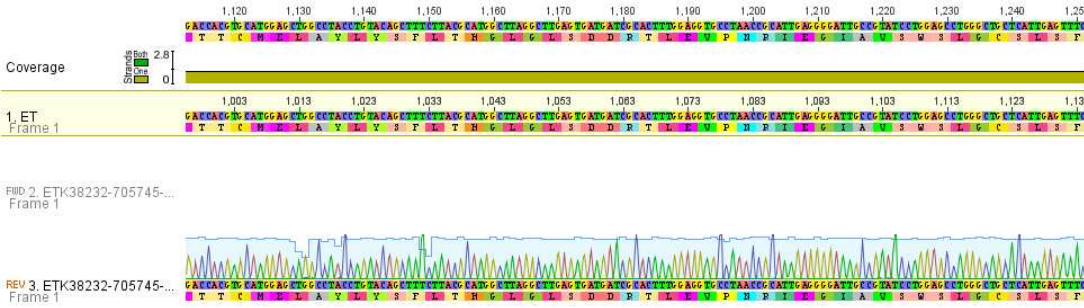
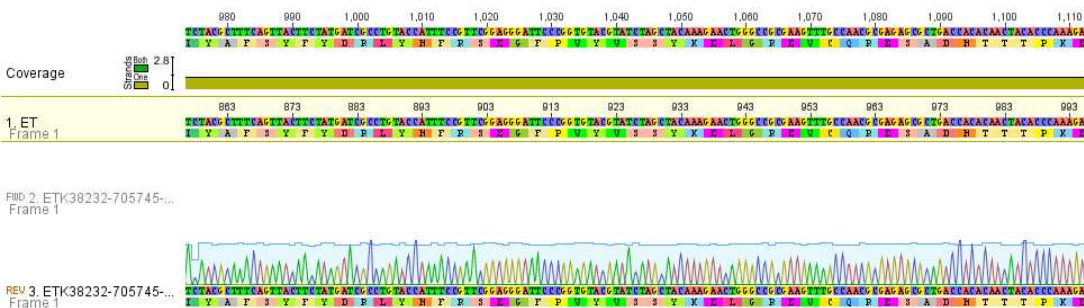
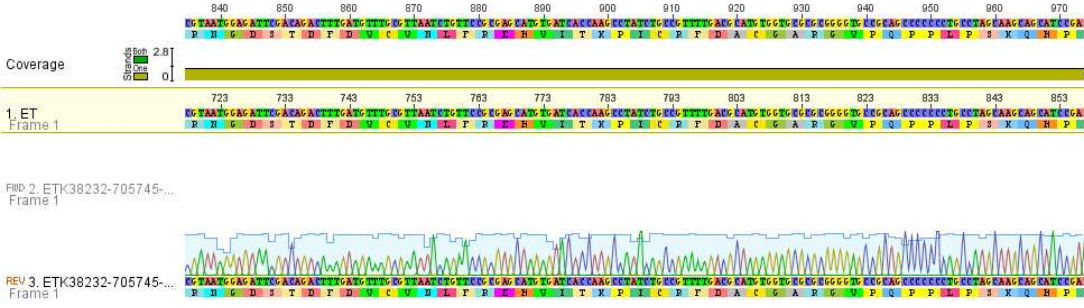
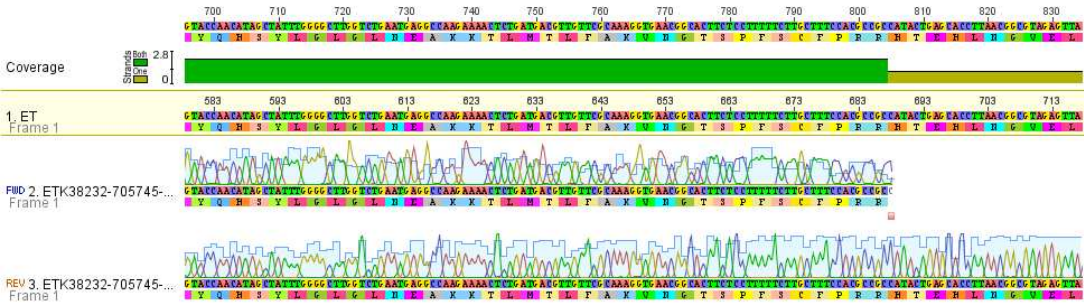
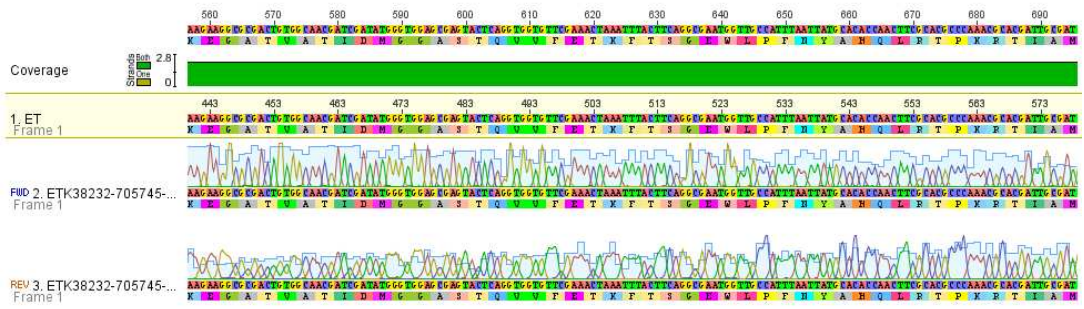
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     1060     1070     1080     1090     1100
NTPDase2_N CTTTCAGATG ACCGTACACT GGAAGTGCCC AATCGCATCG AAGGCATTGC

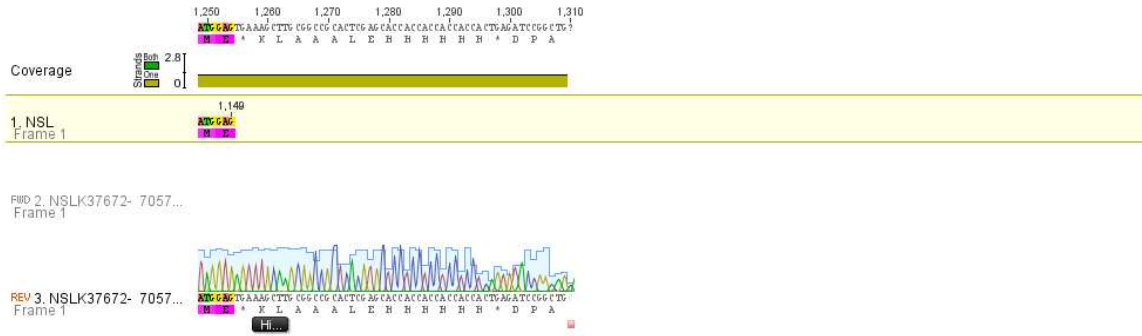
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     1110     1120     1130     1140
NTPDase2_N TGTTTTCGTGG TCCCTTGGGT GTTCCCTTTC CTTTGTCTT AAGATGGAG

```

ANEXO C: Confirmação das construções por sequenciamento. O sequenciamento das construções foi alinhado com a sequência referência da LbNTPDase2 (LbrM.15.0030) para confirmação da sequência de aminoácidos, mutações e frame. As anotações mostram a região *rbs*, o start códon, a cauda de histidina N-terminal, as mutações em rNSL-NTPDas-2 e os sítios de restrição *Nde I* e *Hind III*.







ANEXO F: Alinhamento das seqüências das enzimas rET-NTPDase2 e rNSLNTPDase2 no programa Clustal W.

	10 20 30 40 50
HsNTPDase1	-----
HsNTPDase2	-----
HsNTPDase3	-----
HsNTPDase4	-----
HsNTPDase5	-----
HsNTPDase6	-----
HsNTPDase7	-----
HsNTPDase8	-----
RnNTPDase2	-----
TcNTPDase	MKQSMARSRR LKRPCISLTF ALLCLFLVTV VYITAYTVGK FSMDARGREK
LbNTPDase2	-----
rET-NTPDas	-----
rNSL-NTPDa	-----
LmNTPDase2	-----
LaeNTPDase	-----
LaNTPDase2	-----
LtNTPDase2	-----
LiNTPDase2	-----
LmxNTPDase	-----
LpNTPDase2	-----
LdNTPDase2	-----

	60 70 80 90 100
HsNTPDase1	-----MED
HsNTPDase2	-----MAG
HsNTPDase3	-----MFTVLTRQPC
HsNTPDase4	-----M GRIGISCLFP ASWHFSISPV GCPRI LNTNL RQIMVISVLA
HsNTPDase5	-----MATS WG TVFFM-----LVVSC
HsNTPDase6	-----MK KGIRYETS RK TSYIFQQPQH GPWQTRMRKI SNHGSLRVAK
HsNTPDase7	-----M ARISFSYLCP ASWYFTVPTV -SPFLR-----QRVAFLGLFF
HsNTPDase8	-----MGL
RnNTPDase2	-----MAG
TcNTPDase	LDLTDRIIHS MTKRFQECQA QKQLLNKNGHT TARMALEIAQ ETKKKLEMEL
LbNTPDase2	-----
rET-NTPDas	-----
rNSL-NTPDa	-----
LmNTPDase2	-----
LaeNTPDase	-----

```

LaNTPDase2 -----
LtNTPDase2 -----
LiNTPDase2 -----
LmxNTPDase -----
LpNTPDase2 -----
LdNTPDase2 -----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      110      120      130      140      150
HsNTPDase1 TKESNVKTFC SKNILAILGF SSIIAVIALL AVG-----
HsNTPDase2 KVRS----- ----LLPPLL LAAAGLAGLL LLC-----
HsNTPDase3 EQAGLKALYR TPTIIALVVL LVSIVVLVSI TVI-----
HsNTPDase4 AAVSLLYFSV VIIRNKYGR LTRDKKFQRYL ARVT-----
HsNTPDase5 VCS----- ----AVSHR NQQTWFEGIF LSS-----
HsNTPDase6 VAYPLGLCVG VFIYVAYIKW HRATATQAFF SITRAAPGAR WGQQA----
HsNTPDase7 ISCLLLLMLI IDFRHWSASL PRDRQYERYL ARVG-----
HsNTPDase8 SRKE----- -QVFLALLGA SGVSGLTALI LLL-----
RnNTPDase2 KLVS----- ----LVPPLL LAAAGLTGLL LLC-----
TcNTPDase  GLMRNRNTLM LQSVVECKKE LELLKENGRG AVTLALQLDR LTKERQFYMD
LbNTPDase2 -----
rET-NTPDas -----MG- -SSHHHHHHS SG----- -LVPR-----
rNSL-NTPDa  -----MG- -SSHHHHHHS SG----- -LVPR-----
LmNTPDase2 -----MRP YSSVRRMTQQ SKRLRVASTL VLSALVIFGF LVYHQ-----
LaeNTPDase -----MRP YSSVRRMTQQ SKRLRVAGTL VLSALVVFGF LVYHQ-----
LaNTPDase2 -----MRP YSSVRRMTQQ SKRLRVAGTL VLSALVLFGE VVYHK-----
LtNTPDase2 -----MRP YSSVRRMTQQ SKRLRVASTL VLSALVIFGF LVYHQ-----
LiNTPDase2 -----MRP YSSVRRMTQQ SKRLRIAGTL VLSALVIFGF LVYYQ-----
LmxNTPDase -----MRP YSSVRRMTQQ SKRLRVAGTL VLSVLFVFGF IVYHK-----
LpNTPDase2 -----MRP YSSVRRMTQQ SNRLRVIGAL VLSAFVLFGE VIYSE-----
LdNTPDase2 -----MRP YSSVRRMTQQ SKRLRIAGTL VLSALVIFGF LVYYQ-----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      160      170      180      190      200
HsNTPDase1 -----LT QN-KALPENV
HsNTPDase2 -----VP TRDVREPPAL
HsNTPDase3 -----QI HKQEVLPPLG
HsNTPDase4 -----DI EATDTNPNV
HsNTPDase5 -----MCP INVSAS---T
HsNTPDase6 -----HSP LGTAADGHEV
HsNTPDase7 -----EL EATDTEDPNL
HsNTPDase8 -----VE ATSVLLPTDI
RnNTPDase2 -----VP TQDVREPPAL
TcNTPDase  AIAVVGSSD VGRRQTADV AAIAKEFDEW EDAAQNKTEL LTNCNNAMR-
LbNTPDase2 ----- -SPCNSPYSN
rET-NTPDas -----GSH MSPCNSPYSN
rNSL-NTPDa  -----GSH MSPCNSPYSN
LmNTPDase2 -----SPL FSPCDSAYAN
LaeNTPDase -----SPL FSPCDSAYAN
LaNTPDase2 -----SPL FSPCDSAYAN
LtNTPDase2 -----SPL FSPCDSAYAN
LiNTPDase2 -----SPL LSPCDSAYAN
LmxNTPDase -----SPL FSPCDSAYAN
LpNTPDase2 -----SPW LSPCNSPYSN
LdNTPDase2 -----SPL LSPCDSAYAN

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      210      220      230      240      250
HsNTPDase1 KYGIVLDAGS SHTSLYIYKW PAEKEND--- ----TGvvHQVEEC

```

HsNTPDase2	KYGIVLDAGS	SHTSMFIYKW	PADKEND---	-----	TGIVGQHSSC
HsNTPDase3	KYGIVLDAGS	SRTTVVYVYQW	PAEKENN---	-----	TGVVVSQTFKC
HsNTPDase4	NYGIVVDCGS	SGSRVVFVYCW	PRHNGNP---	--HDLLDIRQ	MRDKNRKPVV
HsNTPDase5	LYGIMFDAGS	TGTRIHVYTF	VQKMPGQ---	-----	-LPILEGEVVF
HsNTPDase6	FYGIMFDAGS	TGTRVHVVFQF	TR-PPRE---	-----	-TPTLTHETF
HsNTPDase7	NYGLVVDCGS	SGSRIFVYFW	PRHNGNP---	--HDLLDIKQ	MRDRNSQPVV
HsNTPDase8	KFGIVFDAGS	SHTSLFLYQW	LANKENG---	-----	TGVVVSQALAC
RnNTPDase2	KYGIVLDAGS	SHTSMFVYKW	PADKEND---	-----	TGIVGQHSSC
TcNTPDase	RYSIVFDAGS	TGSRVHVFRY	NLTSTPHAGN	FSWNGTRPSL	TSFLRLDDEL
LbNTPDase2	VYDIVIDAGS	TGSRVHVVFQY	ERSS-----	-----	TGVILLRERF
rET-NTPDas	VYDIVIDAGS	TGSRVHVVFQY	ERSS-----	-----	TGVILLRERF
rNSL-NTPDa	VYDIVIDAGS	TGSRVHVVFQY	ERSS-----	-----	TGVILLRERF
LmNTPDase2	VYDVVIDAGS	TGSRVHVVFQY	ERGR-----	-----	TGFVLLRERF
LaeNTPDase	VYDVVIDAGS	TGSRVHVFRY	ERGH-----	-----	TGIVLLRERF
LaNTPDase2	VYDIVIDAGS	TGSRVHVVFQY	ERSR-----	-----	TGVVLLKERF
LtNTPDase2	VYDVVIDAGS	TGSRVHVVFQY	ERGR-----	-----	TGIALLRERF
LiNTPDase2	VYDVVIDAGS	TGSRVHVVFQY	ERGR-----	-----	TGLVLLRERF
LmxNTPDase	VYDIVIDAGS	TGSRVHVVFQY	ERSR-----	-----	TGVVLLKERF
LpNTPDase2	VYDIVIDAGS	TGSRVHVVFQY	ERSS-----	-----	TGVILLRERF
LdNTPDase2	VYDVVIDAGS	TGSRVHVVFQY	ERGR-----	-----	TGLVLLRERF

	260	270	280	290	300
HsNTPDase1	RVKGGPISKF	VQKVNEIGIY	LTDCMERARE	VIPRSQHQET	PVYLGATAGM
HsNTPDase2	DVPGGGISSY	ADNPSGASQS	LVGCLEQALQ	DVPKERHAGT	PLYLGATAGM
HsNTPDase3	SVKGGSGISSY	GNNPQDVPR	FEECMQKVKG	QVPSHLHGST	PIHLGATAGM
HsNTPDase4	MKIKPGISEF	ATSPEKVSDY	ISPLLNFAAE	HVPRAKHKET	PLYILCTAGM
HsNTPDase5	DSVKPGLSAF	VDQPKQGAET	VQGLLEVAKD	SIPRSHWKAT	PVVLKATAGL
HsNTPDase6	KALKPGLSAY	ADDVEKSAQ	IRELLDVAKQ	DIPDFWKAT	PLVVKATAGL
HsNTPDase7	KKIKPGISAM	ADTPEHASDY	LRPLLSFAAA	HVPVKKHKET	PLYILCTAGM
HsNTPDase8	QVEGPGISSY	TSNAAQAGES	LQGCLEEALV	LIPEAQHRKT	PTFLGATAGM
RnNTPDase2	DVQGGGISSY	ANDPSKAGQS	LVRCLEQALR	DVPRDRHAST	PLYLGATAGM
TcNTPDase	FVENYEPLSG	LANPNDAVAS	LSPLIEAACA	YIPESLHACV	PIEMKATAGL
LbNTPDase2	KRIEPLSSSF	ATDQEGAKQS	LAGLLRFAEK	AVPRSYQRCT	SVTLKATAGL
rET-NTPDas	KRIEPLSSSF	ATDQEGAKQS	LAGLLRFAEK	AVPRSYQRCT	SVTLKATAGL
rNSL-NTPDa	KRIEPLSSSF	ATDPEGAKQS	LAGLLRFAEK	AVPRSYQRCT	FVTLKATAGL
LmNTPDase2	KRAEPLSSSF	ATDLGAKAS	LEGLLRFADT	VVPQSYQKCT	SVTLKATAGL
LaeNTPDase	KRVEPGLSSSF	ATDPDGAKES	LAGLLRFADT	VVPQSYQKCT	SVTLKATAGL
LaNTPDase2	KRIEPLSSSF	ATDPDGAKES	LTGLLRFADT	VVPESYQRCT	SVTLKATAGL
LtNTPDase2	KRVEPGLSSSF	ATDPDGAKES	LAGLLLRFADT	VVPQSYQKCT	SVTLKATAGL
LiNTPDase2	KRVEPGLSSSF	ATDPDGAKES	LAGLLRFADK	VVPQSYQKCT	FVTLKATAGL
LmxNTPDase	KRIEPLSSSF	TTDPDGAKES	LTGLLRFADT	VVPESYQRCT	SVTLKATAGL
LpNTPDase2	KRIEPLSSSF	ATDPEGAKQS	LAGLLRFAEK	AVPQSYQRCT	SVTLKATAGL
LdNTPDase2	KRVEPGLSSSF	ATDPDGAKES	LAGLLRFADK	VVPQSYQKCT	FVTLKATAGL

	310	320	330	340	350
HsNTPDase1	RLLRMESEEL	ADRVLDVVER	SLSNYPFDQ	----GARIIT	GQEEGAYGWI
HsNTPDase2	RLNLNLTNPEA	STSVLMAVTH	TLTQYPDFDR	----GARILS	GQEEGVFGWV
HsNTPDase3	RLRLQNETA	ANEVLESIQS	YFKSQPFDFR	----GAQIIS	GQEEGVYAWI
HsNTPDase4	RILP--ESQQ	KAILEDLLTD	IPVHFDLFLS	D--SHAEVIS	GKQEGVYAWI
HsNTPDase5	RLLP---EHK	AKALLFEVKE	IFRKSPLVLP	K--GSVIMD	GSDEGILAWV
HsNTPDase6	RLLP---GEK	AQKLLQKVKK	VFKASPLVVG	D--DCVIMN	GTDEGVSAWI
HsNTPDase7	RLLP--ERKQ	LAILADLVKD	LPLEFDLFLS	Q--SQAEVIS	GKQEGVYAWI
HsNTPDase8	RLLSRKNSSQ	ARDIFAAVTQ	VLGRSPVDFW	----GAELLA	GQAEAGFGWI
RnNTPDase2	RPFNLTSPEA	TARVLEAVTQ	TLTQYPDFDR	----GARILS	GQDEGVFGWV
TcNTPDase	RRIG---REH	AEAVLDVVR	LFARGPFWMQ	SELDVRIE	GWEEGPLAWL
LbNTPDase2	RLLP---EAD	QQVLLDAAQQ	TLKAFPFQSR	----GASIVS	GAQEGVYAWL
rET-NTPDas	RLLP---EAD	QQVLLDAAQQ	TLKAFPFQSR	----GASIVS	GAQEGVYAWL

rNSL-NTPDa	RLLP---EAD	QQVLLDAAQQ	TLKAFPFQSR	----GASIVS	GAQEGVYGWL
LmNTPDase2	RLLP---ESA	QQALLDVAQH	TLNASPFQSR	----GASIIIS	GAQEGVYGWL
LaeNTPDase	RLLP---ESV	QQVLLDAAQH	TLNASPFQSR	----GASIIIS	GAQEGVYGWL
LaNTPDase2	RLLP---ESD	QQVMLDAAQQ	ALNASPFQSR	----GASIIIS	GAQEGVYGWL
LtNTPDase2	RLLP---ESV	QQVLLDAAQH	TLNASPFQSR	----GASIIIS	GAQEGVYGWL
LiNTPDase2	RLLP---ESV	QQVLLDAAQH	TLNASPFQSR	----GASIIIS	GAQEGVYGWL
LmxNTPDase	RLLP---ESD	QQVLLDAAQQ	ALNASPFQSR	----GASIIIS	GAQEGVYGWL
LpNTPDase2	RLLP---EAD	QQVLLDAAQQ	TLKAFPFQSR	----GASIVS	GAQEGVYGWL
LdNTPDase2	RLLP---ESV	QQVLLDAAQH	TLNASPFQSR	----GASIIIS	GAQEGVYGWL

....|....||....||....||....||....|

	360	370	380	390	400
HsNTPDase1	TINYLLGKFS	QKTRW-----	-----FSIVP	YETNNQETFG	ALDLGGASTQ
HsNTPDase2	TANYLLENFI	KYG-----	-----WVGRW	FRP-RKGTLG	AMDLGGASTQ
HsNTPDase3	TANYLMGNFL	EKN-----	-----LWHMW	VHPHGVETTG	ALDLGGASTQ
HsNTPDase4	GINFVLGRFE	HIEDDDEAVV	EVNIPGSESS	EAIVRKRTAG	ILDMGGVSTQ
HsNTPDase5	TVNFLTGQLH	GHRQ-----	-----	-----ETVG	TLDLGGASTQ
HsNTPDase6	TINFLTGSLK	TPGG-----	-----	-----SSVG	MLDLGGGSTQ
HsNTPDase7	GINFVLGRFD	HEDESDAEAT	QELAAG-----	-----RRRTVG	ILDMGGASLQ
HsNTPDase8	TVNYGLGTLV	KYS-----	-----FTGEW	IQPPEMLVG	ALDMGGASTQ
RnNTPDase2	TANYLLENFI	KYG-----	-----WVGRW	IRP-RKGTLG	AMDLGGASTQ
TcNTPDase	TVNYLLGALN	GDK-----	-----	-----NTAT	ILDLGGGSTQ
LbNTPDase2	TVNYLLNRLD	KEG-----	-----	-----ATVA	TIDMGGASTQ
rET-NTPDas	TVNYLLNRLD	KEG-----	-----	-----ATVA	TIDMGGASTQ
rNSL-NTPDa	TVNYLLSRLD	KEG-----	-----	-----ATVA	TIDMGGASTQ
LmNTPDase2	TVNYLLDRLD	TDV-----	-----	-----ATVA	TIDMGGASTQ
LaeNTPDase	TVNYLLDRLD	TDV-----	-----	-----ATVA	TIDMGGASTQ
LaNTPDase2	TVNYLLDRLD	TDV-----	-----	-----ATIA	TIDMGGASTQ
LtNTPDase2	TVNYLLDRLD	TDV-----	-----	-----ATVA	TIDMGGASTQ
LiNTPDase2	TVNYLLNRLD	TDV-----	-----	-----ATVA	TIDMGGASTQ
LmxNTPDase	TVNYLLDRLD	TDV-----	-----	-----ATIA	TIDMGGASTQ
LpNTPDase2	TVNYLLNRLD	KEG-----	-----	-----ATVA	TIDMGGASTQ
LdNTPDase2	TVNYLLNRLD	TDV-----	-----	-----ATVA	TIDMGGASTQ

....|....||....||....||....||....|

	410	420	430	440	450
HsNTPDase1	VTFVPQNO--	-----	--TIESPDNA	LQFRLYGKDY	NVYTHSFLCY
HsNTPDase2	ITFETTSP--	-----	--AEDRA-SE	VQLHLYGQHY	RVYTHSFLCY
HsNTPDase3	ISFVAGEK--	-----	--MDLNTSDI	MQVSLYGYVY	TLYTHSFQCY
HsNTPDase4	IAYEVPKTVS	FASSQQEEVA	KNLLAEFNLG	CDVHQTEHVY	RVYVATFLGF
HsNTPDase5	ITFLPQFEK-	-----	TLEQTPRGYL	TSFEMFNSTY	KLYTHSYLGF
HsNTPDase6	IAFLPRVEG-	-----	TLQASPPGYL	TALRMFNRTY	KLYSYSYGLL
HsNTPDase7	IAYEVPSTST	VLPKQEEAA	KILLAEFNLG	CDVQHTHEVY	RVYVTTFLGF
HsNTPDase8	ITFVPGGP--	-----	--ILDKS-TQ	ADFRLYGSDY	SVYTHSYLCF
RnNTPDase2	ITFETTSP--	-----	--SEDPG-NE	VHLRLYGQHY	RVYTHSFLCY
TcNTPDase	IVMHPSDP--	-----	KAIEAYAEFS	YALKVNGRSF	VVYQHSYEGN
LbNTPDase2	VVFETKFT--	-----	SGEWLPFNIA	HQLRTPKRTI	AMYQHSYGLL
rET-NTPDas	VVFETKFT--	-----	SGEWLPFNIA	HQLRTPKRTI	AMYQHSYGLL
rNSL-NTPDa	VVFETKFT--	-----	SGEWLPFNIA	HQLRTPKRTI	AMYQHSYGLL
LmNTPDase2	VVFETTPT--	-----	SGEWLPFNIA	YQLRTPKRTI	AMYQHSYGLL
LaeNTPDase	VVFETTPT--	-----	SGEWLPFNIA	HQLRTPKRTI	AMYQHSYGLL
LaNTPDase2	VVFETTPT--	-----	SGEWLPFNIA	HQLRILKRTI	SVYQHSYGLL
LtNTPDase2	VVFETAPT--	-----	SGEWLPFNIA	HQLRTPKRTI	AMYQHSYGLL
LiNTPDase2	VVFETTPT--	-----	SGEWLPFNIA	HQLRTPKRTI	TMYQHSYGLL
LmxNTPDase	VVFETTPT--	-----	SGEWLPFNIA	HQLRIPKRTI	SVYQHSYGLL
LpNTPDase2	VVFETKFT--	-----	SGEWLPFNIA	HQLRTPKRTI	AMYQHSYGLL
LdNTPDase2	VVFETTPT--	-----	SGEWLPFNIA	HQLRTPKRTI	TMYQHSYGLL

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                460           470           480           490           500
HsNTPDase1  GKDQALWQKL AKDIQVASNE -----
HsNTPDase2  GRDQVLQRL  ASALQTHG-- -----
HsNTPDase3  GRNEAEKKFL AMLLQNSPTK N-----
HsNTPDase4  GGNAARQRYE DRIFANTIQ- -----
HsNTPDase5  GLKAARL  ATL  GALETEGT-- -----
HsNTPDase6  GLMSARL  AIL  GGVEGQPAK- -----
HsNTPDase7  GGNFARQRYE DLVLNETLN- -----
HsNTPDase8  GRDQMLSRL  LL  VGLVQSRPAA -----
RnNTPDase2  GRDQILLRLL ASALQIHR-- -----
TcNTPDase2  GLHAAKEQLL QAVAANN  TGA  NSKVQEANKI  ATGTEATPGA  SADVAVD  AAFP
LbNTPDase2  GLNEAKK  TLM  TLFAKVNG-- -----
rET-NTPDas  GLNEAKK  TLM  TLFAKVNG-- -----
rNSL-NTPDa  GLNEAKK  TLM  TLFAKVNG-- -----
LmNTPDase2  GMNEAKK  RLM  TLF  AEANG-- -----
LaeNTPDase  GMNEAKK  KLM  TSFAEANG-- -----
LaNTPDase2  GMNEAKK  KLM  TLF  AEANG-- -----
LtNTPDase2  GMNEAKK  KLM  TSFAEANG-- -----
LiNTPDase2  GMNEAKK  KLM  MSFAEANG-- -----
LmxNTPDase  GMNEAKK  KLM  TLF  AEANG-- -----
LpNTPDase2  GLNEAKK  TLM  TLFAKVNG-- -----
LdNTPDase2  GMNEAKK  KLM  MSFAEANG-- -----

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                510           520           530           540           550
HsNTPDase1  CFHPGYKKV  V  NVSDLYK  TPC  TKRFEM  TLP- -FQQFEIQGI  GNYQQCHQSI
HsNTPDase2  CWPRGFSTQ  V  LLGDVYQ  SPC  TMAQR  PQNFN  SSARVSLSGS  SDPHLCRD  LV
HsNTPDase3  CYP  RDYSISF  TMGHVFD  SLC  TVDQR  PESYN  PNDVITFEGT  GDP  SLCKEKV
HsNTPDase4  GKQ  TGLTPDM  PYLD  PCLPLD  IKDEIQ  QNG- --QTIYLRGT  GDFDL  CRET  I
HsNTPDase5  CLPRWLEA  EAW  IFGGV  KYQYG  GNQ-----  EGE  VGFEP  CYAEV
HsNTPDase6  CLSPS  FKG  EW  EHA  EVTYRVS  GQK-----  AAA  SLHEL  CAARV
HsNTPDase7  GQKT  GLSPDN  PFLD  PCLPVG  LTDV  VVERNS- --QVLHVRGR  GDWV  SCGAML
HsNTPDase8  CYLSG  YQTTL  ALG  PLYESPC  VHAT  PPLSL- -PQNL  TVEGT  GNP  GACVSAI
RnNTPDase2  CWPK  GYSTQV  LLQ  EVYQSPC  TMG  QRPRAFN  GSAIV  SLSGT  SNAT  LCRDLV
TcNTPDase  CF  PKGYVHTE  TGIS  NTRDGG  KVP-----  SME  ECSAL  FRRHV
LbNTPDase2  CF  PRRHTEHL  NGV  ELR--NG  DST-----  DFD  VCVN  LFREHV
rET-NTPDas  CF  PRRHTEHL  NGV  ELR--NG  DST-----  DFD  VCVN  LFREHV
rNSL-NTPDa  CF  PRRHTEHL  NGV  ELR--NG  DST-----  DFD  VCVN  LFREHV
LmNTPDase2  CF  PRGYTKRV  NGV  ELR--NS  DAT-----  DFN  ACAG  LFREHV
LaeNTPDase  CF  PRGYTKRL  NDV  ELR--NS  DAT-----  DFD  ACAG  LFREHV
LaNTPDase2  CF  PRGYTKHL  NDV  KLR--NN  DAT-----  DFD  ACV  GLFREHV
LtNTPDase2  CF  PRGYTKRL  NDV  ELR--NS  DAT-----  DFD  ACAG  LFREHV
LiNTPDase2  CF  PRGYAKRL  NDV  ELR--NS  DAT-----  DFD  ACAG  LFREHV
LmxNTPDase  CF  PRGYTKHL  NGV  ELR--NS  DAT-----  DFD  ACV  GLFREHV
LpNTPDase2  CF  PRGHTEHL  NGV  ELR--NG  DST-----  DFD  VCVN  LFREHV
LdNTPDase2  CF  PRGYAKRL  NDV  ELR--NS  DAT-----  DFD  ACAG  LFHEHV

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                560           570           580           590           600
HsNTPDase1  LELFN  TSYCP  -YSQCAF  NGI  FL  PPLQGD-- --FGAF  SAFY  FVMK  FLN--L
HsNTPDase2  SGLF  SFSSCP  -FSRCS  FNGV  FQ  PPVAGN-- --FVA  FSAFF  YTV  DFLR--T
HsNTPDase3  ASIF  DFKACH  DQET  CSFDGV  YQ  PKIKGP-- --FVA  FAGFY  YTAS  ALN--L
HsNTPDase4  QPF  MNK---T  NETQ  TSLNGV  YQ  PPIHFQ-N  SEFY  GFSEFY  YCTEDV----
HsNTPDase5  LRV  VR-----  -----G  KL  HQ  PEEVQR--  GSFY  AFSYYY  DRAV  DTD  MID
HsNTPDase6  SEVLQ-----  -----N  RV  HR  TEEVKH--  VDFY  AFSYYY  DLAAG  VGLID
HsNTPDase7  SP  LLAR---S  NTSQ  ASLNGI  YQ  SPIDFN-N  SEFY  GFSEFF  YCTEDV----
HsNTPDase8  RELFN  FSSCQ  GQED  CAFDGV  YQ  PPLRGQ-- --FYA  FSNFY  YTFH  FLN--L
RnNTPDase2  SRLFN  ISSCP  -FSQ  CSFNGV  FQ  PPVAGN-- --FIA  FSAFY  YTV  DFLT--T

```

TcNTPDase	VRKHQP---C	VSNSCGFNGV	FQPDISAVPM	VPVYAFSFFY	DRLKPY----
LbNTPDase2	ITKPI----C	RFDACGARGV	PQPPLPSK-Q	HPIYAFSFFY	DRLYHF-----
rET-NTPDas	ITKPI----C	RFDACGARGV	PQPPLPSK-Q	HPIYAFSFFY	DRLYHF-----
rNSL-NTPDa	ITKPI----C	RFDACGARGV	PQPPLPSK-Q	HPIYAFSFFY	DRLYHF-----
LmNTPDase2	ITTST----C	KFDACGARGV	PQPLFPSR-R	HPIYAFSFFY	NRLYDF-----
LaeNTPDase	ITTST----C	KFDACGARGV	PQPLFPSR-R	HPIYAFSFFY	DRLYHF-----
LaNTPDase2	ITTST----C	RFDACGARGV	PQPLFPSR-R	HPVYAFSFFY	DRLYHF-----
LtNTPDase2	ITTST----C	KFDACGARGV	PQPLFPSR-R	HPIYAFSFFY	DRLYHF-----
LiNTPDase2	ITKTT----C	KFDACGARGV	PQPLFPSR-R	HLIYAFSFFY	DRLYHF-----
LmxNTPDase	ITTAT----C	RFDACGARGV	PQPLFPSR-R	HPVYAFSFFY	DRLYHF-----
LpNTPDase2	ITKPI----C	RFDACGARGV	PQPPLPSK-Q	HPIYAFSFFY	DRLYHF-----
LdNTPDase2	ITKTT----C	KFDACGARGV	PQPLFPSR-R	HLIYAFSFFY	DRLYHF-----

....|....||....||....||....||....|

	610	620	630	640	650
HsNTPDase1	TSEKVS--QE	KVTEMMKKFC	AQP-----W	EEIKTSYAGV	KEKYLSEYCF
HsNTPDase2	SMGLPVATLQ	QLEAAAVNVC	NQT-----W	AQLQARVPG-	QRARLADYCA
HsNTPDase3	SGSFS---LD	TFNSSTWNFC	SQN-----W	SQLPLLLPKF	DEVYARSYCF
HsNTPDase4	LRMGGDYNAA	KFTKAAKDYC	ATKWSILRER	FDRGLYASHA	DLHRLKYQCF
HsNTPDase5	YEKGGILKVE	DFERKAREVC	D-----	-----NLEN	FTSGSPFLCM
HsNTPDase6	AEKGGSLVVG	DFEIAAKYVC	R-----	-----TLET	QPQSSPFSCM
HsNTPDase7	LRIGGRYHGP	TFAKAAQDYC	GMAWSVLTQR	FKNGLFSSHA	DEHRLKYQCF
HsNTPDase8	TSRQP---LS	TVNATIWEFC	QRP-----W	KLVEASYPG-	QDRWLRDYCA
RnNTPDase2	VMGLPVGTLK	QLEEATEITC	NQT-----W	TELQARVPG-	QKTRLADYCA
TcNTPDase	IKD-EVIRVQ	DVLDIASQVC	RSMK-SVREL	LEQNDTKKNK	GSLKPEMECF
LbNTPDase2	RSEGFVYVS	SYKELGREVC	Q-----	----RESADH	TTTPKETTCM
rET-NTPDas	RSEGFVYVS	SYKELGREVC	Q-----	----RESADH	TTTPKETTCM
rNSL-NTPDa	RSEGFVYVS	SYKELGREVC	Q-----	----RESADH	TTTPKETACM
LmNTPDase2	LKEGSQVYVS	SYKEVGQEV	H-----	----RESARR	TTAPEETACM
LaeNTPDase	RKEGGPVYVS	SYKEVGQEV	H-----	----RESARR	TTAPEETACM
LaNTPDase2	HKEGRPVYVS	LYKEVGKEVC	H-----	----RESASR	ATTPEETACM
LtNTPDase2	RKEGSPVYVS	SYKEVGREVC	H-----	----RESARQ	TTAPEETACM
LiNTPDase2	SKEGSPVYVS	SYKEVGQEV	H-----	----RESARR	TTAPEETACM
LmxNTPDase	HKEGRPVYVS	LYKEVGKEVC	H-----	----RESASR	ATTPEETACM
LpNTPDase2	RSEGFVYVS	SYKELGREVC	Q-----	----RESADQ	TTTPKETACM
LdNTPDase2	SKEGSPVYVS	SYKEVGQEV	H-----	----RESARR	TTAPEETACM

....|....||....||....||....||....|

	660	670	680	690	700
HsNTPDase1	SGTYILSLLL	QGYHFTADSW	EHIFFIGKIQ	GSDAGWTLGY	MLNLTNMI PA
HsNTPDase2	GAMFVQQLLS	RGYGFDERAF	GGVIFQKKA	DTAVGWALGY	MLNLTNLI PA
HsNTPDase3	SANYIYHLFV	NGYKFTEETW	PQIHFEKEVG	NSSIAWSLGY	MLSLTNQI PA
HsNTPDase4	KSAWMFEV FH	RGFSFPVN-Y	KSLKTALQVY	DKEVQWTLGA	ILYRTRFLPL
HsNTPDase5	DLSYITALLK	DGFGFADS--	TVLQLTKKVN	NIETGWALGA	TFHLLQSLGI
HsNTPDase6	DLTYVSLLLQ	E-FGFPRS--	KVLKLRKID	NVETSWALGA	IFHYIDSLNR
HsNTPDase7	KSAWMYQVLH	EGFHFPYD-Y	PNLRTAQLVY	DREVQWTLGA	ILYKTRFLPL
HsNTPDase8	SGLYILTLLH	EGYGFSEETW	PSLEFRKQAG	GVDIGWTLGY	MLNLTGMI PA
RnNTPDase2	VAMFIHQLLS	RGYHFDERSF	REVVFQKKA	DTAVGWALGY	MLNLTNLI PA
TcNTPDase	ELSYLFTLLR	YGFGFPE--	QKLHIAKKIN	GFETAWALGA	SLVSLEGQSA
LbNTPDase2	ELAYLYSFLT	HGLGLSDD--	RTLEVPNRIE	GIAVSWSLGC	SLSFVLKMEI
rET-NTPDas	ELAYLYSFLT	HGLGLSDD--	RTLEVPNRIE	GIAVSWSLGC	SLSFVLKME-
rNSL-NTPDa	ELAYLYSFLT	HGLGLSDD--	RTLEVPNRIE	GIAVSWSLGC	SLSFVLKME-
LmNTPDase2	ELAYMYSFLT	YGLGLSDA--	TVLTVPNRIE	GMAVSWSLGS	SLSFLLKME-
LaeNTPDase	ELAYMYSFLT	YGLGLSDA--	TALTVPNRIK	GMAVSWCLGS	SLSFLLKME-
LaNTPDase2	ELAYLYSFLT	NGLGLGDD--	TALTVPNRIA	GMSVSWSLGS	SLSFLLKME-
LtNTPDase2	ELAYMYSFLT	YGLGLSDA--	TALTVPNRIE	GMAVSWSLGS	SLSFLLKME-
LiNTPDase2	ELAYMYSFLT	YGLGLSDA--	TALTVPNRIE	GMAVSWSLGS	SLSFLLKME-
LmxNTPDase	ELAYLYSFLT	NGLGLGDD--	TALTVPNRIA	GMSVSWSLGS	SLSFLLKME-
LpNTPDase2	ELAYLYSFLT	HGLGLSDD--	RTLEVPNRIE	GIAVSWSLGC	SLSFVLMME-

LdNTPDase2 ELAYMYSFLT YGLGLSDA-- TALTVPNRIE GMAVSWSLGS SLSFLLKME-

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 710 720 730 740 750

HsNTPDase1	EQPLSTPLSH	STYVFLMVLV	SL-----	-VLFTVAIIG	LLIFHKPSYF
HsNTPDase2	DPP-GLRKGT	DFSSWVLLL	LF-----	-ASALLAALV	LLLRQVHSAK
HsNTPDase3	ESP-LIRLPI	EPPVFGVTLA	FF-----	-TAAALLCLA	FLAYLCSATR
HsNTPDase4	RDIQQEAFRA	SHTHWRGVSF	VYNHYLFSGC	FLVVLLAILL	YLLRLRRIHR
HsNTPDase5	SH-----	-----	-----	-----	-----
HsNTPDase6	QKSPAS----	-----	-----	-----	-----
HsNTPDase7	RDLRQEGVRQ	AHGSWFRLSF	VYNHYLFFAC	ILVVLLAIFL	YLLRLRRIHH
HsNTPDase8	DAP-AQWRAE	SYGVVAKVV	FM-----	-VLALVAVVG	AALVQ---LF
RnNTPDase2	DLP-GLRKGT	HFSSWVALLL	LF-----	-TVLILAALV	LLLRQVRSK
TcNTPDase	-----	-----	-----	-----	-----
LbNTPDase2	-----	-----	-----	-----	-----
rET-NTPDas	-----	-----	-----	-----	-----
rNSL-NTPDa	-----	-----	-----	-----	-----
LmNTPDase2	-----	-----	-----	-----	-----
LaeNTPDase	-----	-----	-----	-----	-----
LaNTPDase2	-----	-----	-----	-----	-----
LtNTPDase2	-----	-----	-----	-----	-----
LiNTPDase2	-----	-----	-----	-----	-----
LmxNTPDase	-----	-----	-----	-----	-----
LpNTPDase2	-----	-----	-----	-----	-----
LdNTPDase2	-----	-----	-----	-----	-----

.....|.....||.....||...
 760 770

HsNTPDase1	WKDMV-----	-----	-----
HsNTPDase2	LPSTIL----	-----	-----
HsNTPDase3	RKRHSEHAFD	HAVDSD----	-----
HsNTPDase4	RTPRSSS-AA	ALWMEEGLPA	QNAPGTLP
HsNTPDase5	-----	-----	-----
HsNTPDase6	-----	-----	-----
HsNTPDase7	RQTRASAPLD	LLWLLEEVVPM	MGVQVGP-
HsNTPDase8	WLQDD-----	-----	-----
RnNTPDase2	SPGALD----	-----	-----
TcNTPDase	-----	-----	-----
LbNTPDase2	-----	-----	-----
rET-NTPDas	-----	-----	-----
rNSL-NTPDa	-----	-----	-----
LmNTPDase2	-----	-----	-----
LaeNTPDase	-----	-----	-----
LaNTPDase2	-----	-----	-----
LtNTPDase2	-----	-----	-----
LiNTPDase2	-----	-----	-----
LmxNTPDase	-----	-----	-----
LpNTPDase2	-----	-----	-----
LdNTPDase2	-----	-----	-----

CAPÍTULO 2

NTPDase2 DE *Leishmania (Viannia) braziliensis*: EXPRESSÃO HETERÓLOGA, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ANÁLISE DE INIBIDORES DERIVADOS DA QUERCETINA

RESUMO

Leishmania (Viannia) braziliensis é um protozoário patogênico causador de Leishmaniose Tegumentar Americana. Esta doença apresenta diversidade de manifestações clínicas que são associadas também à diferentes isolados do parasito. Os tratamentos não são sempre efetivos e apresentam efeitos adversos, sendo necessário o desenvolvimento de novas terapias. A literatura apresenta a correlação entre atividade ectonucleotidásica e virulência em diferentes espécies de *Leishmania*, apontando a importância das NTPDases como fatores de virulência do parasito. Neste trabalho nós estudamos a rLbNTPDase2 (45 KDa) de *L. (V.) braziliensis* com o objetivo de compreender suas características bioquímicas. Também, avaliamos o potencial de inibição de compostos derivados da quercetina na atividade enzimática. A sequência do ectodomínio da LbNTPDase2 (S43-E425) fusionada à cauda de histidina foi expressa em sistema bacteriano e a proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade a níquel. Nossos resultados mostram que a rLbNTPDase2 é uma verdadeira apirase que hidrolisa nucleotídeos tri e difosfatados na dependência de cátions divalentes como cálcio e magnésio. Em condições de excesso de substrato, a enzima recombinante exibe preferência para hidrólise de nucleotídeo difosfatados e baixa taxa de hidrólise de nucleotídeos trifosfatados de acordo com a ordem UDP>GDP>ADP>GTP>ATP=UTP. A atividade ótima foi determinada em pH de neutro a básico e foi parcialmente inibida por suramina e DIDS. Altos valores de K_m para ATP, ADP e UDP indicam que seja improvável sua atuação na desativação de receptores purinérgicos, contudo, sugerimos que a enzima possa mediar respostas pela contribuição na geração de adenosina. Além disso, sugerimos que seu papel seja relevante no ambiente intracelular, que apresenta maiores concentrações de nucleotídeos, desempenhando importantes funções no parasito ou na forma amastigota no hospedeiro. Os compostos, IL-09 e IL-05, derivados não naturais da quercetina, inibiram a atividade enzimática em 92,88% e 88,41% na presença de alta concentração de substrato, indicando que o substrato não seja determinante para modular a interação com o inibidor. Juntamente com o baixo valor de IC_{50} para o IL-09 (6.56 μ M), esses resultados indicam uma alta afinidade do composto com a enzima. Essa ideia é reforçada pelos dados cinéticos na presença de IL-09, que indicam um perfil de inibição do tipo misto. Sua composição química sugere que a presença de benzilas nos grupamentos

fenólicos possa ser determinante para alta afinidade de interação do composto. Estudos de dinâmica molecular devem ser realizados a fim de elucidar as interações do composto IL-09 na estrutura da enzima. Uma vez que as NTPDases são conhecidos fatores de virulência em *Leishmania*, nossos dados podem fornecer informações que possibilitem o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose tegumentar.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*; NTPDase2; caracterização bioquímica; inibidores.

ABSTRACT

Leishmania (Viannia) braziliensis is a pathogenic protozoan parasite that causes American Tegumentary Leishmaniasis. This disease presents a diversity of clinical manifestations that are associated with different isolates of the parasite. Treatments are not always effective and present adverse effects, requiring the development of new therapies. The literature presents a correlation between ectonucleotidase activity and virulence in different *Leishmania* species, pointing out the importance of NTPDases as parasite's virulence factors. In this work we study the rLbNTPDase2 (45 KDa) of *Leishmania (Viannia) braziliensis*, in order to understand its biochemical features. Also, we evaluated the inhibition potential of quercetin derivative compounds in enzymatic activity. The LbNTPDase2 ectodomain sequence (S43-425E) fused with histidine tag was expressed in bacterial system and the recombinant protein was purified by nickel affinity chromatography. Our results show that rLbNTPDase2 is a true apyrase since it hydrolyzes tri and diphosphate nucleosides and is dependent on divalent cations, such as calcium and magnesium. Under conditions of excess of substrate, the recombinant enzyme exhibits a preference for hydrolysis of diphosphate nucleotides and a low rate of hydrolysis of triphosphate nucleotides according to the order UDP>GDP>ADP>GTP>ATP=UTP. Optimal activity was determined at neutral to basic pH and was inhibited by suramina and DIDS. High K_m for ATP, ADP and UDP suggests unlikely role in the deactivation of purinergic receptors. However, the enzyme may act in mediating responses via adenosine generation. In addition, we suggest relevant role in the intracellular environment, which has high nucleotide concentration, playing important roles in the parasite or in the amastigote form in the host. The compounds IL-09 and IL-05, quercetin non-natural derivative compounds, inhibited the enzymatic activity by 92,88% and 88,41% in the presence of high substrate concentration, indicating that substrate may not be determinant to modulate the interaction with the inhibitor. Along with low IC_{50} value for IL-09 (6.56 μ M), this results indicate a high affinity of the compound for the enzyme. This idea is reinforced by the kinetic data in the presence of IL-09 compound, which indicate a mixed-type inhibition profile. Its chemical composition suggests that the benzil on the phenolic groups may be determinant for the high affinity interaction of the compound. Molecular dynamics studies must be carried out in order to elucidate the interactions of the IL-09 compound in the enzyme structure. Since NTPDases are known virulence factors in *Leishmania*, our data may provide information that enable the development of new drugs for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania braziliensis*; NTPDase2; biochemical characterization; quercetin.

1. INTRODUÇÃO

Leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas pela picada de fêmeas de insetos flebotomíneos. Consideradas doenças negligenciadas, são um importante problema de saúde pública que afeta cerca de 700.000 a 1 milhão de pessoas por ano no mundo (WHO, 2021).

A primeira linha de tratamentos envolve o uso de antimoniais pentavalentes, anfotericina B, paromicina e miltefosina. Apesar de serem efetivos na morte do parasita, esses tratamentos apresentam muitos efeitos adversos e não são sempre efetivos para as formas mais severas da doença, sendo necessária a busca por novas abordagens (NOVAIS; AMORIM; SCOTT, 2021; VOLPEDO et al., 2021).

Leishmanioses apresentam um espectro de manifestações clínicas, podendo apresentar-se na forma visceral (VL) e em diferentes formas tegumentares como cutânea localizada (LCL), mucosa (ML), recidiva (RL), difusa (ADCL), disseminada (DL) e pós calazar (PKDL) (VOLPEDO et al., 2021).

L. (V.) braziliensis é o principal agente causador da leishmaniose tegumentar no Brasil e causa uma variedade de manifestações clínicas, desde lesões ulcerosas únicas a lesões com destruição progressiva de mucosas (PIRMEZ, 1992).

Virulência e atividade ectonucleotidásica têm sido relacionadas ao longo dos anos (BERRÊDO-PINHO et al., 2001; GOMES et al., 2015; LEITE et al., 2012; MAIOLI et al., 2004; MARQUES-DA-SILVA et al., 2008). Além disso, a hidrólise de nucleotídeos extracelulares pode influenciar no estabelecimento da resposta imune e estar relacionada com o desenvolvimento para diferentes formas clínicas (LEITE et al., 2012).

No sistema purinérgico, nucleotídeos extracelulares desencadeiam respostas celulares pela interação com receptores purinérgicos. Os receptores são divididos em dois tipos: P1 e P2. Os receptores do tipo P1 (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3) são receptores acoplados à proteína G e respondem à ligação de adenosina. Os receptores do tipo P2 podem ser do tipo P2X ou P2Y. Os receptores P2X ($P2X_{1-7}$) são receptores do tipo canal e respondem primariamente ao ATP. Os receptores do tipo P2Y ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$, $P2Y_{14}$) são receptores acoplados a proteína G e se ligam a uma variedade de nucleotídeos (BOURS et al., 2006; BURNSTOCK, 2007).

Tratando-se especificamente da sinalização purinérgica no sistema imune, nucleotídeos extracelulares controlam diversos processos como ativação, migração e produção de mediadores inflamatórios (BOURS et al., 2006). Em situações como inflamação e injúria o ATP liberado no meio extracelular age como sinal de dano e atua na ativação de receptores

específicos direcionando a resposta imunológica (DOSCH et al., 2018). O receptor P2X₇ é o mais amplamente estudado no contexto imunológico. Sua ativação leva à liberação de grandes quantidades de ATP, produção de citocinas inflamatórias como IL-1 β e IL-18, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (SAVIO et al., 2018). Na infecção de macrófagos por parasitas como *Leishmania* e *T. gondii*, a ativação do receptor P2X₇ está relacionada ao controle da carga parasitária, com produção de leucotrieno B₄ (LTB₄) e ROS (CHAVES et al., 2014; CORRÊA et al., 2010).

No contexto da sinalização purinérgica é importante ressaltar a importância das NTPDases no controle desses processos, pela hidrólise de nucleotídeos extracelulares.

NTPDases (EC 3.6.1.5) são enzimas da superfamília GDA1_CD39 de nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (KNOWLES, 2011). Esta família compartilha 5 regiões conservadas de apirase (ACRs), cujas sequências possuem resíduos de aminoácidos essenciais à sua função. Estas enzimas hidrolisam nucleotídeos tri e difosfatados em nucleotídeos monofosfatados, na presença de cátions divalentes como cálcio e magnésio (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006; ZIMMERMANN, 2000; ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012). Seus papéis são bem estabelecidos em vertebrados, atuando em diversos processos como diferenciação, migração e proliferação celulares, inflamação e agregação plaquetária (CAO et al., 2020; CORRIDEN et al., 2008; JHANDIER et al., 2005; LANGSTON et al., 2003; MARCUS et al., 1997).

Ao longo dos anos têm sido identificadas e estudadas ENTPDases de diferentes parasitos como *Toxoplasma gondii* (ASAI et al., 1995; ASAI; O'SULLIVAN; TATIBANA, 1983), *Schistosoma mansoni* (VASCONCELOS et al., 1996), *Leishmania amazonenses* (BERRÊDO-PINHO et al., 2001; PAES-VIEIRA et al., 2021; PINHEIRO et al., 2006), *Trypanosoma cruzi* (FIETTO et al., 2004; MARIOTINI-MOURA et al., 2014), *Leishmania braziliensis* (PORCINO et al., 2012; REZENDE-SOARES et al., 2010), *Leishmania infantum* (VASCONCELLOS et al., 2014), *Leishmania major* (SANSOM et al., 2014) e *Plasmodium falciparum* (BORGES-PEREIRA et al., 2017).

Parasitas do gênero *Leishmania* são dependentes da aquisição de purinas pela via de salvação para suprir seus requerimentos metabólicos (MARR; BERENS; NELSON, 1978) e NTPDases têm sido sugeridas como importantes para a hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados neste processo (BERRÊDO-PINHO et al., 2001). Além disso, evidências apontam para a atuação de ectonucleotidases na relação parasita-hospedeiro, como na adesão do parasito à célula hospedeira (BISAGGIO et al., 2003; MARIOTINI-MOURA et al., 2014; PAES-VIEIRA et al., 2021; PINHEIRO et al., 2006; VASCONCELLOS et al., 2014) e na modulação

da resposta imune do hospedeiro pela hidrólise de nucleotídeos extracelulares como ATP e ADP (GOMES et al., 2015; LEITE et al., 2012; MAIOLI et al., 2004; MARQUES-DA-SILVA et al., 2008; PAES-VIEIRA et al., 2021).

Em *Leishmania* duas NTPDases são descritas (NTPDase1 com cerca de 70 kDa e NTPDase2 com cerca de 42 kDa) (FIETTO et al., 2004; VASCONCELLOS et al., 2014) e a isoforma (NTPDase2) tem sido mais estudada em diferentes espécies (DETONI et al., 2013; GOMES et al., 2015; MAIA et al., 2019; PORCINO et al., 2012; VASCONCELLOS et al., 2014).

A literatura reporta importantes informações acerca das ectonucleotidasas em *L. braziliensis*. Atividade de NTPDase foi identificada por citoquímica ultraestrutural demonstrando atividade ATP difosfohidrolase em formas promastigotas na superfície da membrana, flagelo, bolso flagelar, mitocôndria e cinetoplasto. O mesmo estudo utilizou anticorpos policlonais anti-apirase de batata e identificou duas bandas (48 KDa e 43 KDa) em preparações de promastigotas (REZENDE-SOARES et al., 2010). A isoforma menor (LbNTPDase2) possui um domínio B conservado, com capacidade antigênica, compartilhado entre apirase de batata e NTPDases de outros organismos (PORCINO et al., 2012). Anticorpos policlonais produzidos contra peptídeos sintéticos correspondentes ao domínio B da LbNTPDase-2 (LbB1LJ e LbB2LJ) são capazes de reconhecer as duas bandas da proteína (48 KDa e 43 KDa) em promastigotas e inibir parcialmente a atividade ATPásica e ADPásica (PORCINO et al., 2012). Ainda, esses anticorpos foram capazes de identificar a presença da proteína na membrana plasmática, bolso flagelar e flagelo, mitocôndria e cinetoplasto, como descrito anteriormente (REZENDE-SOARES et al., 2010) e também no núcleo e vesículas citoplasmáticas. Estes dados são compatíveis com a expressão e atividade da LbNTPDase2, mas, até o momento, a LbNTPDase2 não foi purificada ou teve a expressão e caracterização bioquímica completa da proteína isolada elucidada.

Quercetina é um composto que pertence ao grupo dos flavonoides, que são um conjunto de metabólitos de plantas que atuam em diversos processos biológicos como reprodução, coloração e proteção contra estresse (WINKEL-SHIRLEY, 2002). O papel da quercetina como composto antiparasitário e anti-inflamatório tem sido demonstrado em estudos com tripanossomatídeos (FONSECA-SILVA et al., 2011, 2013; MAMANI-MATSUDA et al., 2004; TASDEMIR et al., 2006). Na infecção por *Trypanosoma brucei gambiense*, óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) são mediadores relacionados ao controle do parasito, mas também à patologia no hospedeiro (MAGEZ et al., 1999; MAMANI-MATSUDA et al., 2004). Quercetina inibe a produção destes mediadores por macrófagos humanos ativados

e induz a apoptose de *T. gambiense* (MAMANI-MATSUDA et al., 2004). Adicionalmente, a quercetina esteve entre os melhores compostos testados contra amastigotas axênicos de *L. donovani* (TASDEMIR et al., 2006). Para promastigotas de *L. amazonenses* foi demonstrado o mecanismo de atividade leishmanicida, mostrando que a quercetina induz ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e causa disrupção do potencial de membrana mitocondrial, promovendo a morte do parasito (FONSECA-SILVA et al., 2011). Outro trabalho mostra que a quercetina leva à produção de ROS e inibe o crescimento de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* (FONSECA-SILVA et al., 2013).

Adicionalmente, o potencial da quercetina em influenciar a sinalização purinérgica tem sido demonstrado (BALDISSARELLI et al., 2016; ROCKENBACH et al., 2013). Na linhagem celular humana T24 de tumor de bexiga, quercetina tem um papel antiproliferativo pela inibição da atividade da enzima ecto-5'-ectonucleotidase (CD73) (ROCKENBACH et al., 2013). Também, a quercetina interfere nas atividades de NTPDase, 5'-nucleotidase e adenosina deaminase de plaquetas em modelo murino, reduzindo a agregação plaquetária e protegendo contra dano oxidativo (BALDISSARELLI et al., 2016).

O potencial de inibição de NTPDases de tripanosomatídeos por compostos derivados da quercetina tem sido investigado por nosso grupo de pesquisa. Em trabalhos recentes, foi demonstrada a ação de compostos sintéticos não naturais derivados da quercetina sobre a NTPDase1 recombinante de *Trypanosoma cruzi*, apontando-os como possíveis alvos de estudo para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da Doença de Chagas (MARIOTINI-MOURA, 2014; RIBEIRO, 2018).

Considerando que ENTPDases estão associadas a importantes papéis biológicos em *Leishmania* e são consideradas bons alvos potenciais para aplicações biotecnológicas contra as leishmanioses (DA SILVA et al., 2020; DE SOUZA et al., 2020), um profundo conhecimento acerca destas enzimas pode contribuir nesta área. Então, o objetivo deste trabalho consiste na expressão heteróloga e caracterização bioquímica da NTPDase2 recombinante de *L. (V.) braziliensis* e na avaliação do potencial de inibição de compostos glicosilados não naturais derivados da quercetina.

Esperamos que estes resultados possam contribuir para o conhecimento desta importante enzima e possam auxiliar no desenvolvimento futuro de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose cutânea.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar bioquimicamente a rLbNTPDase2 e avaliar o potencial de inibição de compostos derivados da quercetina.

2.2. Objetivos específicos

- Expressar a proteína recombinante em sistema bacteriano.
- Purificar a proteína por cromatografia de afinidade ao níquel.
- Avaliar a atividade enzimática quanto aos efeitos da temperatura, tempo, pH, dependência de cofator e substrato.
- Avaliar o efeito de inibidores de fosfatases, ATPases e ecto-ATPases na atividade ADPásica e/ou UDPásica.
- Determinar os parâmetros cinéticos de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para os nucleotídeos de adenosina e uridina.
- Avaliar a inibição da atividade pela quercetina e por seus derivados glicosilados não naturais IL-05, IL-06, IL-09, IL-18, IL-24 e IL-35-f1.
- Determinar o IC_{50} e o tipo de inibição do composto IL-09.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Alinhamento múltiplo de sequências

Alinhamento múltiplo de sequências foi feito no programa Clustal W usando o software MEGA X, versão 10.2.5. As sequências de NTPDases de parasitos e mamíferos foram obtidas em bancos de dados. TriTrypDB foi usado para as seguintes sequências: *L. braziliensis* (LbrM.15.0030), *L. major* (LmjF.15.0030), *L. infantum* (LINF_150005200), *L. amazonenses* (LAMA_000225600), *L. panamensis* (LPAL13_150005200), *L. donovani* (LdBPK_150030.1), *Leishmania aethiopica* (LAEL147_000207800), *Leishmania tropica* (LTRL590_150005200) and *Leishmania mexicana* (LmxM.15.0030). UniProtKB foi utilizado para NTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi* (Q6QHT8), NTPDase2 de *Rattus norvegicus* (O35795-1) e para NTPDases humanas NTPDase 1 (P49961), NTPDase 2 (Q9Y5L3-1) NTPDase 3 (O75355), NTPDase 4 (Q9Y227-1), NTPDase 5 (O75356), NTPDase 6 (O75354), NTPDase 7 (Q9NQZ7-1) e NTPDase 8 (Q5MY95-1). O alinhamento foi editado utilizando o software BioEdit versão 7.2.5 (HALL, 1999), para evidenciar as ACRs, que foram anotadas como descrito na literatura (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012).

3.2. Expressão heteróloga e purificação da rLbNTPDase2

A construção correspondente à NTPDase2 da cepa ET de *L. braziliensis*, que codifica para a proteína com sequência do ectodomínio idêntica à da ATP difosfohidrolase referência (LbrM.15.0030), foi transformada em células DH5-alpha competentes para amplificação do plasmídeo. Um volume de 1µL de plasmídeo foi adicionado a 100µL de DH5-alpha competentes e a mistura permaneceu no gelo por 30 minutos. Em seguida, foi realizado choque térmico à 42°C por 45 segundos, seguido de resfriamento no gelo por 2 minutos. À reação foi adicionado 900 µL de LB líquido e as células foram recuperadas à 37°C, 180 rpm por 45 minutos. Posteriormente, as células foram plaqueadas em meio LB sólido com canamicina na concentração final de 50 µg/mL, à 37°C, over night. As colônias obtidas foram crescidas em meio LB líquido com canamicina (50 µg/mL) à 37°C, 180 rpm por 12 a 16 horas e armazenadas a -80°C. Para expressão heteróloga a construção foi transformada em células *E. coli* BL21 (DE3) RIL competentes. Transformantes foram obtidos, como já descrito, e crescidos em meio LB com canamicina 50 µg/mL por 12 a 16 horas à 37 °C e 180 rpm. A cultura foi transferida para dois erlenmeyers, contendo 400 mL de meio cada e crescida nas mesmas condições até OD₆₀₀ = 0.6 – 0.8. Posteriormente, a expressão da proteína foi induzida com IPTG 0.2 mM por 2 horas, peletizada a 11.627 g por 10 minutos e estocada a -80 °C.

Para lise cada pellet correspondente à 400mL foi ressuscitado em 16 mL de tampão de lise (50 mM Tris; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol) e adicionados os inibidores de protease (Pepstatina A 1 µg/mL, Aprotinina 2 µg/mL, Leupeptina 2 µg/mL) e lisozima 1 mg/ml. A ressuspensão foi mantida à 4 °C por 30 minutos e sonicada à 30 Hz, por 2 minutos, em ciclos de 10 segundos, à 4°C. Tampão de lise foi adicionado até o volume final de 40 mL e as amostras foram centrifugadas à 11,627 g por 15 minutos. Foram realizadas duas lavagens com tampão de lise, seguidas de centrifugações à 11,627 g por 10 minutos. Os pellets contendo os corpos de inclusão foram ressuscitados em condições desnaturantes com 40 mL de tampão A (Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 500 mM, Imidazol 10 mM, Ureia 8 M), aquecidos à 50 °C por 20 minutos, e centrifugados a 20.000 g por 20 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados em membrana de poro 0,45 µm e estocados à -20 °C.

Posteriormente, 80 mL de solubilização contendo os corpos de inclusão foram purificados por cromatografia de afinidade à níquel utilizando o sistema Akta purifier FPLC (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ) e a coluna HisTrap FF crude 5mL para reconhecimento da His-tag N-terminal. Após a aplicação de metade do volume de amostra, foi feita lavagem com tampão A (até UV=0 ou 20 a 30 minutos), seguida de lavagem com 10% B por 20 minutos. Posteriormente foi aplicado o volume restante de amostra, seguido de lavagem

com tampão A (até UV=0 ou 20 a 30 minutos) e lavagem com 10% B por 20 minutos. Um passo adicional de lavagem 20% B por 20 minutos foi realizado e a proteína foi eluída com 100%B.

A pureza das amostras foi analisada por SDS-PAGE corado com coomassie ou prata e confirmadas por western blotting, como descrito por Sambrook e Russel (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). O western foi feito usando anticorpo monoclonal anti-His tag, produzido em camundongo, como anticorpo primário (SIGMA - H1029), na diluição de 1:5000 sob agitação por 1h e anticorpo policlonal anti-mouse IgG, produzido em coelho, conjugado com HRP, como anticorpo secundário (SIGMA - A9044), na diluição de 1:10.000 sob agitação por 1 h. A revelação foi feita utilizando 3, 3' diaminobenzidina (SIGMA-D8001) e peróxido de hidrogênio.

As amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A proteína foi renaturada por diluição 1:20 em tampão de renaturação (100 mM Tris, 600 mM NaCl, 1 mM GSSG, 2 mM GSH e 33% glicerol) e incubada à 4°C. A renaturação foi avaliada pela detecção de atividade ATPásica e ADPásica durante 5 dias. Atividade foi mensurada pelo método do verde malaquita para detecção de fosfato inorgânico (Pi) (EKMAN, PIA; JAGER, 1993), utilizando tampão Tris 50 mM, HEPES 50 mM, MgCl₂ 2.7 mM, CaCl₂ 2 mM, NaCl 116 mM e KCl 5.4 mM, adaptado de Barros e colaboradores (BARROS et al., 2000), 2.5 mM de ATP ou ADP como substratos, à 37°C, por 10 minutos de reação. Todas as reações foram pré-aquecidas à 37°C por 3 minutos, disparadas com 1µg de proteína e paradas pela adição de 0,2 M de HCl, seguida pela adição de reagente colorimétrico (1:3 v/v de verde malaquita 0.2 % e molibdato de amônio 10 %, diluídos previamente em HCL 4 M). As absorbâncias foram mensuradas à 660 nm e convertidas para nmol de fosfato usando uma curva padrão de Na₃PO₄.

3.3. Caracterização bioquímica da rLbNTPDase2

A atividade enzimática foi feita pelo método do verde malaquita, que é um método para detecção de fosfato inorgânico (Pi) (EKMAN, PIA; JAGER, 1993). Para a determinação do efeito da temperatura e pH sobre a atividade da enzima, o meio reacional foi composto por tampão de atividade com adaptações Tris 50 mM, HEPES 50 mM, MgCl₂ 2.7 mM, CaCl₂ 2 mM, NaCl 116 mM e KCl 5.4 mM (BARROS et al., 2000) e 2.5 mM de ADP como substrato. As temperaturas testadas foram 30, 34 e 37 °C e para todas, o tempo de reação e pH foram fixados à 10 minutos e 7.5, respectivamente. Para determinar a dependência de pH, ao tampão de atividade foi adicionado 50 mM MES e o pH foi ajustado para cada reação. As reações foram realizadas por 10 minutos à 37 °C e os pHs testados foram 5.5; 6.0; 6.5; 7.0; 7.5; 8.0; 8.5 e 9.0.

Para avaliar a preferência de cofator, o tampão de atividade foi preparado sem a presença de cátions divalentes e $MgCl_2$ ou $CaCl_2$ foram adicionados na placa em diferentes concentrações (0; 0.07 mM; 0.15 mM; 0.31 mM; 0.62 mM; 1.25 mM; 2.5 mM e 5 mM) ou na presença de 5 mM de EDTA e EGTA. Os demais testes foram realizados utilizando tampão de atividade contendo apenas magnésio como cofator, em pH 7,5 à 37 °C por 10 minutos. Para o teste de substrato 2.5mM de ATP, ADP, GTP, GDP, UTP, ou UDP foi utilizado. Para os testes utilizando os inibidores, 2.5 mM de ADP ou UDP foi utilizado como substrato e os compostos foram: Suramina, antagonista competitivo de receptores P2 e DIDS (4,4'-diisothiocyanostylbene 2',2'-disulfonic acid), um inibidor impermeável de Ecto-ATPases (BISAGGIO et al., 2003; GOMES et al., 2015; MEYER-FERNANDES et al., 1997); fluoreto de sódio, potente inibidor de fosfatase ácida (FREITAS-MESQUITA; MEYER-FERNANDES, 2017); azida sódica um inibidor de Mg-ATPase mitocondrial e inibidor parcial da ecto-ATPase de *T. cruzi* (FIETTO et al., 2004); molibdato de amônio, inibidor de 5'ectonucleotidase e fosfatase ácida (GOTTLIEB; DWYER, 1983).

Todas as reações foram pré-aquecidas à 37°C por 3 minutos, disparadas com 1µg de proteína e paradas pela adição de 0,2 M de HCl, seguida pela adição de reagente colorimétrico (1:3 v/v de verde malaquita 0.2 % e molibdato de amônio 10 %, diluídos previamente em HCL 4 M). As absorbâncias foram mensuradas à 660 nm e convertidas para nmol de fosfato usando uma curva padrão de Na_3PO_4 .

As análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA ou Teste T no software GraphPad Prism 6.

3.4. Determinação de K_m and V_{max}

K_m and V_{max} foram determinadas pelo método do verde malaquita (EKMAN, PIA; JAGER, 1993). A reação foi composta de tampão de atividade (Tris 50 mM, HEPES 50 mM, $MgCl_2$ 5 mM, NaCl 116 mM, and KCl 5.4 mM, pH 7.5) e diferentes concentrações de substrato: ATP (0.2 mM; 0.3 mM; 0.5 mM; 1.0 mM; 1.8 mM; 3.5 mM; 5.0 mM); ADP (0.04 mM; 0.05 mM; 0.075 mM; 0.1 mM; 0.150 mM; 0.2 mM; 0.3 mM; 0.5 mM; 1.0 mM; 2.0 mM); UDP (0.075 mM; 0.1 mM; 0.150 mM; 0.2 mM; 0.3 mM; 0.5 mM; 1.0 mM; 2.0 mM). Foram utilizadas as melhores condições de temperatura, pH e tempo de reação (37 °C, pH 7.5 e 10 minutos) e os testes foram realizados como já descrito previamente.

As curvas foram obtidas por ajuste dos dados experimentais, por regressão não linear, utilizando a equação de Michaelis-Mentem, no software GraphPad Prism 6.

3.5. Inibição da rLbNTPDase2 por compostos derivados da quercetina

Os compostos inéditos e sintéticos utilizados neste trabalho são intermediários de síntese da quercetina-3-*O*- β -L-glicosídeo, cedidos pelo Prof. Gaspar Diaz Muñoz (UFMG). Estes compostos foram desenvolvidos a partir de colaboração de nosso grupo com o grupo do Prof. Gaspar. Alguns destes compostos se mostraram inibidores potentes ou parciais da NTPDase1 de *T. cruzi* (MARIOTINI-MOURA, 2014; RIBEIRO, 2018) e por isto foram testados na rLbNTPDase2.

Os compostos foram dissolvidos em DMSO P.A na concentração de 10 mM e congelados à -20 °C. Para os experimentos, foi feita uma alíquota diluída em DMSO na concentração de 1 mM e congelada -20 °C até o uso.

Para determinação da inibição da atividade enzimática, a reação foi composta de tampão de atividade (Tris 50 mM, HEPES 50 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 116 mM e KCl 5.4 mM, pH 7.5), contendo 2.5 mM ou 500 μ M de UDP como substrato e 100 μ M de composto. Para a reação controle, foi adicionado DMSO 10% na concentração final devido a este ser o diluente dos compostos e esta a concentração usada quando na presença de inibidor.

O ensaio de atividade enzimática foi realizado pelo método do verde malaquita (EKMAN, PIA; JAGER, 1993). Todas as reações foram pré-aquecidas à 37°C por 3 minutos, disparadas com 1 μ g de proteína e paradas pela adição de 0.2 M de HCl, seguida pela adição de reagente colorimétrico (1:3 v/v de verde malaquita 0.2 % e molibdato de amônio 10 %, diluídos previamente em HCL 4 M). As absorvâncias foram mensuradas à 660 nm e convertidas para nmol de fosfato usando uma curva padrão de Na₃PO₄. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição.

As análises estatísticas foram realizadas usando o método ANOVA (p<0,05) no software GraphPad Prism 6.

3.6. Determinação de IC₅₀, K_m and V_{max} utilizando IL-09

O ensaio foi realizado pelo método do verde malaquita (EKMAN, PIA; JAGER, 1993) como já descrito. Todos os testes foram realizados nas condições ótimas, 37 °C, pH 7.5 e 10 minutos de reação. A reação foi composta de tampão de atividade (Tris 50 mM, HEPES 50 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 116 mM e KCl 5.4 mM, pH 7.5).

Para determinação do IC₅₀, foi utilizado 2.5mM de UDP como substrato e 0.1 μ M, 0.5 μ M, 1.0 μ M, 5.0 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M, 150 μ M de IL-09.

Para as reações controle foi adicionado DMSO nas mesmas quantidades finais utilizadas para os compostos e os resultados foram obtidos comparando as atividades dos testes com seus

respectivos controles. O gráfico foi obtido com os dados de atividade transformados ($\log[\text{inibidor}] \times \text{resposta}$) e normalizados, usando o software GraphPad Prism 6.

Para determinação de K_m e V_{max} foram variadas as concentrações de UDP como substrato (0.3 mM, 0.4 mM, 0.5 mM, 0.8 mM, 1.0 mM, 1.5 mM, 2.0 mM, 2.5 mM e 5.0 mM) e de IL-09 como inibidor (1.64 μM , 3.28 μM e 6.56 μM). Para a curva controle 3.27 % de DMSO foi adicionado e as reações foram realizadas na ausência de inibidor. As curvas foram obtidas por ajuste dos dados experimentais, por regressão não linear, utilizando a equação de Michaelis-Mentem, no software GraphPad Prism 6.

4. RESULTADOS

4.1. Alinhamento da LbNTPDase2 com NTPDases de mamíferos e tripanossomatídeos

Neste trabalho, a porção que codifica para o ectodomínio (S43-E425), foi utilizada para obtenção da construção no vetor pET28a e expressão da proteína recombinante. Um alinhamento entre a sequência de aminoácidos da enzima recombinante e da ATP diphosphohydrolase2 (LbrM.15.0030) disponível no TriTrypDB mostra a identidade das sequências (Anexo A).

A sequência do ectodomínio da LbNTPDase2 foi alinhada com sequências de NTPDases de diferentes espécies de *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi*, isoformas 1 a 8 de ENTPDases mamíferos e isoforma 2 de *Rattus norvegicus* (Anexo B). A Figura 1 mostra que LbNTPdase2 apresenta as 5 regiões conservadas de apirase (ACRs), preditas como importantes para atividade (ZIMMERMANN, 2000).

HsNTPDase1	IVLDAGSSHT	ATAGMRLI	GQEEGAYGWITIN	GALDLGGASTC	WTLGYML
HsNTPDase2	IVLDAGSSHT	ATAGMRLI	GQEEGVFGWVTAN	GAMDLGGASTC	WALGYML
HsNTPDase3	IVLDAGSSRT	ATAGMRLI	GQEEGVYGWITAN	GALDLGGASTC	WSLGYML
HsNTPDase4	IVVDCGSSGS	CTAGMRIL	GRQEGVYAWIGIN	GILDMGGVSTC	WTLGAIL
HsNTPDase5	IMFDAGSTGT	ATAGLRLL	GSDEGILAWVTVN	GTLDLGGASTC	WALGATF
HsNTPDase6	IMFDAGSTGT	ATAGLRLL	GTDEGVSAWITIN	GMLDLGGSTC	WALGAIF
HsNTPDase7	LVVDCGSSGS	CTAGMRLI	GRQEGVYAWIGIN	GILDMGGASLC	WTLGAIL
HsNTPDase8	IVFDAGSSHT	ATAGMRLI	GQAEGAFGWITVN	GALDMGGASTC	WTLGYML
RnNTPDase2	IVLDAGSSHT	ATAGMRPF	GQEEGVFGWVTAN	GAMDLGGASTC	WALGYML
TcNTPDase	IVFDAGSTGS	ATAGLRRI	GWEEGPLAWLTVN	TILDLGGSTC	WALGASL
LbNTPDase2	IVFDAGSTGS	ATAGLRLL	GAQEGVYGWLTVN	ATIDMGGASTC	WSLGCSSL
LmNTPDase2	VVIDAGSTGS	ATAGLRLL	GAQEGVYGWLTVN	ATIDMGGASTC	WSLGSSL
LaeNTPDase2	VVIDAGSTGS	ATAGLRLL	GAQEGVYGWLTVN	ATIDMGGASTC	WCLGSSL
LaNTPDase2	IVFDAGSTGS	ATAGLRLL	GAQEGVYGWLTVN	ATIDMGGASTC	WSLGSSL
LtNTPDase2	VVIDAGSTGS	ATAGLRLL	GAQEGVYGWLTVN	ATIDMGGASTC	WSLGSSL
LiNTPDase2	VVIDAGSTGS	ATAGLRLL	GAQEGVYGWLTVN	ATIDMGGASTC	WSLGSSL
LmxNTPDase2	IVFDAGSTGS	ATAGLRLL	GAQEGVYGWLTVN	ATIDMGGASTC	WSLGSSL
LpNTPDase2	IVFDAGSTGS	ATAGLRLL	GAQEGVYGWLTVN	ATIDMGGASTC	WSLGSSL
LdNTPDase2	VVIDAGSTGS	ATAGLRLL	GAQEGVYGWLTVN	ATIDMGGASTC	WSLGSSL

Figura 1: Alinhamento múltiplo de sequências de ENTPDases presentes em mamíferos e tripanossomatídeos. As ACR 1-5 são evidenciadas (preto). As sequências de aminoácidos foram alinhadas usando o ClustalW2 no programa MEGA X versão 10.2.5.

4.2. Expressão e purificação da rLbNTPDase2

A construção contendo a sequência que codifica para o ectodomínio da LbNTPDase2 no vetor pET28a foi transformada em células *E. coli* BL21 (DE3) RIL competentes para expressão. Após a determinação do melhor tempo de indução e concentração de IPTG, a proteína foi recuperada a partir dos corpos de inclusão em condições desnaturantes e purificada por cromatografia de afinidade a níquel por *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC). A figura 2 mostra o perfil de purificação (Figura 2A) e a purificação de uma banda de tamanho esperado de 45KDa identificada por SDS-PAGE e western blotting (Figura 2B).

Observamos, em menor proporção, a presença de bandas menores do que o tamanho esperado (Figura 2B). Uma vez que o anticorpo primário é específico para cauda de histidina e removemos a cauda C-terminal na construção, essas bandas indicam que são produtos de degradação parcial da proteína recombinante que mantém a presença de porções da região N-terminal.

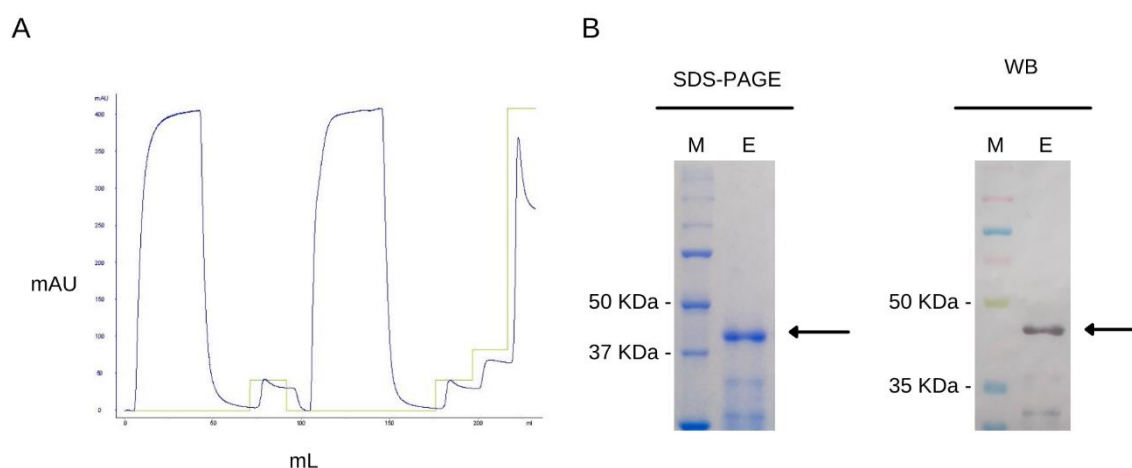


Figura 2: Purificação da LbNTPDase2 recombinante. (A) Cromatografia de afinidade ao níquel da LbNTPDase2 recombinante usando FPLC no sistema Akta Purifier (GE). O eixo X mostra os volumes de amostra e tampão. O eixo Y mostra a detecção de proteína por absorvância A280 (B) Coloração por Comassie do SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% e Western Blotting (WB), usando anticorpo rpimário anti-polihistidina e anticorpo secundário conjugado com HRP. As setas indicam a banda predita de 45 KDa. M- Marcador Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards #1610363 (BIO-RAD) e Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder #26634 (Thermo Scientific), E-Eluição.

4.3. Caracterização bioquímica da rLbNTPDase2

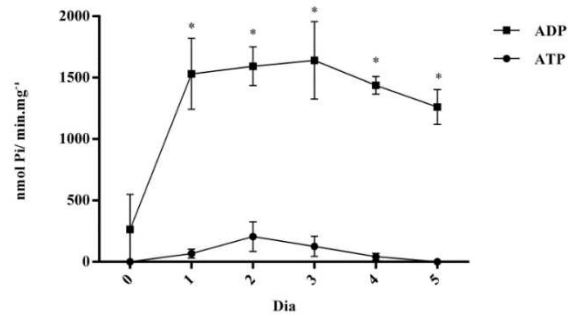
A próxima etapa consistiu em caracterizar bioquimicamente a rLbNTPDase2. Iniciamos a caracterização utilizando ATP e ADP como substratos por serem nucleotídeos amplamente utilizados pelas ENTPDases.

A proteína foi renaturada por diluição rápida como descrito previamente para rLiNTPDase2 (VASCONCELLOS et al., 2014) e a atividade foi avaliada ao longo do tempo. Nossos resultados mostram que a atividade ADPásica é detectada no tempo zero, ou seja, logo após a diluição ($254.28 \text{ nmol Pi/ mg.min}^{-1}$) e aumenta após 24 horas de renaturação ($1531.48 \text{ nmol Pi/ mg.min}^{-1}$), se mantendo até o dia 3 (72h), a partir do qual decresce (Figura 3A). Diferentemente, a atividade ATPásica apresenta baixos valores de hidrólise e mostra maior atividade após 48 horas de renaturação ($205.55 \text{ nmol Pi/ mg.min}^{-1}$) (Figura 3A). Assim, ADP foi escolhido como substrato para continuação da caracterização e os demais testes foram realizados 48 horas pós renaturação.

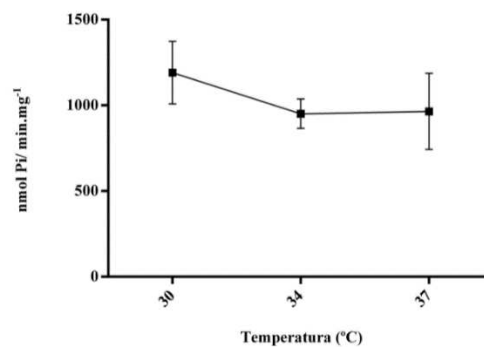
As Leishmnioses apresentam-se em diferentes formas, dentre elas a forma visceral onde o parasito tem tropismo para órgãos internos e sua habilidade de resistir a temperaturas maiores parece ser importante para a infecção (CALLAHAN et al., 1996). Considerando a infecção por espécies causadoras da forma tegumentar da doença que levam à lesões cutâneas e de mucosas, temos a hipótese de que as enzimas, como a NTPDase2 de *L. braziliensis*, possam apresentar maior estabilidade em temperaturas próximas a temperatura da pele (QUIÑONEZ-DÍAZ et al., 2012). Assim, realizamos um teste de influência da temperatura na atividade nucleotidásica (Figura 3B). Nossos resultados mostram que a enzima apresenta atividade similar nas diferentes temperaturas e apesar de haver uma tendência à queda da atividade à 37 graus, não observamos diferença estatística significativa.

Continuando a caracterização da enzima e com objetivo de determinar um pH ótimo para medida das atividades em geral, realizou-se a avaliação da dependência do pH para a atividade nucleotidásica (Figura 3C). A enzima apresentou atividade ótima em pH 8,0, porém, não houve diferença significativa em relação ao pH 7,5. Assim, utilizamos o pH 7,5 na temperatura de 37°C, pois esses parâmetros mimetizam a condição celular e nos permitem fazer inferências sobre a atividade no contexto da infecção.

A



B



C

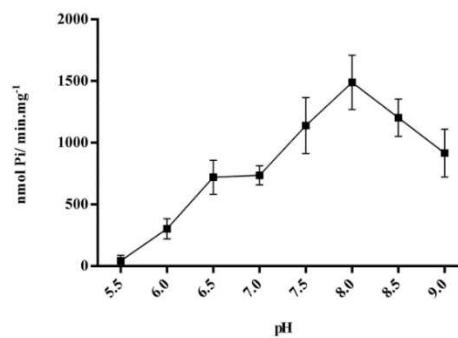


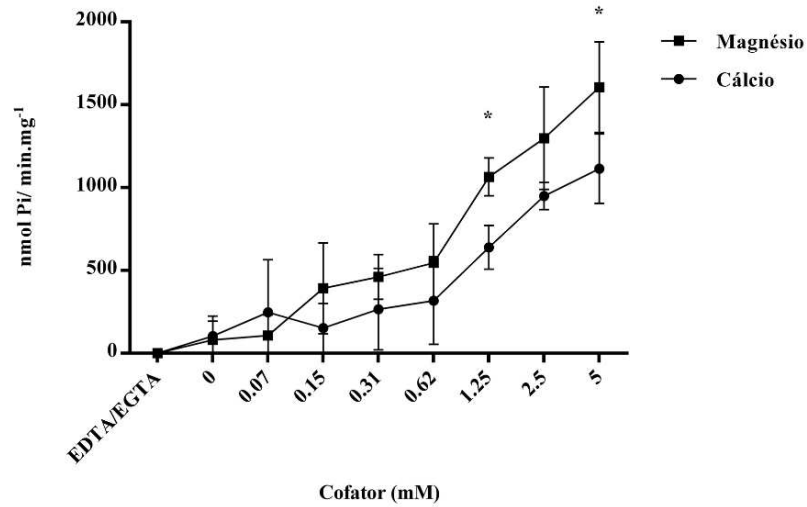
Figura 3: Caracterização bioquímica da LbNTPDase2 recombinante: avaliação da renaturação e dependência da temperatura e do pH. Atividade de hidrólise foi avaliada pelo método do verde malaquita. **(A)** Teste atividade ATPDásica durante ao tempo pós renaturação. **(B)** Avaliação da sensibilidade da atividade ADPásica em relação à temperatura e **(C)** Avaliação da atividade ADPásica em relação à variação de pH. Todos os testes foram realizados usando 2.5 mM de substrato, 2.7 mM de MgCl₂ e 2 mM de CaCl₂ como cofatores, pH 7,5 em 10 minutos de reação, com exceção para o teste de pH que foi feito em variados pHs. Análises estatísticas foram feitas por ANOVA. As barras representam a média e desvio padrão de três ou mais experimentos independentes. Diferenças significativas são indicadas como asteriscos (p<0,05).

Sabendo que enzimas da família ENTPDase exibem dependência para cátions divalentes como Ca^{2+} ou Mg^{2+} , a atividade ADPásica da rLbNTPDase2 foi avaliada quanto à dependência destes íons em diferentes concentrações (Figura 4A). Nossos resultados mostram que a enzima apresentou dependência de cátions divalentes para atividade. Na presença de Ca^{2+} ou Mg^{2+} contaminante, ou seja, quando este íon não foi adicionado ao meio de atividade, havendo somente possíveis traços vindos dos reagentes do meio, a atividade variou de 80 a 103 nmol Pi/min.mg⁻¹ e esta foi nula na presença de 5 mM dos quelantes de Mg^{2+} e Ca^{2+} (EDTA e EGTA, respectivamente). Por outro lado, a atividade ótima foi de 1605 nmol Pi/min.mg⁻¹ na presença de 5mM de magnésio e 1114 nmol Pi/min.mg⁻¹ na presença de 5mM de cálcio. No geral, o Mg^{2+} atuou melhor como cofator, com diferença significativa nas concentrações de 1,25 mM e 5 mM (Figura 4A).

Outra característica clássica da família das ENTPDases é a hidrólise de substratos tri e difosfatados e a incapacidade de hidrolisar AMP (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012). Assim, foram feitos os testes de preferência pelo substrato incluindo o AMP. Como pode ser visto na figura 4B, os resultados demonstram que a rLbNTPDase-2 hidrolisa substratos tri e difosfatados na presença de íons divalentes e não hidrolisa AMP. Foi observada maior hidrólise dos nucleotídeos UDP (4936.43 nmol Pi/ min/ mg) e GDP (4296.29 nmol Pi/ min/ mg), seguida pela hidrólise de ADP (1829.86 nmolPi/ min/ mg) e GTP (1153.77 nmolPi/ min/ mg) (Tabela 1). A ordem de atividade para os diferentes substratos foi UDP>GDP>ADP>GTP>ATP=UTP.

Observamos que a enzima apresenta menor atividade para os nucleotídeos trifosfatados testados, o que indica que ela é mais NDPase do que NTPase com taxa de hidrólise ATP: ADP= 0,072, ADP: ATP= 13,84, GTP: GDP= 0,268, GDP: GTP= 3,723, UTP: UDP= 0,016 e UDP: UTP= 60,01 (Tabela 2).

A



B

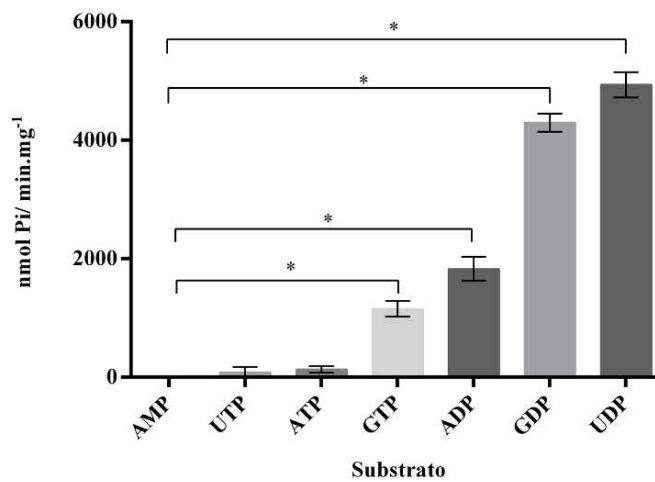


Figura 4: Caracterização bioquímica da LbNTPDase2 recombinante: avaliação da dependência de cátions divalentes e preferência pelo substrato. Atividade de hidrólise foi avaliada pelo método do verde malaquita. **(A)** Teste de preferência de cofator usando ADP como substrato, pH 7,5 em 10 minutos de reação. **(B)** Teste de preferência de substrato usando 2.5 mM de ATP, ADP, GTP, GDP, UTP ou UDP, 5 mM de MgCl₂, pH 7,5 em 10 minutos de reação. Análises estatísticas foram feitas por ANOVA e as barras representam média + desvio padrão de três ou mais experimentos independentes. Diferenças significativas são indicadas como asteriscos (p<0,05).

Tabela 1: Atividade nucleotídica para hidrólise de substrato. Atividade de hidrólise foi avaliada pelo método do verde malaquita à 37°C, pH 7,5 na presença de 5 mM de MgCl₂ como cofator. Os valores de hidrólise são expressos em nmol Pi/min.mg⁻¹ e porcentagem de atividade em relação à hidrólise de UDP. Os valores em parênteses representam as médias e desvios padrão de três ou mais experimentos independentes.

Substrato	Atividade (nmol Pi/ min.mg ⁻¹)	Atividade Relativa (%)
ATP	132.19 (± 56.28)	2.67% (± 1.01)
ADP	1829.86 (± 203.45)	37.06% (± 2.99)
GTP	1153.77 (± 133.24)	23,46% (± 3.55)
GDP	4296.29 (± 152.39)	87.03% (± 1.44)
UTP	80.91 (± 90.49)	1.63% (± 1.86)
UDP	4936.46 (± 212.30)	100%

Tabela 2: Taxa NTP: NDP e NDP: NTP para os nucleotídeos de adenina e uridina.

Substrato	NTP: NDP	Substrato	NDP: NTP
ATP: ADP	0,072	ADP: ATP	13,84
GTP: GDP	0,268	GDP: GTP	3,723
UTP: UDP	0,016	UDP: UTP	61,01

4.4. Ensaios de atividade com inibidores parciais de NTPDases

Para confirmar que a rLbNTPDase é uma apirase genuína, avaliamos a atividade na presença de inibidores conhecidos por inibir ectoenzimas ou fosfatases. Suramina (100uM), antagonista competitivo de receptores P2, que mostrou inibição parcial da ecto-ATPase de *T. cruzi* e da NTPDase2 recombinante de *L. infantum* (SANTOS et al., 2009; VASCONCELLOS et al., 2014); DIDS, um inibidor impermeável de Ecto-ATPases, cuja inibição de ectoATPases de *T. cruzi*, *L. tropica* e *L. amazonenses* tem sido demonstrada na literatura (BISAGGIO et al., 2003; GOMES et al., 2015; MEYER-FERNANDES et al., 1997); azida sódica um inibidor de ATPase mitocondrial e inibidor parcial da ecto-ATPase de *T. cruzi* (FIETTO et al., 2004).

Molibdato de amônio, inibidor de 5'ectonucleotidase e fosfatase ácida (GOTTLIEB; DWYER, 1983); fluoreto de sódio, inibidor clássico de fosfatases (FREITAS-MESQUITA; MEYER-FERNANDES, 2017).

Suramina (100 μ M), azida sódica (2 mM) e molibdato de amônio (3 μ M) foram utilizados nas concentrações testadas previamente para avaliar a inibição da rLicNTPDase2 (VASCONCELLOS et al., 2014). DIDS (100 μ M) utilizado como avaliado para ENTPDase de *L. amazonenses* (GOMES et al., 2015). Fluoreto de sódio (1 mM) utilizado na concentração testada previamente para avaliar a atividade ecto-ATPase em *L. tropica* (MEYER-FERNANDES et al., 1997).

A tabela 3 mostra os valores de atividade relativa para cada inibidor na presença de 2.5 mM de ADP ou UDP como substratos. Nossos resultados mostram que a suramina (100 μ M) foi capaz de inibir a atividade ADPásica em 27,86 % (Figura 5A; Tabela 3) e UDPásica em 50,42 % (Figura 5B; Tabela 3). DIDS (100 μ M) foi capaz de reduzir em 41,79 % a atividade UDPásica (Figura 5C; Tabela 3). NaF (1 mM) e molibdato de amônio (3 μ M), inibidores clássicos de fosfatases, não apresentaram inibição da atividade enzimática (Figuras 5A e 5B; Tabela 3). Azida sódica (2 mM), que apresenta inibição parcial para a NTPDase1 de *T. cruzi*, também não apresentou inibição da atividade para nenhum dos substratos testados (Figuras 5A e 5B; Tabela 3).

Com base nos resultados obtidos, concluímos que a rLbNTPDase2 é uma verdadeira NTPDase com atividade canônica de apirase, pois é capaz de hidrolisar nucleotídeos tri e difosfatados, na presença de cátions divalentes e é inibida por compostos conhecidos por inibir outras ENTPDases.

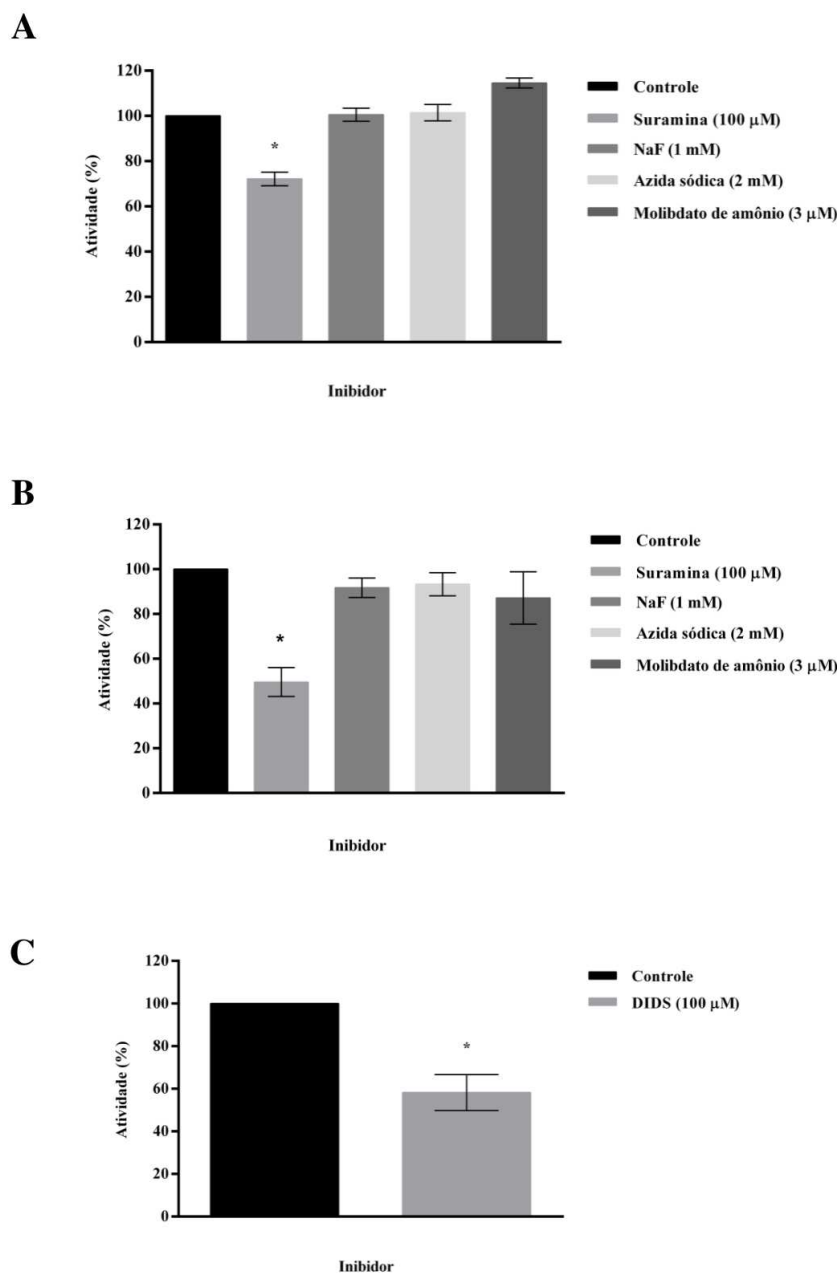


Figura 5: Efeito de inibidores de ectoenzimas e fosfatases na atividade. Atividade de hidrólise foi avaliada pelo método do verde malaquita, usando 2,5 mM de ADP (A) e UDP (B, C) como substratos. (C) Efeito do DIDS (100 μ M) na atividade UDPásica. Os testes foram realizados usando 5 mM de $MgCl_2$, pH 7,5 em 10 minutos de reação. Análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA (A, B) ou Teste T (C) e as barras representam média e desvio padrão de três ou mais experimentos independentes. Diferenças significativas são indicadas como asteriscos ($p < 0,05$).

Tabela 3: Atividade da rLbNTPDase-2 na presença de inibidores de ectoenzimas e fosfatases.

Atividade de hidrólise foi avaliada pelo método do verde malaquita à 37°C, pH 7,5 na presença de 5 mM de MgCl₂ como cofator. A tabela mostra os valores de atividade relativa de hidrólise de ADP e UDP em relação ao controle. Os valores em parênteses representam os desvios padrão de três ou mais experimentos independentes. ND: não determinado.

Inibidor	Atividade Relativa (%) (2.5 mM ADP)	Atividade Relativa (%) (2.5 mM UDP)
Controle	100%	100%
Suramina	72.14% (± 3.03)	49.58% (± 6.48)
NaF	100.50% (± 2.90)	91.72% (± 4.37)
Azida sódica	101.45% (± 3.58)	93.32% (± 5.16)
Molibdato de amônio	114.53% (± 2.22)	87.14% (± 11.67)
DIDS	ND	58.21% (± 8.42)

4.5. Cinética enzimática da rLbNTPDase2

Nucleosídeos de adenosina e uridina são os substratos com maior relevância no contexto celular, desencadeando respostas celulares pela ativação de receptores do tipo P2X e P2Y (KUKULSKI et al., 2005). Sabendo que características distintas de hidrólise das ENTPDases podem modular de forma diferencial receptores do tipo P2 (KUKULSKI et al., 2005), investigamos as características cinéticas da rLbNTPDase2, a fim de obter informações que nos permitam discutir sobre sua possível importância na modulação da sinalização purinérgica.

Desta forma realizaram-se experimentos para determinação de K_m e $V_{máx}$ para UDP, UTP, ADP e ATP. A figura 6 mostra que todos os substratos testados apresentaram cinética de Michaelis-Menten. Não conseguimos determinar os parâmetros cinéticos para o UTP, pois os valores de hidrólise se apresentaram indetectáveis em concentrações micromolares de substrato. Nossos resultados mostram que a enzima exibe maior $V_{máx}$ para o UDP (10,16 nmol/ min.µg⁻¹) e menor K_m aparente para o ADP (0.64 mM), indicando maior afinidade por este substrato (Tabela 4). O ATP apresentou alto valor de K_m aparente (2.14 mM) e baixa $V_{máx}$ aparente (0.51 nmolPi/ug.min⁻¹) (Tabela 4), mostrando que a enzima hidrolisa pobremente este nucleotídeo.

Quando analisamos a eficiência catalítica, os resultados mostram que a enzima hidrolisa mais eficientemente o ADP, seguido do UDP e apresenta baixa eficiência de hidrólise de ATP. (Tabela 4).

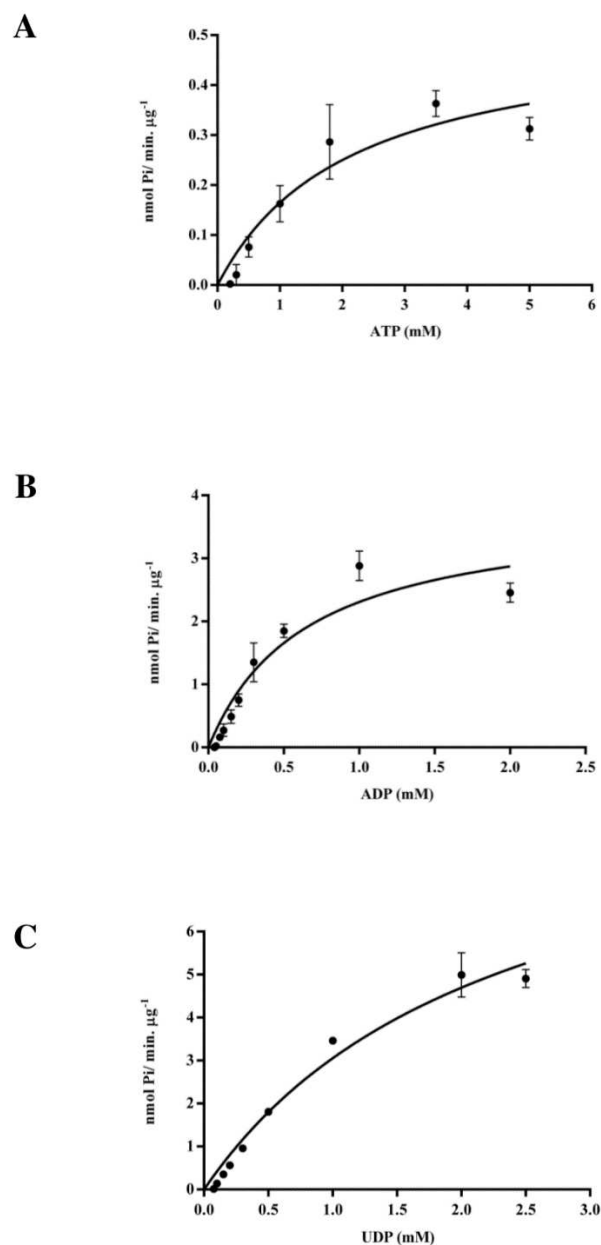


Figura 6: Cinética enzimática para ATP, ADP e UDP da LbNTPDase2 recombinante. Atividade de hidrólise foi avaliada pelo método do verde malaquita à 37°C, pH 7,5 na presença de 5 mM de MgCl_2 como cofator. Os gráficos de Michaelis-Menten demonstram o efeito da variação da concentração de nucleotídeo na velocidade da reação nucleotídica. **A)** ATP **B)** ADP **C)** UDP. As curvas representam o ajuste dos dados experimentais por regressão não linear utilizando a equação de Michaelis-Menten no software GraphPad Prism. Os resultados são expressos em $\text{nmol Pi/ min. } \mu\text{g}^{-1}$ e representam média e desvio padrão de três ou mais experimentos independentes.

Tabela 4: Determinação de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ aparentes e eficiência: A tabela sumariza os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ aparentes obtidos para hidrólise de ATP, ADP e UDP, bem como as eficiências catalíticas obtidas para cada substrato. As atividades de hidrólise foram avaliadas pelo método do verde malaquita. As condições de reação foram 37°C, pH 7,5 e 5 mM de $MgCl_2$ como cofator. Os valores em parênteses representam desvios padrão de três ou mais experimentos independentes.

Substrato	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (nmol/ min. μg^{-1})	K_{cat}/K_m	R square
ATP	2.14 (\pm 0.73)	0.51 (\pm 0.07)	0,23	0.877
ADP	0.64 (\pm 0.14)	3.80 (\pm 0.39)	5,93	0.901
UDP	2.3 (\pm 0.47)	10.16 (\pm 1.19)	4,41	0.971

4.6. Inibição da rLbNTPDase2 por compostos derivados da quercetina

Um grande desafio no tratamento da leishmaniose tegumentar consiste no desenvolvimento de novas terapias, uma vez que o tratamento convencional com antimoniais pentavalentes apresenta muitos efeitos adversos (VOLPEDO et al., 2021). Muitas abordagens têm sido empregadas, visando aumentar a efetividade e minimizar os efeitos adversos, e apesar de resultados promissores, não são sempre efetivas contra todas as espécies causadoras e formas da doença (AZIM et al., 2021). Nesse sentido, a busca por novas metodologias direcionadas a fatores específicos do parasito são de suma importância.

Os compostos derivados da quercetina têm sido estudados pelo nosso grupo de pesquisa e colaboradores quanto ao seu potencial de inibição para NTPDases, conhecidos fatores de virulência em tripanossomatídeos (MARIOTINI-MOURA, 2014; RIBEIRO, 2018).

Neste trabalho, avaliamos o papel da quercetina e dos compostos IL-05, IL-06, IL-09, IL-18, IL-24, IL-35-f1 (Tabela 5) quanto aos seus efeitos sobre a atividade UDPásica.

A tabela 5 mostra as estruturas dos compostos testados, a tabela 6 mostra os valores de atividade enzimática relativa ao controle para os diferentes compostos e a figura 7 mostra os dados em visualização gráfica. Nossos resultados mostram que, na presença de excesso de substrato (2.5 mM) e mantendo os compostos à 100 μM , o IL-09 e o IL-05 foram os compostos que apresentaram maior inibição da atividade UDPásica, 92,88% e 88,41%, respectivamente (Figura 7A; Tabela 6). IL-06 mostrou inibição de 23,86 % (Figura 7A; Tabela 6). Não foi observada inibição dos demais compostos (Figura 7A). Quando reduzimos a concentração de substrato para 500 μM , mantendo os compostos em 100 μM observa-se que os compostos IL-09, IL-05 e IL-06 apresentaram aumento nos valores de inibição para 100%, 99,60%, 47,91%,

respectivamente (Figura 7B; Tabela 6). Os compostos IL-18 e IL-35-f1, que não haviam apresentado inibição, com a redução da concentração de substrato inibiram 44,33% e 24,87% da atividade UDPásica, respectivamente (Figura 7B; Tabela 6).

Tabela 5: Compostos derivados da quercetina. A tabela mostra a estrutura da quercetina e de seus derivados IL-05, IL-06, IL-09, IL-18, IL-24, IL-35-f1.

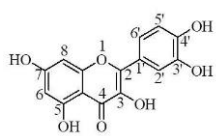
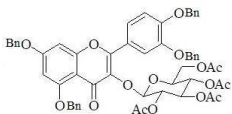
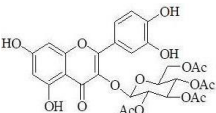
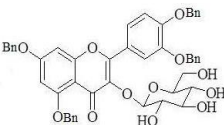
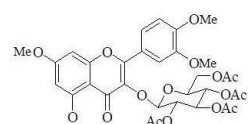
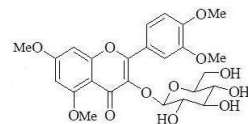
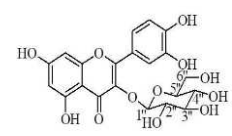
Composto	Estrutura
Quercetina	
IL-05	
IL-06	
IL-09	
IL-18	
IL-24	
IL-35-f1	

Tabela 6: Atividade UDPásica da rLbNTPDase2 na presença de quercetina e seus derivados. A tabela mostra os resultados de atividade nucleotidásica relativa em relação ao controle expressos como porcentagem de atividade. Os valores em parênteses representam o desvio padrão de 3 experimentos independentes.

Composto	Atividade Relativa (2.5 mM UDP)	Atividade Relativa (500 μ M UDP)
Controle	100%	100%
Quercetina	98.29% (\pm 17.37)	95.87% (\pm 16.71)
IL-05	11.58% (\pm 2.70)	0.40% (\pm 0.70)
IL-06	76.13% (\pm 5.57)	52.09% (\pm 7.45)
IL-09	7.12% (\pm 4.038)	0
IL-18	99.79% (\pm 10.82)	55.67% (\pm 1.82)
IL-24	110.96% (\pm 8.60)	100.63% (\pm 4.72)
IL-35-f	96.37% (\pm 12.72)	75.13% (\pm 9.68)

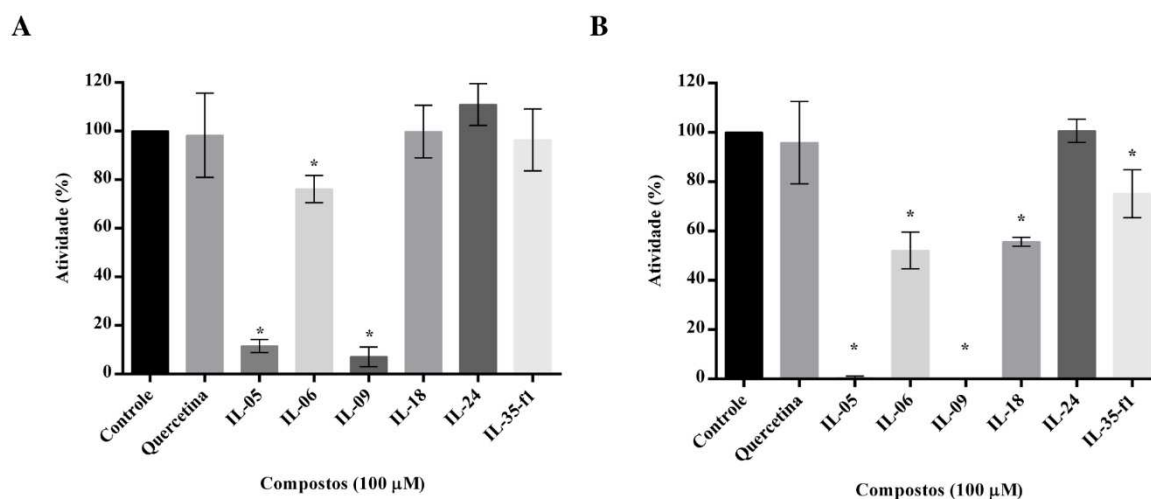


Figura 7: Atividade UDPásica da rLbNTPDase2 na presença de quercetina e seus derivados. Atividade de hidrólise foi avaliada pelo método do verde malaquita na ausência (controle) e na presença de quercetina, IL-05, IL-06, IL-09, IL-18, IL-24, IL-35-f1. A concentração final dos compostos foi 100 μ M e UDP foi usado como substrato na concentração final de 2,5 mM (A) ou 500 μ M (B). Os testes foram realizados à 37°C, pH 7,5 na presença de 5 mM de MgCl₂ como cofator. Os valores de atividade são representados como porcentagem de atividade. Barras representam desvio padrão (SD) de três experimentos independentes. Análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA e diferenças significativas entre o controle e os compostos são mostradas com asteriscos (p<0,05).

4.7. Determinação de IC_{50} , K_m e V_{max} na presença de IL-09

O IC_{50} mede qual a concentração de determinado composto é exigida para inibir um processo biológico pela metade e é uma abordagem muito utilizada para avaliar inibição enzimática para o desenho de drogas (CALDWELL et al., 2012).

Dos compostos testados, o IL-09 apresentou maior habilidade em inibir a rLbNTPDase2 (Figura 7), assim este composto foi escolhido para a avaliação do IC_{50} .

Para avaliar o IC_{50} , a concentração de IL-09 foi variada de 0.1 μM a 150 μM e UDP foi utilizado como substrato na concentração final de 2.5 mM. Nossos resultados mostram que o IL-09 apresenta alta capacidade em inibir a atividade UDPásica da rLbNTPDase2, com IC_{50} de 6.56 μM (Figura 8). Este baixo valor de IC_{50} indica uma alta afinidade do composto pela enzima.

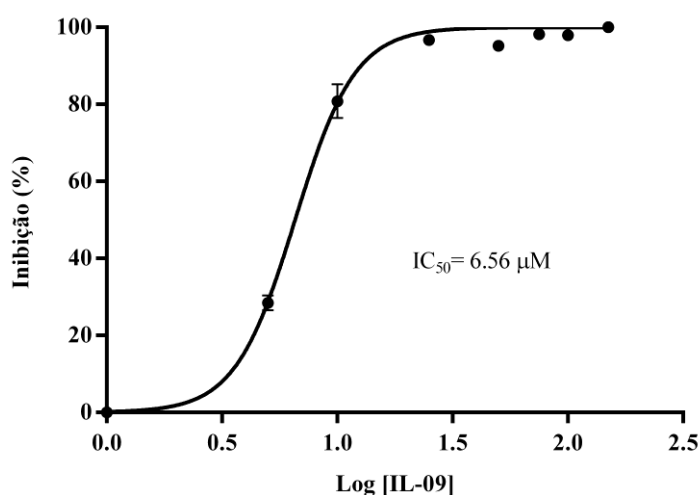


Figura 8: Determinação do IC_{50} do composto IL-09. Atividade de hidrólise foi avaliada usando o método do verde malaquita e UDP foi usado como substrato na concentração final de 2,5 mM. Os testes foram realizados à 37°C, pH 7,5 na presença de 5 mM de $MgCl_2$ como cofator. Barras representam desvio padrão (SD) de três experimentos independentes. Gráficos foram construídos com os dados de atividade transformados ($\log[\text{inibidor}] \times \text{resposta}$) e normalizados, usando o software GraphPad Prism 6.

Posteriormente, avaliamos os parâmetros cinéticos da rLbNTPDase2 para hidrólise de UDP na presença de diferentes concentrações de IL-09, com o objetivo de determinar o tipo de inibição. A curva controle foi obtida na ausência do composto, contudo foi adicionado DMSO

na mesma concentração utilizada nos testes com o composto. A figura 9 mostra que, para as menores concentrações de inibidor (1.64 μM e 3.28 μM), houve uma tendência a mudança no gráfico de Michaelis-Menten, contudo não foram observadas diferenças significativas nos valores de K_m e V_{max} em relação ao controle. Esta tendência foi mais proeminente quando utilizamos o composto na concentração de 6.56 μM , para a qual foi observado aumento no valor de K_m e diminuição da $V_{\text{máx}}$ em relação ao controle, indicando inibição do tipo mista.

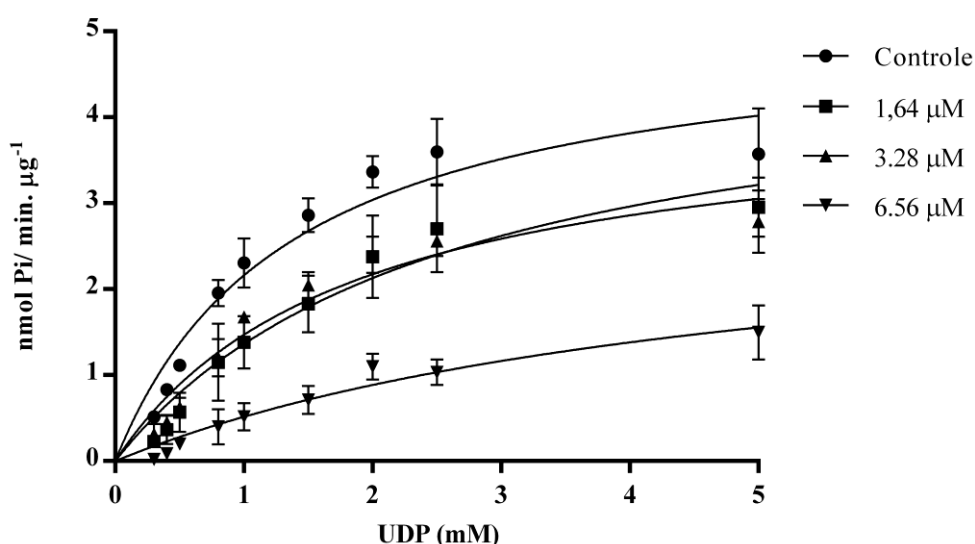


Figura 9: Cinética enzimática da rLbNTPDase2 na presença de IL-09. Atividade de hidrólise foi avaliada pelo método do verde malaquita, utilizando diferentes concentrações de UDP (0.3 mM a 5 mM) e concentrações fixas de IL-09 (1.64 μM , 3.28 μM e 6.56 μM). A reação controle foi realizada na ausência de composto e foi adicionado DMSO na mesma concentração final usada para os compostos. Os testes foram realizados à 37°C, pH 7,5 na presença de 5 mM de MgCl_2 como cofator. Os resultados são expressos em $\text{nmol Pi/ min. } \mu\text{g}^{-1}$ e as barras representam desvio padrão (SD) de três experimentos independentes. As curvas foram obtidas por ajuste dos dados experimentais, por regressão não linear, utilizando a equação de Michaelis-Menten, no software GraphPad Prism 6.

A tabela 7 mostra os valores de K_m e $V_{\text{máx}}$ obtidos para cada teste, bem como o desvio padrão para cada parâmetro avaliado. ANOVA foi realizada para comparar os valores de K_m e $V_{\text{máx}}$ e diferenças significativas ($p < 0.05$) em relação ao controle são mostradas com asterisco (*).

Tabela 7: Determinação de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ na presença de IL-09: Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram obtidos na presença de diferentes concentrações de UDP (0.3 mM a 5 mM) e de IL-09 (1.64 μ M, 3.28 μ M e 6.56 μ M). A reação controle foi realizada na ausência de composto e foi adicionado DMSO na mesma concentração final usada para os compostos. Os testes foram realizados à 37°C, pH 7,5 na presença de 5 mM de $MgCl_2$ como cofator. Análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA no software GraphPad Prism 6 ($p < 0,05$) e são indicadas com asterisco. ND: não determinado. NS: não significativo.

	K_m (mM)	SD K_m	p <0.05	$V_{m\acute{a}x}$ (nmol/ min. μ g ⁻¹)	SD $V_{m\acute{a}x}$	R square	p <0.05
Controle	1.37	0.24	ND	5.12	± 0.39	0.9010	ND
1.64 μM	2.57	0.67	NS	4.87	± 0.67	0.8720	NS
3.28 μM	1.84	0.34	NS	4.17	± 0.37	0.9118	NS
6.56 μM	5.09	1.73	*	3.13	± 0.69	0.8815	*

5. DISCUSSÃO

Este trabalho descreve a expressão e caracterização bioquímica da LbNTPDase-2 recombinante de *L. (Viannia) braziliensis*. Até então os estudos publicados avaliaram somente a atividade ectonucleotidásica nativa geral em parasitos vivos ou extratos proteicos onde a enzima não está isolada e agregaram informações importantes para o entendimento desta ectonucleotidase (LEITE et al., 2012; PORCINO et al., 2012; REZENDE-SOARES et al., 2010). Porém, a análise da atividade enzimática no parasito pode detectar hidrólise de nucleotídeos por outras ectonucleotidasas sendo, portanto, difícil caracterizar e inferir sobre a atividade enzimática específica. No nosso trabalho expressamos e purificamos a LbNTPDase2 de forma recombinante, sendo possível o estudo bioquímico da enzima isolada o que pode contribuir para melhor entendimento da enzima *per si*, de seus papeis biológicos e para o desenvolvimento de inibidores que possam ser usados como possíveis alvos para o desenvolvimento de novos tratamentos para a Leishmaniose tegumentar, uma vez que esta proteína tem relevância importante para a manifestação da doença.

Inicialmente definimos a região da enzima a ser expressa e alinhamos sua sequência primária com a da ATP difosfohidrolase 2 *L. braziliensis* (LbNTPDase2) e com NTPDases de parasitos e mamíferos, confirmamos que ela possui as 5 regiões conservadas de apirase preditas como importantes para a catálise enzimática (ZIMMERMANN, 2000), o que favorece a obtenção de uma enzima recombinante ativa, conforme feito anteriormente para as enzimas

NTPDase1 de *T. cruzi* e NTPDase1 e 2 de *L. infantum* (BASTOS et al., 2017; FIETTO et al., 2004; MARIOTINI-MOURA et al., 2014; SANTOS et al., 2009; VASCONCELLOS et al., 2014).

A fim de obter melhor expressão da proteína recombinante em sistema bacteriano, otimizamos a sequência correspondente ao ectodomínio para expressão em *E. coli* e obtivemos comercialmente as construções no vetor de expressão pET28a. Com esta construção padronizamos a expressão e a purificação da enzima a fim de obtê-la em boas condições para sua caracterização. Nossos resultados mostram que a enzima está presente na fração solúvel, contudo, não conseguimos isolar a proteína a partir desta fração, uma vez que ela foi eluída na presença de contaminantes na purificação por cromatografia de afinidade ou precipitou no teste utilizando sulfato de amônio. Assim, iniciamos testes para obter a enzima a partir dos corpos de inclusão. Após purificação da amostra recuperada a partir desta fração, foi possível confirmar por SDS-PAGE e western blotting a presença de uma banda com o tamanho predito para a proteína recombinante (45 KDa). Observamos também a presença de bandas de tamanhos menores, que apresentam afinidade pela coluna de afinidade e eluem junto com a banda de 45 KDa, o que indica que são fragmentos da proteína contendo a região N-terminal, onde se encontra a cauda de histidina.

A literatura reporta a existência de bandas de 48 KDa e 43 KDa para LbNTPDase2 em estudos com a enzima nativa (PORCINO et al., 2012; REZENDE-SOARES et al., 2010). A banda de 43 KDa havia sido sugerida como resultante de processamento proteolítico pós-traducional no parasito (PORCINO et al., 2012). A banda de 45 KDa é compatível com a expressão do ectodomínio que não inclui a região de peptídeo sinal amino terminal que contém uma região hidrofóbica. A observação de bandas menores em nossos resultados, sugerem a susceptibilidade a proteólise também após expressão em sistema bacteriano, contudo com fragmentos de tamanho diferentes do descrito na literatura, uma vez que a proteína de partida também é menor.

A enzima foi renaturada como descrito na literatura para rLiNTPDase2 (VASCONCELLOS et al., 2014) para a caracterização bioquímica. Os resultados mostram que a rLbNTPDase2 é uma verdadeira apirase que hidrolisa nucleotídeos tri e difosfatados na dependência de cátions divalentes como cálcio e magnésio, conforme esperado para enzimas desta família (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006).

Diferentes NTPDases apresentam diferenças quanto ao uso de cátions divalentes para atividade. A rLicNTPDase2 caracterizada por nosso grupo de pesquisa, não mostra preferência por cálcio ou magnésio (VASCONCELLOS et al., 2014). Para as enzimas de *T. gondii* a

variante TgNTPDase3 exibiu preferência para magnésio, especialmente para a hidrólise de ATP, enquanto a TgNTPDase1 sugere uma leve preferência pelo cálcio como cofator (KRUG et al., 2012). NTPDase6 humana exibe uma leve preferência para o cálcio enquanto a NTPDase5 mostrou maior atividade na presença de magnésio (IVANENKOV; MURPHY-PIEDMONTE; KIRLEY, 2003; MURPHY-PIEDMONTE; CRAWFORD; KIRLEY, 2005). Em nossos resultados, observamos diferença estatística quando utilizamos cloreto de magnésio nas concentrações de 5 mM e 1,25 mM, o que indica que o magnésio pode atuar melhor como cofator da rLbNTPDase2.

Durante o ciclo de vida, o parasito se transforma nas formas amastigotas, que residem no ambiente acídico dos fagolisossomos (pH 4.7-5.2) (ANTOINE et al., 1990). Apesar da membrana celular do amastigota ser exposta e adaptada ao ambiente ácido do vacúolo parasitóforo, os amastigotas mantêm um pH neutro intracelularmente por meio de mecanismos extrusão de prótons. Diferentemente, o sistema de captação de nutrientes em formas promastigotas funcionam otimamente em pH neutro (BURCHMORE; BARRETT, 2001).

Atividade de hidrólise detectada para rLbNTPDase2 em pHs ácidos, sugere que esta enzima seja ativa neste estágio evolutivo. Contudo, os maiores valores de atividade observados em pH neutro sugerem um papel mais importante desta enzima nas formas promastigotas.

Escolhemos o pH 7,5 para continuar os experimentos, uma vez que este valor é próximo de pH neutro e mantêm uma atividade enzimática semelhante à atividade ótima obtida em pH 8. Assim, podemos melhor inferir sobre o papel desta enzima na forma promastigota, que medeia os processos iniciais na infecção. Além disso, testes de infecção *in vitro* são realizados no nosso laboratório e utilizam meio em pH7,2, então o uso do pH 7,5 permite uma melhor comparação sem perda significativa de atividade.

Quando testamos inibidores de outras nucleotidasas e inibidores parciais das NTPDases observamos que a atividade foi parcialmente inibida por suramina e DIDS. Sendo estes compostos conhecidos por inibirem outras NTPDases, esse dado corrobora que expressamos uma NTPDase ativa e que a rLbNTPDase2 é mesmo uma NTPDase clássica (BISAGGIO et al., 2003; BORGES et al., 2008; MEYER-FERNANDES et al., 1997; VASCONCELLOS et al., 2014).

Rezende-Soares e colaboradores (REZENDE-SOARES et al., 2010), caracterizando a atividade de ATP difosfohidrolase (que seria a LbNTPDase2) em preparações de promastigotas, observaram atividade específica de 724 (± 341) nmol Pi/ mg. h⁻¹ para o ATP e 603 (± 451) nmol Pi/ mg. h⁻¹ para o ADP. A atividade ATPásica foi reduzida em 53% com o

uso de ortovanadato de sódio, indicando que parte da atividade ATPásica observada poderia ser reflexo da hidrólise por ATPases do tipo P.

O mesmo trabalho observou que a azida sódica inibiu em 58% a atividade ATPásica sugerindo que este composto possui ação sobre a ATP difosfohidrolase, inibindo a sua atividade. Contudo quando avaliamos o efeito da azida sódica sobre a hidrólise de ADP e UDP pela enzima recombinante não observamos efeito inibitório, sugerindo que este composto não apresente inibição específica para LbNTPDase2 e que a redução na taxa de hidrólise observada *in vivo* seja em decorrência da inibição de outras enzimas.

Com relação à preferência pelo substrato, a enzima recombinante hidrolisou pobremente os substratos trifosfatados de adenosina e uridina e em maior quantidade os substratos difosfatados, com ordem UDP>GDP>ADP>GTP>ATP=UTP. Diferentemente, a rLiNTPdase2 apresenta o maior valor de hidrólise para o GTP (GTP>GDP=UDP>ADP>UTP=ATP) e a TcNTPDase-1 utiliza GDP e UDP na mesma proporção e também ADP e ATP de forma semelhante (GDP=UDP> GTP = UTP >ADP= ATP) (MARIOTINI-MOURA et al., 2014; VASCONCELLOS et al., 2014). Apesar das diferenças quanto à preferência de hidrólise, as enzimas recombinantes de *T. cruzi* (MARIOTINI-MOURA et al., 2014) e *Leishmania infantum* (VASCONCELLOS et al., 2014), caracterizadas por nosso grupo de pesquisa, exibem, de forma geral, acentuada hidrólise de nucleotídeos difosfatados.

Historicamente, a taxa de hidrólise NTP: NDP foi amplamente utilizada como base para classificação de Ecto-ATPases em dois principais grupos: apirases que, frequentemente, hidrolisam NTPs e NDPs a taxas semelhantes e ATPases que exibem maior hidrólise de NTPs (SMITH; LEWIS CARL; KIRLEY, 1999). Contudo, à medida que novas enzimas foram caracterizadas, observaram-se novas características de hidrólise, sendo necessária a definição de uma nova nomenclatura. Atualmente as NTPDases de vertebrados são nomeadas como NTPDases 1 a 8, dependendo de suas características. NTPDase1 (CD39, ecto-apyrase, ecto-ATP diphosphohydrolase) hidrolisa ATP e ADP em proporção semelhante. NTPDase2 (CD39L1, ecto-ATPase) possui uma preferência 30 vezes maior para a hidrólise de ATP em relação a ADP. NTPDase3 (HB6) possui característica intermediária e hidrolisa ATP cerca de 3 vezes melhor que ADP (ZIMMERMANN, 2001). NTPDase4 humana possui duas isoformas caracterizadas e hidrolisam nucleotídeos tri e difosfatados, mas ATP e ADP em menor extensão. NTPDase5 e NTPDase6 possuem uma alta preferência por nucleosídeos difosfatados, na qual o ADP é hidrolisado pobremente. NTPDase7 hidrolisa preferencialmente UTP, GTP e CTP, mas ATP e nucleosídeos difosfatados em menor extensão. NTPDase8 hidrolisa ATP e

UTP de forma semelhante e possui alta preferência por nucleosídeos difosfatados (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012).

Nossos dados corroboram que a rLbNTPDase é caracteristicamente uma nucleotidase com preferência por nucleotídeos difosfatados e que, se comparada com as enzimas de mamífero, a LbNTPDase2 é mais próxima bioquimicamente das NTPDases 5 e 6, isoformas mais relacionadas às ENTPDases de tripanossomatídeos (IVANENKOV; MURPHY-PIEDMONTE; KIRLEY, 2003; MURPHY-PIEDMONTE; CRAWFORD; KIRLEY, 2005; VASCONCELLOS et al., 2014).

A literatura reporta, em ensaios utilizando promastigotas, uma taxa ADP:ATP próxima a 1 (REZENDE-SOARES et al., 2010). Nossos resultados de atividade para a enzima recombinante mostram atividade específica de 132.19 (± 56.28) nmol Pi/ min.mg⁻¹ para o ATP e 1829.86 (± 203.45) nmol Pi/ min.mg⁻¹ para o ADP, com uma taxa ADP: ATP de 13.84.

Importante considerarmos que as diferenças observadas podem ser ambas genuínas e a maior hidrólise de ATP observada *in vivo* pode ser resultante, não apenas das metodologias utilizadas, mas também reflexo das complexidades inerentes ao contexto celular, como quantidade de proteína expressa na membrana e processos que modulam a atividade, como a formação de oligômeros e presença de região transmembrana (GRINTHAL; GUIDOTTI, 2000; HICKS-BERGER et al., 2000; KRUG et al., 2012; ZEBISCH; STRÄTER, 2008).

A NTPDase 6 humana foi estudada na forma solúvel e ligada a membrana de células COS de mamíferos. A forma solúvel hidrolisa preferencialmente nucleosídeos difosfatados e a forma ligada a membrana é capaz de hidrolisar ATP, UTP e CTP melhor que seus respectivos nucleosídeos difosfatados (HICKS-BERGER et al., 2000). Logo, comparando o perfil de hidrólise *in vivo* disponível na literatura e nossos resultados de atividade para o ectodomínio da LbNTPDase2, podemos sugerir que as diferenças observadas em ensaios no parasito possam ser influenciadas também pela presença de região transmembrana, direcionado a uma maior hidrólise de ATP.

Porém não podemos também afastar a hipótese de que nos experimentos *in vivo* outras enzimas possam estar agindo e que os dados não refletem a ação exclusiva da LbNTPDase2. Assim, os nossos dados têm importante relevância, pois descrevem pela primeira vez as características enzimáticas da LbNTPDase pura (mesmo que em sua forma recombinante).

ATP e UTP são liberados pelas células e, juntamente com seus produtos de degradação (ADP e UDP), desencadeiam repostas pela interação com receptores purinérgicos (BURNSTOCK; BOEYNAEMS, 2014). Apesar de haver um crescente entendimento sobre o

papel dos nucleotídeos de uridina na sinalização purinérgica, o papel do ATP é mais bem compreendido e estudado.

Em condições normais o ATP extracelular existe em concentrações nanomolares (400-700 nM) (BOURS et al., 2006) e tais níveis podem aumentar em resposta a diferentes estímulos como infecção, inflamação e injúria (DOSCH et al., 2018). Em região de tumor, a concentração de ATP pode atingir concentração de centenas de micromolares (PELLEGATTI et al., 2008). Ainda, células inflamatórias migram em resposta a um gradiente de nucleotídeo, se movendo em direção à região de maior concentração. No sítio de inflamação essas células são expostas a alta concentração micromolar ATP (centenas de micromolares), que atua como sinal de parada da migração (DI VIRGILIO; VUERICH, 2015).

Diferentemente do demais receptores, que são ativados por concentrações baixas micromolares de nucleotídeos, o receptor P_2X_7 possui um alto limiar para ativação por ATP (EC_{50} : 100-780 μ M) (BOURS et al., 2006). Estudo avaliando a formação de protusões na membrana de osteoblastos, mostrou que P_2X_7 , quando na presença de concentrações fisiológicas de Ca^{+2} e Mg^{+2} extracelulares, requereu 1mM de BzATP para gerar resposta (PANUPINTHU et al., 2007).

A literatura reporta que NTPDases humanas, conhecidas por modular o sistema de sinalização purinérgico, apresentam K_m para diferentes nucleotídeos na faixa micromolar: NTPDase1 (K_m ATP: 10-200 μ M), NTPDase2 (K_m ATP: 70 μ M), NTPDase3 (K_m ATP: 75 μ M), NTPDase 4 (K_m UDP, GDP: ~200–500 μ M), NTPDase5 (K_m GDP: ~130 μ M), NTPDase 8 (K_m ATP: 81–226 μ M) (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012). Neste sentido, apesar do alto limiar de ativação do receptor P_2X_7 , os valores de K_m obtidos para o ATP e demais nucleotídeos não sugerem uma participação da LbNTPDase2 na desativação de receptores purinérgicos. Contudo, a hidrólise de ATP e ADP teria importância para geração de adenosina, em circunstâncias nas quais o espaço extracelular estaria exposto a alta concentração milimolar destes nucleotídeos. Além disso, não podemos excluir a participação desta enzima na geração de AMP, que seria utilizado pela 5' ectonucleotidase para geração de adenosina, cuja função modulatória é conhecida. A ligação a receptores do tipo A2 leva a efeitos anti-inflamatórios como inibição da liberação de TNF- α e aumento da produção de IL-10 por macrófagos (BURNSTOCK; BOEYNAEMS, 2014). Adenosina leva a diminuição de mediadores pro-inflamatórios em macrófagos como IL-12, óxido nítrico e superóxido (HASKÓ; PACHER, 2012). Além disso adenosina pode ser incorporada pelo parasito, uma vez que Leishmania não apresenta via *de novo* de purinas (J. JOSEPH MARR; RANDOLPH L. BERENS E DONALD J. NELSON, 1978).

Diferentemente do ambiente extracelular, intracelularmente o ATP apresenta-se em maiores concentrações (ATP: 3–10 mM) (BOURS et al., 2006). Assim, as características de hidrólise observadas para rLbNTPDase2, podem indicar que esta enzima tenha função importante em localizações subcelulares no parasito e na fase intracelular do ciclo de infecção.

De fato, essa enzima foi identificada em diferentes locais em formas promastigotas de *L. braziliensis* como membrana plasmática, bolso flagelar, flagelo, mitocôndria, cinetoplasto, núcleo e vesículas citoplasmáticas (PORCINO et al., 2012). E recentemente, foi também identificada em formas amastigotas (PORCINO, 2016).

A distribuição ubíqua desta enzima é confirmada em outras espécies. Em *L. infantum chagasi*, a NTPDase2 foi identificada em amastigotas (MAIA et al., 2019) e na superfície celular, mitocôndria, núcleo, cinetoplasto, flagelo, bolso flagelar e vesículas de formas promastigotas (VASCONCELLOS et al., 2014). Em promastigotas de *L. amazonensis*, a isoforma de 58 KDa-63KDa foi identificada na membrana celular, mitocôndria, núcleo, flagelo, bolso flagelar e vesículas citoplasmáticas (DETONI et al., 2013).

Estudo para a isoforma menor da NTPDase de *Leishmania major* mostra que o mutante nulo leva à formação de LPG mais curtos e indica seu papel na geração de UMP, importante para manutenção do transporte de açúcar-nucleotídeo no Golgi (SANSOM et al., 2014).

Em *L. amazonenses* as formas amastigotas apresentam maior atividade ectonucleotidásica que promastigotas, o que indica um papel importante dessas enzimas na fase intracelular do parasito (PINHEIRO et al., 2006).

Com base no exposto até aqui, podemos inferir que a distribuição ubíqua da LbNTPDase2 (PORCINO et al., 2012) e suas características de hidrólise apontam para sua participação em diferentes vias de sinalização no parasito e durante a infecção, mas uma improvável atuação na desativação de receptores que possuem baixo limiar de ativação. Contudo, é possível que essa atuação exista em nível de microambientes externos específicos onde haja a liberação maciça de nucleotídeos sinalizadores e onde as NTPDases e os purinoreceptores possam estar concomitantemente localizados proximamente.

Em *Leishmania*, virulência e alta hidrólise de ATP, ADP e AMP têm sido relacionadas na literatura e NTPDases do parasito têm sido sugeridas como responsáveis por esse processo (BERRÊDO-PINHO et al., 2001; GOMES et al., 2015; MAIOLI et al., 2004; MARQUES-DASILVA et al., 2008). Avaliando as características cinéticas de NTPDases de tripanossomatídeos, são demonstrados valores milimolares de K_m para o ATP em NTPDases de diferentes espécies na literatura: *Trypanosoma brucei* (ATP: 1.57 mM) (DE SOUZA LEITE et al., 2007), *Leishmania donovani* (ATP: 5.76 mM) (SINHA et al., 2016) e NTPDase1 de

Toxoplasma gondii (ATP/Ca²⁺: 2.4 mM; ATP/Mg²⁺: 3.4 mM) (KRUG et al., 2012). Interessantemente a NTPDase3 de *T. gondii* apresenta valores micromolares de K_m para o ATP (ATPCa²⁺: 0.572 mM; ATPMg²⁺: 0.8 mM), maior eficiência catalítica e ocorre em cepas mais virulentas do parasito (KRUG et al., 2012). Baixo valor de K_m para ATP na faixa micromolar também é observado para NTPDase1 de *Trypanosoma cruzi* (0.096 mM), indicando que esta enzima possa atuar na desativação de receptores do tipo P₂X₇ (MARIOTINI-MOURA et al., 2014). Considerando todos estes dados e os dados obtidos neste trabalho ainda é difícil afirmar ou excluir a participação direta das NTPDases dos parasitos na regulação da sinalização purinérgica sendo necessário que investigações mais diretas destes eventos sejam feitas.

L. braziliensis apresenta um espectro de manifestações clínicas que incluem, em alguns casos, o desenvolvimento de lesões ulcerosas graves e de lesões desfigurantes de mucosas. A literatura reporta que isolados mais virulentos apresentam maior hidrólise de ATP, ADP e AMP. Interessantemente, foi identificada a existência de polimorfismos no gene da NTPDase-2, o que poderia explicar as diferenças de atividade e virulência observadas (LEITE et al., 2012). Contudo, estudos comparativos entre essas cepas, avaliando a hidrólise de ATP pelas variantes enzimáticas ainda precisam ser realizados e auxiliariam no entendimento de como os polimorfismos alteram a cinética e estariam relacionados com a virulência destas cepas.

Assim, poderíamos especular que determinadas espécies e isolados possam modular melhor a sinalização purinérgica, de acordo com as características estruturais e cinéticas apresentadas por suas NTPDases. Neste contexto, a capacidade de gerar substrato para produção de adenosina e de desativar receptores que medeiam inflamação estaria relacionada a melhor evasão do sistema imune e melhor estabelecimento da infecção pelo parasito. Contudo, faltam informações também sobre as características cinéticas de NTPDases em parasitos que auxiliem neste entendimento.

A última parte deste trabalho avaliou possíveis novos inibidores da LbNTPDases baseados em derivados não naturais da quercetina. O potencial terapêutico da quercetina tem sido explorado, mostrando sua ampla ação como molécula antioxidante, antimicrobiana, antidiabetes, antitumor, neuroprotetiva e cardioprotetiva (SALEHI et al., 2020).

Uma vez que NTPDases têm sido demonstradas como importantes fatores de virulência em parasitos, os papéis da quercetina atuando como molécula antiparasitária e moduladora da sinalização purinérgica são de especial relevância (BALDISSARELLI et al., 2016; FONSECA-SILVA et al., 2011, 2013; MAMANI-MATSUDA et al., 2004; ROCKENBACH et al., 2013; TASDEMIR et al., 2006).

Assim, nosso grupo de pesquisa se propôs a investigar a ação da quercetina e de alguns derivados não naturais em estudos com *T. cruzi* e Leishmania. Quercetina, miquelianina e os derivados não naturais IL-09 e IL-05 foram capazes de inibir a NTPDase1 recombinante de *T. cruzi*. O composto IL-09, que mostrou maior capacidade inibitória foi apontado pelos autores como importante alvo de estudo para o desenvolvimento de tratamentos para Doença de Chagas (RIBEIRO, 2018). Semelhantemente, os compostos IL-09 e IL-05 foram capazes de inibir a rLbNTPDase2, com IL-09 apresentando maior capacidade inibitória (92,88% e 100%) nas duas concentrações de UDP avaliadas. O composto IL-05, que apresentou inibição em torno de 50% para enzima recombinante de *T. cruzi*, foi capaz de inibir em maior extensão a rLbNTPDase2 (88,41% e 99,60%). Apesar de haver um aumento na inibição pelo composto IL-09 na presença de menor concentração substrato, este composto já apresenta alto valor de inibição em altas concentrações de UDP. Esses resultados, juntamente com o baixo valor de IC_{50} de 6.56 μ M, indicam uma alta capacidade de interação do composto com a enzima, na qual a presença do substrato pode não ser o fator determinante para modular a interação. Essa ideia é reforçada quando analisamos os dados cinéticos da enzima na presença de diferentes concentrações de IL-09. Como observado para a concentração de 6.56 μ M, a presença do inibidor ocasiona mudança nos dois parâmetros, K_m e $V_{m\acute{a}x}$, indicando um perfil de inibição do tipo misto. Este tipo de inibição apresenta características tanto da inibição competitiva quanto da incompetitiva. O inibidor se liga tanto à enzima quanto ao complexo enzima substrato (ROSKOSKI, 2007).

Diferente do observado para NTPDase1 recombinante de *T. cruzi*, não observamos inibição da rLbNTPDase2 pela quercetina. Além disso, os derivados IL-18 e IL-35-f1, foram capazes de inibir 44,33% e 24,87% da atividade da LbNTPDase2, em concentração menor de substrato (500 μ M), respectivamente. Para estes compostos a presença do substrato parece modificar a capacidade inibitória e pode indicar um perfil de inibição competitivo. Contudo tal constatação ainda requer uma investigação mais aprofundada sobre a cinética da enzima na presença destes inibidores.

Avaliando a estrutura dos compostos, de forma geral, a adição de uma porção glicosídica promove um ganho de inibição como observado para os compostos IL-35-f1, IL-18, IL-06, IL-05 e IL-09. Contudo, o composto IL-24, que possui metilas nos anéis fenólicos não apresentou inibição mesmo em concentração baixa de substrato. Isso pode indicar que adição de metila dos grupamentos fenólicos leva a uma diminuição da capacidade de interação do composto. Interessantemente, há um ganho de inibição quando as metilas são associadas a grupamento glicosídico acetilado como demonstrado pelo composto IL-18, que apresentou inibição de 44,33%.

Os compostos IL-05 e IL-09, que apresentaram maior capacidade inibitória, possuem porção glicosídica e grupos benzilas (Bn) substituindo o hidrogênio das hidroxilas fenólicas. Considerando a alta inibição observada e a ausência de benzilas nos demais compostos, podemos inferir que a presença desse grupamento seja determinante para promover alta inibição. O grupo benzila possui maior raio e isso pode ser determinante na disposição espacial do composto na região de interação com a proteína.

6. CONCLUSÃO

Diante de tudo o que foi discutido até o momento, nossos resultados evidenciam que a rLbNTPdase2 possui características comuns a outras NTPDases, como presença de 5 regiões conservadas de apirase, hidrólise de substratos tri e difosfatados na presença de íons divalentes e ausência de hidrólise de AMP. Ainda, a enzima recombinante foi inibida por suramina e DIDS, conhecidos por inibir outras NTPDases.

O alto valor de K_m para os nucleotídeos testados sugere que seja improvável sua participação na desativação de receptores purinérgicos com baixo limiar de ativação. Contudo, é possível que essa atuação exista em nível de microambientes externos específicos onde haja a liberação maciça de nucleotídeos sinalizadores e onde as NTPDases e os purinoreceptores possam estar concomitantemente localizados proximamente. Além disso, suas características cinéticas sugerem importância no ambiente intracelular, onde há maior concentração de nucleotídeos. Adicionalmente, capacidade de hidrolisar ADP e ATP, sugere que a enzima pode modular a sinalização via geração de adenosina em atuação conjunta com a 5'-ectonucleotidase.

Avaliamos o potencial de inibição de compostos derivados da quercetina sobre a atividade enzimática. Alguns dos compostos testados foram capazes de inibir a rLbNTPdase2. Semelhante ao observado para NTPdase1 de *T. cruzi*, o composto IL-09 apresentou maior capacidade inibitória, reforçando seu potencial como possível inibidor de outras NTPDases.

Estudos futuros devem ser desenvolvidos a fim de elucidar a forma de interação deste composto na estrutura da enzima e assim fornecer informações que permitam o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose tegumentar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTOINE, J. C. et al. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 3, p. 779–787, 1990.
- ASAI, T. et al. Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 19, p. 11391–7, 1995.
- ASAI, T.; O’SULLIVAN, J. W.; TATIBANA, M. A Potent Nucleoside Triphosphate Hydrolase from the. **The Journal of biological chemistry**, v. 258, n. 11, p. 6816–6822, 1983.
- AZIM, M. et al. Therapeutic advances in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: A review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 3, p. 1–15, 2021.
- BALDISSARELLI, J. et al. Quercetin changes purinergic enzyme activities and oxidative profile in platelets of rats with hypothyroidism. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 84, p. 1849–1857, 2016.
- BARROS, F. S. et al. Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in *Entamoeba histolytica*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 375, n. 2, p. 304–314, 2000.
- BASTOS, M. S. et al. The expression of NTPDase1 and -2 of *Leishmania infantum* chagasi in bacterial and mammalian cells: Comparative expression, refolding and nucleotidase characterization. **Protein Expression and Purification**, v. 131, p. 60–69, 2017.
- BERRÊDO-PINHO, M. et al. A Mg-Dependent Ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and Its Possible Role in Adenosine Acquisition and Virulence. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 391, n. 1, p. 16–24, 2001.
- BISAGGIO, D. F. R. et al. Ecto-ATPase activity on the surface of *Trypanosoma cruzi* and its possible role in the parasite-host cell interaction. **Parasitology Research**, v. 91, n. 4, p. 273–282, 2003.
- BORGES-PEREIRA, L. et al. *Plasmodium falciparum* GFP-E-NTPDase expression at the intraerythrocytic stages and its inhibition blocks the development of the human malaria parasite. **Purinergic Signalling**, v. 13, n. 3, p. 267–277, 2017.
- BORGES, F. P. et al. Characterization of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity in *Trichomonas gallinae* and the influence of penicillin and streptomycin in extracellular nucleotide hydrolysis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 283, n. 2, p. 189–195, 2008.
- BOURS, M. J. L. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 112, n. 2, p. 358–404, 2006.
- BRADFORD, M. M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BURCHMORE, R. J. S.; BARRETT, M. P. Life in vacuoles - Nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1311–1320, 2001.
- BURNSTOCK, G.; BOEYNAEMS, J. M. Purinergic signalling and immune cells. **Purinergic**

Signalling, v. 10, n. 4, p. 529–564, 2014.

CALDWELL, G. W. et al. The IC 50 Concept Revisited. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 1282–1290, 2012.

CALLAHAN, H. L. et al. Leishmania spp: Temperature sensitivity of promastigotes in vitro as a model for tropism in vivo. **Experimental Parasitology**, v. 84, n. 3, p. 400–409, 1996.

CAO, W. et al. Ecto-NTPDase CD39 is a negative checkpoint that inhibits follicular helper cell generation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 7, p. 3422–3436, 2020.

CHAVES, M. M. et al. Leukotriene B 4 Modulates P2X7 Receptor–Mediated Leishmania amazonensis Elimination in Murine Macrophages . **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 10, p. 4765–4773, 2014.

CORRÊA, G. et al. Activation of the P2X7 receptor triggers the elimination of Toxoplasma gondii tachyzoites from infected macrophages. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 6, p. 497–504, 2010.

CORRIDEN, R. et al. Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (E-NTPDase1/CD39) regulates neutrophil chemotaxis by hydrolyzing released ATP to adenosine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 42, p. 28480–28486, 2008.

DA SILVA, W. et al. ENTPDases from Pathogenic Trypanosomatids and Purinergic Signaling: Shedding Light towards Biotechnological Applications. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 213–226, 2020.

DE SOUZA, A. C. A. et al. High Performance of ELISA test using recombinant rLiNTPDase2 from Leishmania infantum: a Phase II diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 209, n. January, p. 105535, 2020.

DE SOUZA LEITE, M. et al. Trypanosoma brucei brucei: Biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. **Experimental Parasitology**, v. 115, n. 4, p. 315–323, 2007.

DETONI, M. L. et al. An antigenic domain of the Leishmania amazonensis nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is associated with disease progression in susceptible infected mice. **Parasitology Research**, v. 112, n. 8, p. 2773–2782, 2013.

DI VIRGILIO, F.; VUERICH, M. Purinergic signaling in the immune system. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 191, p. 117–123, 2015.

DOSCH, M. et al. Mechanisms of ATP release by inflammatory cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 1–16, 2018.

EKMAN, PIA; JAGER, O. Quantification of subnanomolar amounts of phosphate bound to seryl and threonyl residues in phosphoproteins using alkaline hydrolysis and malachite green. **Analytical Biochemistry**, v. 214, p. 138–141, 1993.

FIETTO, J. L. R. et al. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of Trypanosoma cruzi. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, n. 2, p. 454–460, 2004.

FONSECA-SILVA, F. et al. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in Leishmania amazonensis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e14666, 2011.

- FONSECA-SILVA, F. et al. Reactive oxygen species production by quercetin causes the death of *Leishmania amazonensis* intracellular amastigotes. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 8, p. 1505–1508, 2013.
- FREITAS-MESQUITA, A. L.; MEYER-FERNANDES, J. R. 3'-nucleotidase/nuclease in protozoan parasites: Molecular and biochemical properties and physiological roles. **Experimental Parasitology**, v. 179, n. June, p. 1–6, 2017.
- GOMES, R. S. et al. E-NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) of *Leishmania amazonensis* inhibits macrophage activation. **Microbes and Infection**, v. 17, n. 4, p. 295–303, 2015.
- GOTTLIEB, M.; DWYER, D. M. Evidence for Distinct 5'- and 3'-nucleotidase activities in the surface membrane fraction of *Leishmania donovani* promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 7, p. 303–317, 1983.
- GRINTHAL, A.; GUIDOTTI, G. Substitution of His59 converts CD39 apyrase into an ADPase in a quaternary structure dependent manner. **Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 9–16, 2000.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.
- HASKÓ, G.; PACHER, P. Regulation of Macrophage Function by Adenosine. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 4, p. 865–869, 2012.
- HICKS-BERGER, C. A. et al. Expression and characterization of soluble and membrane-bound human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 (CD39L2). **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 44, p. 34041–34045, 2000.
- IVANENKOV, V. V.; MURPHY-PIEDMONTE, D. M.; KIRLEY, T. L. Bacterial expression, characterization, and disulfide bond determination of soluble human NTPDase6 (CD39L2) nucleotidase: Implications for structure and function. **Biochemistry**, v. 42, n. 40, p. 11726–11735, 2003.
- JHANDIER, M. N. et al. Portal fibroblasts regulate the proliferation of bile duct epithelia via expression of NTPDase2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 24, p. 22986–22992, 2005.
- KNOWLES, A. F. The GDA1_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. **Purinergic Signalling**, v. 7, n. 1, p. 21–45, 2011.
- KRUG, U. et al. Structural insight into activation mechanism of *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate diphosphohydrolases by disulfide reduction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 5, p. 3051–3066, 2012.
- KUKULSKI, F. et al. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. **Purinergic Signalling**, v. 1, p. 193–204, 2005.
- LANGSTON, H. P. et al. Secretion of IL-2 and IFN- γ , But Not IL-4, by Antigen-Specific T Cells Requires Extracellular ATP. 2003.
- LEITE, P. M. et al. Ecto-Nucleotidase Activities of Promastigotes from *Leishmania (Viannia) braziliensis* Relates to Parasite Infectivity and Disease Clinical Outcome. v. 6, n. 10, 2012.
- MAGEZ, S. et al. Tumor necrosis factor alpha is a key mediator in the regulation of experimental *Trypanosoma brucei* infections. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 6, p. 3128–

3132, 1999.

MAIA, A. C. R. G. et al. Leishmania infantum amastigote nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase 1): Its inhibition as a new insight into mode of action of pentamidine. **Experimental Parasitology**, v. 200, n. February, p. 1–6, 2019.

MAIOLI, T. et al. Immune response induced by New World Leishmania species in C57BL / 6 mice. **Parasitology Research**, v. 94, p. 207–212, 2004.

MAMANI-MATSUDA, M. et al. Quercetin Induces Apoptosis of Trypanosoma brucei gambiense and Decreases the Proinflammatory Response of Human Macrophages. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 924–929, 2004.

MARCUS, A. J. et al. The Endothelial Cell Ecto-ADPase Responsible for Inhibition of Platelet Function is CD39. v. 99, n. 6, p. 1351–1360, 1997.

MARIOTINI-MOURA, C. et al. Trypanosoma cruzi nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion. **Acta Tropica**, v. 130, n. 1, p. 140–147, 2014.

MARIOTINI-MOURA, C. **Estudo biológico e bioquímico das NTPDases de Trypanosoma cruzi e Leishmania infantum chagasi e busca por novos compostos para o tratamento da Doença de Chagas.** [s.l.: s.n.].

MARQUES-DA-SILVA, E. D. A. et al. Extracellular nucleotide metabolism in Leishmania: influence of adenosine in the establishment of infection. **Microbes and Infection**, v. 10, p. 850–857, 2008.

MARR, J. J.; BERENS, R. L.; NELSON, D. J. Purine metabolism in leishmania donovani and leishmania braziliensis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 544, n. 1978, p. 360–371, 1978.

MEYER-FERNANDES, J. R. et al. Mg-dependent ecto-ATPase activity in Leishmania tropica. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 341, n. 1, p. 40–46, 1997.

MURPHY-PIEDMONTE, D. M.; CRAWFORD, P. A.; KIRLEY, T. L. Bacterial expression, folding, purification and characterization of soluble NTPDase5 (CD39L4) ecto-nucleotidase. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1747, n. 2, p. 251–259, 2005.

NOVAIS, F. O.; AMORIM, C. F.; SCOTT, P. Host-Directed Therapies for Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. March, p. 1–8, 2021.

PAES-VIEIRA, L. et al. Differential regulation of E-NTPdases during Leishmania amazonensis lifecycle and effect of their overexpression on parasite infectivity and virulence. **Parasitology International**, v. 85, 2021.

PANUPINTHU, N. et al. P2X7 nucleotide receptors mediate blebbing in osteoblasts through a pathway involving lysophosphatidic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 5, p. 3403–3412, 2007.

PELLEGATTI, P. et al. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: In vivo imaging with plasma membrane luciferase. **PLoS ONE**, v. 3, n. 7, p. 1–9, 2008.

PINHEIRO, C. M. et al. Leishmania amazonensis: Biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. **Experimental Parasitology**, v. 114, n. 1, p. 16–25, 2006.

PIRMEZ, C. Immunopathology of American Cutaneous Leishmaniasis. **Memórias do**

Instituto Oswaldo Cruz, v. 87, n. V, p. 105–109, 1992.

PORCINO, G. N. et al. Leishmania (Viannia) braziliensis nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1): Localization and in vitro inhibition of promastigotes growth by polyclonal antibodies. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 293–299, 2012.

PORCINO, G. N. **NTPDase 1 de Leishmania braziliensis como alvo terapêutico: Imunolocalização em formas promastigotas e amastigotas e susceptibilidade à leishmanicidas**. [s.l.] Universidade Federal de Juiz de Fora, 2016.

QUIÑONEZ-DÍAZ, L. et al. Effect of ambient temperature on the clinical manifestations of experimental diffuse cutaneous leishmaniasis in a rodent model. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 10, p. 851–860, 2012.

REZENDE-SOARES, F. A. et al. Cytochemical localization of ATP diphosphohydrolase from Leishmania (Viannia) braziliensis promastigotes and identification of an antigenic and catalytically active isoform. **Parasitology**, v. 137, n. 5, p. 773–783, 2010.

RIBEIRO, I. C. **Avaliação de possíveis inibidores da NTPDase-1 de Trypanosoma cruzi e clonagem das NTPDases 1 e 2 DE Leishmania infantum chagasi em sistema LEXSY**. [s.l.: s.n.].

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 409–430, 2006.

ROCKENBACH, L. et al. Alterations in the extracellular catabolism of nucleotides are involved in the antiproliferative effect of quercetin in human bladder cancer T24 cells. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 31, n. 7, p. 1204–1211, 2013.

ROSKOSKI, R. Modulation of enzyme activity. **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**, v. 2, p. 1–11, 2007.

SALEHI, B. et al. Therapeutic Potential of Quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health. **ACS Omega**, v. 5, n. 20, p. 11849–11872, 2020.

SAMBROOK, J. F.; RUSSELL, D. W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 1,2 and 3, p. 2231, 2001.

SANSOM, F. M. et al. Golgi-Located NTPDase1 of Leishmania major Is Required for Lipophosphoglycan Elongation and Normal Lesion Development whereas Secreted NTPDase2 Is Dispensable for Virulence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, 2014.

SANTOS, R. F. et al. Influence of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase Activity on Trypanosoma cruzi Infectivity and Virulence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 3, 2009.

SAVIO, L. E. B. et al. The P2X7 receptor in inflammatory diseases: Angel or demon? **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. FEB, 2018.

SINHA, P. et al. Magnesium-Dependent Ecto-ATP Diphosphohydrolase Activity in Leishmania donovani. **Current Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 811–819, 2016.

SMITH, T. M.; LEWIS CARL, S. A.; KIRLEY, T. L. Mutagenesis of two conserved tryptophan residues of the E-type ATPases: Inactivation and conversion of an ecto-apyrase to an ecto-NTPase. **Biochemistry**, v. 38, n. 18, p. 5849–5857, 1999.

TASDEMIR, D. et al. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: In vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1352–1364, 2006.

VASCONCELLOS, R. D. S. et al. Leishmania infantum Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 is an Apyrase Involved in Macrophage Infection and Expressed in Infected Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, p. e3309., 2014.

VASCONCELOS, E. G. et al. Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from Schistosoma mansoni: Immunological cross-reactivities with potato apyrase and Toxoplasma gondii nucleoside triphosphate hydrolase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 36, p. 22139–22145, 1996.

VOLPEDO, G. et al. Mechanisms of Immunopathogenesis in Cutaneous Leishmaniasis And Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL). **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. June, p. 1–16, 2021.

WINKEL-SHIRLEY, B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 3, p. 218–223, 2002.

ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. 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**, v. 105, n. 19, p. 6882–6887, 2008.

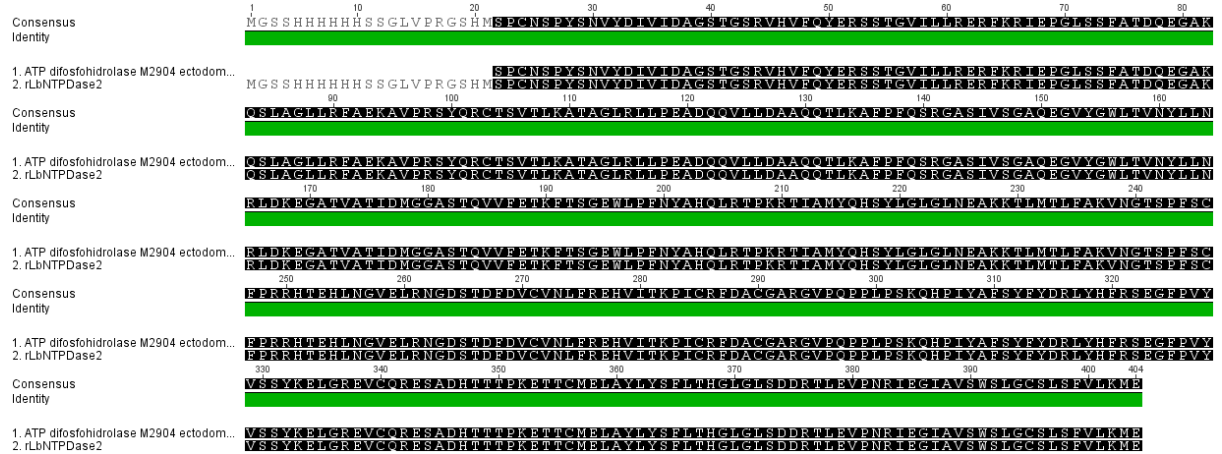
ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 362, n. 4–5, p. 299–309, 2000.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases : Some Recent Developments and a Note on Nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, p. 44–56, 2001.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 3, p. 437–502, 2012.

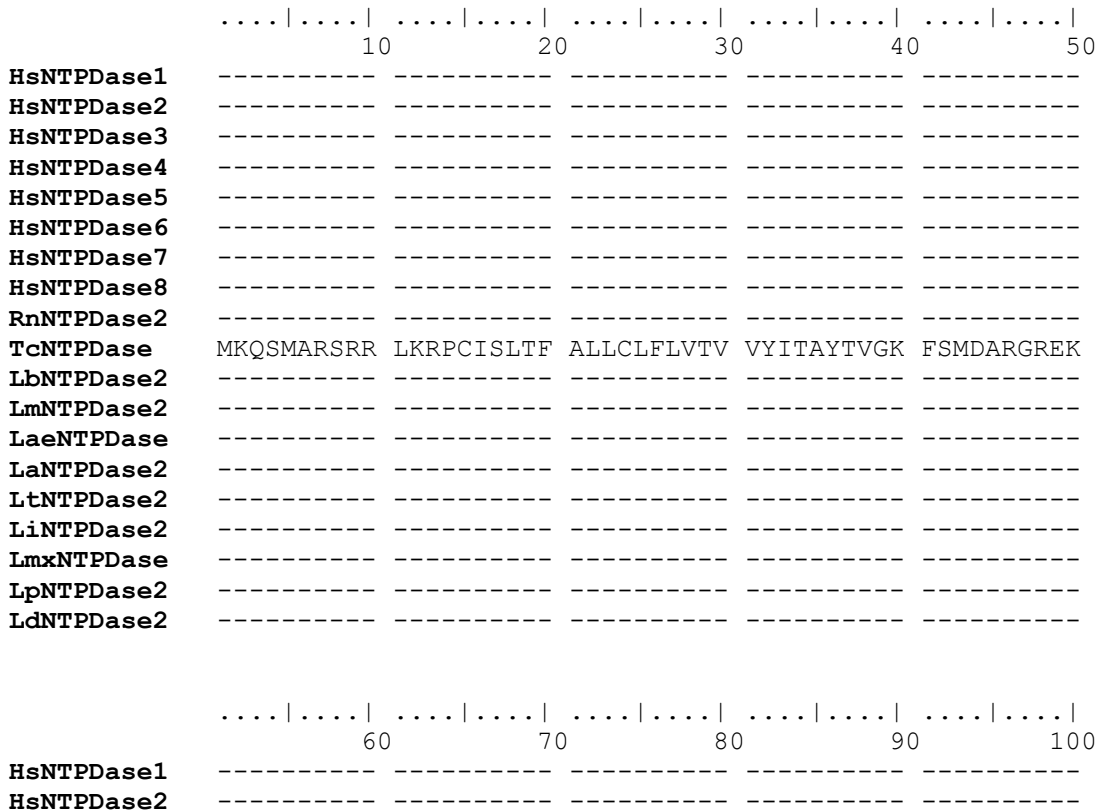
ANEXOS

ANEXO A: Alinhamento de sequências usando o programa Geneious 6.0.6. Para o alinhamento foram utilizadas as sequências do ectodomínio da ATP difosfohidrolase 2 de *Leishmania braziliensis* M2904 (LbrM.15.0030) e da rLbNTPDase2.



ANEXO B: Alinhamento de sequências no Clustal W o software MEGA X, versão 10.2.5.

Alignment: C:\Users\NANCY\Desktop\align.fas



```

HsNTPDase3 -----
HsNTPDase4 -----
HsNTPDase5 -----
HsNTPDase6 -----
HsNTPDase7 -----
HsNTPDase8 -----
RnNTPDase2 -----
TcNTPDase  LDLDTRIIHS MTKRFQECQA QKQLLNKNGHT TARMALEIAQ ETKKKLEMELE
LbNTPDase2 -----
LmNTPDase2 -----
LaeNTPDase -----
LaNTPDase2 -----
LtNTPDase2 -----
LiNTPDase2 -----
LmxNTPDase -----
LpNTPDase2 -----
LdNTPDase2 -----

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          110          120          130          140          150

```

```

HsNTPDase1 -----MEDTK ESNVKTFCCK NILAILGFSS
HsNTPDase2 -----MAGKV RS----- --LLPPLLLA
HsNTPDase3 -----MF TVLTRQPCEQ AGLKALYRTP TIIALVLLLV
HsNTPDase4 SCLFPASWHF SISPVGCPRI LNTNLRQIMV ISVLAAAVSL LYFSVVIIRN
HsNTPDase5 -----LV VSCVCS----- ---AVSHRNQ QTWFEIGIFLS
HsNTPDase6 RKISNHGSLR VAKVAYP--- --LGLCVGVF IYVAYIKWHR ATATQAFFSI
HsNTPDase7 SYLCPASWYF TVPTV-SPFL R----QRVAF LGLFFISCLL LLMLIIDFRH
HsNTPDase8 -----MGLSR KE-----Q VFLALLGASG
RnNTPDase2 -----MAGKL VS----- --LVPPLLLA
TcNTPDase  GLMRNRNTLM LQSVVECKKE LELLKENGRG AVTLALQLDR LTKERQFYMD
LbNTPDase2 -----
LmNTPDase2 -----MRPYSS VRRMTQOSKR LRVASTLVLS
LaeNTPDase -----MRPYSS VRRMTQOSKR LRVAGTLVLS
LaNTPDase2 -----MRPYSS VRRMTQOSKR LRVAGTLVLS
LtNTPDase2 -----MRPYSS VRRMTQOSKR LRVASTLVLS
LiNTPDase2 -----MRPYSS VRRMTQOSKR LRIAGTLVLS
LmxNTPDase -----MRPYSS VRRMTQOSKR LRVAGTLVLS
LpNTPDase2 -----MRPYSS VRRMTQOSNR LRVIGALVLS
LdNTPDase2 -----MRPYSS VRRMTQOSKR LRIAGTLVLS

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          160          170          180          190          200

```

```

HsNTPDase1 IIAVIA----- ---LLAVGLT QN-KALPENV
HsNTPDase2 AAGLAG----- ---LLLLCVP TRDVREPPAL
HsNTPDase3 SIVVLV----- ---SITVIQI HKQEVLPPGL
HsNTPDase4 KYGRLTRDK- -----KF QRYLARVTDI EATDTNNPNV
HsNTPDase5 S-----MCP INVSAS---T
HsNTPDase6 TRAAPGA--- ---RWGQQAHS LGTAADGHEV
HsNTPDase7 WSASLPRDR- -----QY ERYLARVGEL EATDTEDPNL
HsNTPDase8 VSGLTA----- ---LILLLVE ATSVLLPTDI
RnNTPDase2 AAGLTG----- ---LLLLCVP TQDVREPPAL
TcNTPDase  AIAVNGSSD VGRRQTADV AAIAKEFDEW EDAAQNKTEL LTNCNNAMR-
LbNTPDase2 -----SPCNSPYSN
LmNTPDase2 ALVIFG----- -FLVYHQSP L FSPCDSAYAN
LaeNTPDase ALVVFG----- -FLVYHQSP L FSPCDSAYAN
LaNTPDase2 ALVLFG----- -FVVYHKSPL FSPCDSAYAN
LtNTPDase2 ALVIFG----- -FLVYHQSP L FSPCDSAYAN
LiNTPDase2 ALVIFG----- -FLVYHQSP L FSPCDSAYAN
LmxNTPDase VLVLFG----- -FIVYHKSPL FSPCDSAYAN

```


TcNTPDase	RRIG---REH	AEAVLDVVR	LFARGPFWMQ	SELDVSRILE	GWEEGPLAWL
LbNTPDase2	RLLP---EAD	QQVLLDAAQQ	TLKAFPFQSR	----GASIVS	GAQEGVYGWL
LmNTPDase2	RLLP---ESA	QQALLDVAQH	TLNASPFQSR	----GASIIIS	GAQEGVYGWL
LaeNTPDase	RLLP---ESV	QQVLLDAAQH	TLNASPFQSR	----GASIIIS	GAQEGVYGWL
LaNTPDase2	RLLP---ESD	QQVMLDAAQQ	ALNASPFQSR	----GASIIIS	GAQEGVYGWL
LtNTPDase2	RLLP---ESV	QQVLLDAAQH	TLNASPFQSR	----GASIIIS	GAQEGVYGWL
LiNTPDase2	RLLP---ESV	QQVLLDAAQH	TLNASPFQSR	----GASIIIS	GAQEGVYGWL
LmxNTPDase	RLLP---ESD	QQVLLDAAQQ	ALNASPFQSR	----GASIIIS	GAQEGVYGWL
LpNTPDase2	RLLP---EAD	QQVLLDAAQQ	TLKAFPFQSR	----GASIVS	GAQEGVYGWL
LdNTPDase2	RLLP---ESV	QQVLLDAAQH	TLNASPFQSR	----GASIIIS	GAQEGVYGWL

....|....||....||....||....||....|
 360 370 380 390 400

HsNTPDase1	TINYLLGKFS	QKTRW-----	-----FSIVP	YETNNQETFG	ALDLGGASTQ
HsNTPDase2	TANYLLENFI	KYG-----	-----WVGRW	FRP-RKGTLG	AMDLGGASTQ
HsNTPDase3	TANYLMGNFL	EKN-----	-----LWHMW	VHPHGVETTG	ALDLGGASTQ
HsNTPDase4	GINFVLGRFE	HIEDDDEAVV	EVNIPGSESS	EAIVRKRTAG	ILDMGGVSTQ
HsNTPDase5	TVNFLTGQLH	GHRQ-----	-----	-----ETVG	TLDLGGASTQ
HsNTPDase6	TINFLTGSLK	TPGG-----	-----	-----SSVG	MLDLGGGSTQ
HsNTPDase7	GINFVLGRFD	HEDESDAEAT	QELAAG-----	----RRRTVG	ILDMGGASLQ
HsNTPDase8	TVNYGLGTLV	KYS-----	-----FTGEW	IQPPEEMLVG	ALDMGGASTQ
RnNTPDase2	TANYLLENFI	KYG-----	-----WVGRW	IRP-RKGTLG	AMDLGGASTQ
TcNTPDase	TVNYLLGALN	GDK-----	-----	-----NTAT	ILDLGGGSTQ
LbNTPDase2	TVNYLLNRLD	KEG-----	-----	-----ATVA	TIDMGGASTQ
LmNTPDase2	TVNYLLDRLD	TDV-----	-----	-----ATVA	TIDMGGASTQ
LaeNTPDase	TVNYLLDRLD	TDV-----	-----	-----ATVA	TIDMGGASTQ
LaNTPDase2	TVNYLLDRLD	TDV-----	-----	-----ATIA	TIDMGGASTQ
LtNTPDase2	TVNYLLDRLD	TDV-----	-----	-----ATVA	TIDMGGASTQ
LiNTPDase2	TVNYLLNRLD	TDV-----	-----	-----ATVA	TIDMGGASTQ
LmxNTPDase	TVNYLLDRLD	TDV-----	-----	-----ATIA	TIDMGGASTQ
LpNTPDase2	TVNYLLNRLD	KEG-----	-----	-----ATVA	TIDMGGASTQ
LdNTPDase2	TVNYLLNRLD	TDV-----	-----	-----ATVA	TIDMGGASTQ

....|....||....||....||....||....|
 410 420 430 440 450

HsNTPDase1	VTFVPQNQ--	-----	--TIESPDNA	LQFRLYGKDY	NVYTHSFLCY
HsNTPDase2	ITFETTSP--	-----	--AEDRA-SE	VQLHLYGQHY	RVYTHSFLCY
HsNTPDase3	ISFVAGEK--	-----	--MDLNSTDI	MQVSLYGYVY	TLYTHSFQCY
HsNTPDase4	IAYEVPKTVS	FASSQQEEVA	KNLLAEFNLG	CDVHQTEHVY	RVYVATFLGF
HsNTPDase5	ITFLPQFEK-	-----	TLEQTPRGYL	TSFEMFNSTY	KLYTHSYLGF
HsNTPDase6	IAFLPRVEG-	-----	TLQASPPGYL	TALRMFNRTY	KLYSYSYGLL
HsNTPDase7	IAYEVPTSTS	VLPKQEEAA	KILLAEFNLG	CDVQTEHVY	RVYVTTFLGF
HsNTPDase8	ITFVPPGP--	-----	--ILDKS-TQ	ADFRLYGSDY	SVYTHSYLCF
RnNTPDase2	ITFETTSP--	-----	--SEDPG-NE	VHLRLYGQHY	RVYTHSFLCY
TcNTPDase	IVMHPSDP--	-----	KAIEAYAEFS	YALKVNGRSF	VVYQHSYEGN
LbNTPDase2	VVFETKFT--	-----	SGEWLPFNYA	HQLRTPKRTI	AMYQHSYLGL
LmNTPDase2	VVFETTPT--	-----	SGEWLPFNYA	YQLRTPKRTI	AMYQHSYLGL
LaeNTPDase	VVFETTPT--	-----	SGEWLPFNYA	HQLRTPKRTI	AMYQHSYLGL
LaNTPDase2	VVFETTPT--	-----	SGEWLPFNYA	HQLRILKRTI	SVYQHSYLGL
LtNTPDase2	VVFETAPT--	-----	SGEWLPFNYA	HQLRTPKRTI	AMYQHSYLGL
LiNTPDase2	VVFETTPT--	-----	SGEWLPFNYA	HQLRTPKRTI	TMYQHSYLGL
LmxNTPDase	VVFETTPT--	-----	SGEWLPFNYA	HQLRIPKRTI	SVYQHSYLGL
LpNTPDase2	VVFETKFT--	-----	SGEWLPFNYA	HQLRTPKRTI	AMYQHSYLGL
LdNTPDase2	VVFETTPT--	-----	SGEWLPFNYA	HQLRTPKRTI	TMYQHSYLGL

....|....||....||....||....||....|
 460 470 480 490 500

HsNTPDase1	GKDQALWQKL	AKDIQVASNE	-----	-----	-----ILRDP
-------------------	------------	------------	-------	-------	------------

HsNTPDase2	GRDQVLQRLL	ASALQTHG--	-----	-----	-----	FHP
HsNTPDase3	GRNEAEKKFL	AMLLQNSPTK	N-----	-----	-----	HLTNP
HsNTPDase4	GGNAARQRYE	DRIFANTIQ-	-----	-----	-----	KNRLL
HsNTPDase5	GLKAARLATL	GALETEGT--	-----	-----	---	DGHTFRSA
HsNTPDase6	GLMSARLAIL	GGVEGQPAK-	-----	-----	---	DGKELVSP
HsNTPDase7	GGNFARQRYE	DLVLNETLN-	-----	-----	-----	KNRLL
HsNTPDase8	GRDQMLSRL	VGLVQSRPAA	-----	-----	-----	LLRHP
RnNTPDase2	GRDQILLRLL	ASALQIHR--	-----	-----	-----	FHP
TcNTPDase	GLHAAKEQLL	QAVAANNTGA	NSKVQEANKI	ATGTEATPGA	SADVAVDAFP	
LbNTPDase2	GLNEAKKTL	TLFAKVNG--	-----	-----	-----	TSPFS
LmNTPDase2	GMNEAKKRL	TLFAEANG--	-----	-----	-----	TLSFP
LaeNTPDase	GMNEAKKKLM	TSFAEANG--	-----	-----	-----	TSSFP
LaNTPDase2	GMNEAKKKLM	TLFAEANG--	-----	-----	-----	TSSFP
LtNTPDase2	GMNEAKKKLM	TSFAEANG--	-----	-----	-----	TSSFP
LiNTPDase2	GMNEAKKKLM	MSFAEANG--	-----	-----	-----	TSSFP
LmxNTPDase	GMNEAKKKLM	TLFAEANG--	-----	-----	-----	TSSFP
LpNTPDase2	GLNEAKKTL	TLFAKVNG--	-----	-----	-----	TSSFS
LdNTPDase2	GMNEAKKKLM	MSFAEANG--	-----	-----	-----	TSSFP

....|....||....||....||....||....|

510 520 530 540 550

HsNTPDase1	CFHPGYKKVV	NVSDLYKTPC	TKRFEMTLP-	-FQQFEIQGI	GNYQQCHQSI
HsNTPDase2	CWPRGFSTQV	LLGDVYQSPC	TMAQRPQNFN	SSARVSLSGS	SDPHLCRDLV
HsNTPDase3	CYPRDYSISF	TMGHVFDSL	TVDQRPESYN	PNDVITFEGT	GDPSLCKEKV
HsNTPDase4	GKQTGLTPDM	PYLDPCLPLD	IKDEIQQNG-	--QTIYLRGT	GDFDLCRETI
HsNTPDase5	CLPRWLEAEW	IFGGVKYQYG	GNQ-----	-----EGE	VGFEPCYAEV
HsNTPDase6	CLSPSFKGEW	EHA EVT YRVS	GQK-----	-----AAA	SLHELCAARV
HsNTPDase7	GQKTGLSPDN	PFLDPCLPVS	LTDVVERNS-	--QVLHVRGR	GDWVSCGAML
HsNTPDase8	CYLSGYQTTL	ALGPLYESP	VHATPPLSL-	-PQNLTVEGT	GNPGACVSAI
RnNTPDase2	CWPKGYSTQV	LLQEVYQSPC	TMGQRPRAFN	GSAIVSLSGT	SNATLCRDLV
TcNTPDase	CFPKG YVHTE	TGISNTRDGG	KVP-----	-----SME	ECSALFRRHV
LbNTPDase2	CFPRRHTEHL	NGVELR--NG	DST-----	-----DFD	VCVNLFREHV
LmNTPDase2	CFPRGYTKRV	NGVELR--NS	DAT-----	-----DFN	ACAGLFREHV
LaeNTPDase	CFPRGYTKRL	NDVELR--NS	DAT-----	-----DFD	ACAGLFREHV
LaNTPDase2	CFPRGYTKHL	NDVKLR--NN	DAT-----	-----DFD	ACVGLFREHV
LtNTPDase2	CFPRGYTKRL	NDVELR--NS	DAT-----	-----DFD	ACAGLFREHV
LiNTPDase2	CFPRGYAKRL	NDVELR--NS	DAT-----	-----DFD	ACAGLFREHV
LmxNTPDase	CFPRGYTKHL	NGVELR--NS	DAT-----	-----DFD	ACVGLFREHV
LpNTPDase2	CFPRGHTEHL	NGVELR--NG	DST-----	-----DFD	VCVNLFREHV
LdNTPDase2	CFPRGYAKRL	NDVELR--NS	DAT-----	-----DFD	ACAGLFREHV

....|....||....||....||....||....|

560 570 580 590 600

HsNTPDase1	LELFNTSYCP	-YSQCAFNGI	FLPPLQGD--	--FGAFSAFY	FVMKFLN--L
HsNTPDase2	SGLFSFSSCP	-FSRCSFNGV	FQPPVAGN--	--FVAFAFF	YTVDFLR--T
HsNTPDase3	ASIFDFKACH	DQETCSFDGV	YQPKIKGP--	--FVAFAGFY	YTASALN--L
HsNTPDase4	QPFMNK---T	NETQTSLNGV	YQPIHFQ-N	SEFYGFSEFY	YCTEDV----
HsNTPDase5	LRVVR-----	-----GKL	HQPEEVQR--	GSFYAFSYYY	DRAVDTDMID
HsNTPDase6	SEVLQ-----	-----NRV	HRTEEVKH--	VDFYAFSYYY	DLAAGVGLID
HsNTPDase7	SPLLAR---S	NTSQASLNGI	YQSPIDFN-N	SEFYGFSEFF	YCTEDV----
HsNTPDase8	RELFNFSSCQ	GQEDCAFQDGV	YQPLRGQ--	--FYAFSNFY	YTFHFLN--L
RnNTPDase2	SRLFNISSCP	-FSQCSFNGV	FQPPVAGN--	--FIAFAFY	YTVDFLT--T
TcNTPDase	VRKHQP---C	VSNCSGFNGV	FQPDISAVPM	VPVYAFSFFY	DRLKPY----
LbNTPDase2	ITKPI----C	RFDACGARGV	PQPLPSK-Q	HPIYAFSFFY	DRLYHF----
LmNTPDase2	ITTST----C	KFDACGARGV	PQPLFPSR-R	HPIYAFSFFY	NRLYDF----
LaeNTPDase	ITTST----C	KFDACGARGV	PQPLFPSR-R	HPIYAFSFFY	DRLYHF----
LaNTPDase2	ITTST----C	RFDACGARGV	PQPLFPSR-R	HPVYAFSFFY	DRLYHF----
LtNTPDase2	ITTST----C	KFDACGARGV	PQPLFPSR-R	HPIYAFSFFY	DRLYHF----
LiNTPDase2	ITKTT----C	KFDACGARGV	PQPLFPSR-R	HPIYAFSFFY	DRLYHF----

LmxNTPDase ITTAT----C RFDACGARGV PQPLFPSR-R HPVYAFSYFY DRLYHF----
LpNTPDase2 ITKPI----C RFDACGARGV PQPPLPSK-Q HPIYAFSYFY DRLYHF----
LdNTPDase2 ITKTT----C KFDACGARGV PQPLFPSR-R HLIYAFSYFY DRLYHF----

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
610 620 630 640 650

HsNTPDase1 TSEKVS--QE KVTEMMKKFC AQP-----W EEIKTSYAGV KEKYLSEYCF
HsNTPDase2 SMGLPVATLQ QLEAAAVNVC NQT-----W AQLQARVPG- QRARLADYCA
HsNTPDase3 SGSFS---LD TFNSSTWNFC SQN-----W SQLPLLLPKF DEVYARSYCF
HsNTPDase4 LRMGGDYNAA KFTKAAKDYC ATKWSILRER FDRGLYASHA DLHRLKYQCF
HsNTPDase5 YEKGGILKVE DFERKAREVC D-----NLEN FTSGSPFLCM
HsNTPDase6 AEKGGSLVVG DFEIAAKYVC R-----TLET QPQSSPFSCM
HsNTPDase7 LRIGGRYHGP TFAKAAQDYC GMAWSVLTQR FKNGLFSSHA DEHRLKYQCF
HsNTPDase8 TSRQP---LS TVNATIWEFC QRP-----W KLVEASYPG- QDRWLRDYCA
RnNTPDase2 VMGLPVGTLK QLEEATEITC NQT-----W TELQARVPG- QKTRLADYCA
TcNTPDase IKD-EVIRVQ DVLDIASQVC RSMK-SVREL LEQNDTKKNK GSLKPEMECF
LbNTPDase2 RSEGFVYVS SYKELGREVC Q-----RESADH TTPKETTCM
LmNTPDase2 LKEGSQVYVS SYKEVGQEV H-----RESARR TTAPEETACM
LaeNTPDase RKEGGPVYVS SYKEVGQEV H-----RESARR TTAPEETACM
LaNTPDase2 HKEGRPVYVS LYKEVGKEVC H-----RESASR ATTPEETACM
LtNTPDase2 RKEGSPVYVS SYKEVGREVC H-----RESARQ TTAPEETACM
LiNTPDase2 SKEGSPVYVS SYKEVGQEV H-----RESARR TTAPEETACM
LmxNTPDase HKEGRPVYVS LYKEVGKEVC H-----RESASR ATTPEETACM
LpNTPDase2 RSEGFVYVS SYKELGREVC Q-----RESADQ TTPKETACM
LdNTPDase2 SKEGSPVYVS SYKEVGQEV H-----RESARR TTAPEETACM

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
660 670 680 690 700

HsNTPDase1 SGTIILSLLL QGYHFTADSW EHIHFIGKIQ GSDAGWTLGY MLNLTNMI PA
HsNTPDase2 GAMFVQQLLS RGYGFDERAF GGVIFQKKA DTAVGWALGY MLNLTNLI PA
HsNTPDase3 SANYIYHLFV NGYKFTEETW PQIHFEKEVG NSSIAWSLGY MLSLTNQI PA
HsNTPDase4 KSAWMFEVFH RGFSPVFN-Y KSLKTALQVY DKEVQWTLGA ILYRTRFLPL
HsNTPDase5 DLSYITALLK DGFGFADS-- TVLQLTKKVN NIETGWALGA TFHLLQSLGI
HsNTPDase6 DLTYSVLLLQ E-FGFPRS-- KVLKLTRKID NVETSWALGA IFHYIDSLNR
HsNTPDase7 KSAWMYQVLH EGFHFYPD-Y PNLRTAQLVY DREVQWTLGA ILYKTRFLPL
HsNTPDase8 SGLYILTLLH EGYGFSEETW PSLEFRKQAG GVDIGWTLGY MLNLTGMIP A
RnNTPDase2 VAMFIHQLLS RGYHFDERSF REVVFQKKA DTAVGWALGY MLNLTNLI PA
TcNTPDase ELSYLFLLR YGFGFPPE-- QKLHIAKKIN GFETAWALGA SLVSLEGQSA
LbNTPDase2 ELAYLYSFLT HGLGLSDD-- RTLEVPNRIE GIAVSWSLGC SLSFVLKME-
LmNTPDase2 ELAYMYSFLT YGLGLSDA-- TVLTPNRIE GMAVSWSLGS SLSFLLKME-
LaeNTPDase ELAYMYSFLT YGLGLSDA-- TALTVPNRIK GMAVSWCLGS SLSFLLKME-
LaNTPDase2 ELAYLYSFLT NGLGLGDD-- TALTVPNRIA GMSVSWSLGS SLSFLLKME-
LtNTPDase2 ELAYMYSFLT YGLGLSDA-- TALTVPNRIE GMAVSWSLGS SLSFLLKME-
LiNTPDase2 ELAYMYSFLT YGLGLSDA-- TALTVPNRIE GMAVSWSLGS SLSFLLKME-
LmxNTPDase ELAYLYSFLT NGLGLGDD-- TALTVPNRIA GMSVSWSLGS SLSFLLKME-
LpNTPDase2 ELAYLYSFLT HGLGLSDD-- RTLEVPNRIE GIAVSWSLGC SLSFVLMME-
LdNTPDase2 ELAYMYSFLT YGLGLSDA-- TALTVPNRIE GMAVSWSLGS SLSFLLKME-

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
710 720 730 740 750

HsNTPDase1 EQPLSTPLSH STYVFLMVLV SLVLFVVAII GLLIFHKPSY FWKDMV----
HsNTPDase2 DPP-GLRKG DTSSWVLLL LFAALLAAL VLLLRQVHSA KLPSTI----
HsNTPDase3 ESP-LIRLPI EPPVFVGTLA FFTAAALLCL AFLAYLCSAT RRRKHSEHAF
HsNTPDase4 RDIQQEAFRA SHTHWRGVSF VYNHYLFGSC FLVLLAILL YLLRLRRIHR
HsNTPDase5 SH-----
HsNTPDase6 QKSPAS----
HsNTPDase7 RDLRQEGVRQ AHGSWFRLSF VYNHYLFFAC ILVLLAIFL YLLRLRRIHH
HsNTPDase8 DAP-AQWRAE SYGVVAVV FMVLALVAVV GAALVQ---L FWLQD-----

RnNTPDase2	DLP-GLRKGT	HFSSWVALLL	LFTVLILAAL	VLLLRQVRS	KSPGAL----
TcNTPDase	-----	-----	-----	-----	-----
LbNTPDase2	-----	-----	-----	-----	-----
LmNTPDase2	-----	-----	-----	-----	-----
LaeNTPDase	-----	-----	-----	-----	-----
LaNTPDase2	-----	-----	-----	-----	-----
LtNTPDase2	-----	-----	-----	-----	-----
LiNTPDase2	-----	-----	-----	-----	-----
LmxNTPDase	-----	-----	-----	-----	-----
LpNTPDase2	-----	-----	-----	-----	-----
LdNTPDase2	-----	-----	-----	-----	-----

.....|.....||.....||..
 760 770

HsNTPDase1	-----	-----	-----
HsNTPDase2	-----	-----	-----
HsNTPDase3	DHAVDSD---	-----	-----
HsNTPDase4	RTPRSSS-AA	ALWMEEGLPA	QNAPGTL
HsNTPDase5	-----	-----	-----
HsNTPDase6	-----	-----	-----
HsNTPDase7	RQTRASAPLD	LLWLEEVVPM	MGVQVGP
HsNTPDase8	-----	-----	-----
RnNTPDase2	-----	-----	-----
TcNTPDase	-----	-----	-----
LbNTPDase2	-----	-----	-----
LmNTPDase2	-----	-----	-----
LaeNTPDase	-----	-----	-----
LaNTPDase2	-----	-----	-----
LtNTPDase2	-----	-----	-----
LiNTPDase2	-----	-----	-----
LmxNTPDase	-----	-----	-----
LpNTPDase2	-----	-----	-----
LdNTPDase2	-----	-----	-----