

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Gabriane Nascimento Porcino

**NTPDase 1 DE *Leishmania braziliensis* COMO UM ALVO
TERAPÊUTICO: IMUNOLOCALIZAÇÃO EM FORMAS
PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS E SUSCEPTIBILIDADE À
LEISHMANICIDAS**

Juiz de Fora

2016

Gabriane Nascimento Porcino

**NTPDase 1 DE *Leishmania braziliensis* COMO UM ALVO
TERAPÊUTICO: IMUNOLOCALIZAÇÃO EM FORMAS
PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS E SUSCEPTIBILIDADE À
LEISHMANICIDAS**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas na área de concentração Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eveline Gomes Vasconcelos

Juiz de Fora

2016

**NTPDase 1 DE *Leishmania braziliensis* COMO UM ALVO
TERAPÊUTICO: IMUNOLOCALIZAÇÃO EM FORMAS
PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS E SUSCEPTIBILIDADE À
LEISHMANICIDAS**

GABRIANE NASCIMENTO PORCINO

Tese de Doutorado submetida à banca examinadora do Curso Pós-graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas (Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias).

Aprovada em: ____/____/____.

Banca examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Eveline Gomes Vasconcelos - UFJF
(Orientadora)

Prof^ª. Dr^ª. Sivia Regina Costa Dias – ESTÁCIO
(Membro)

Prof^ª. Dr^ª. Ana Carolina Ribeiro Gomes Maia – FACSUM
(Membro)

Prof^ª. Dr^ª. Elaine Soares Coimbra - UFJF
(Membro)

Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Elaine de Almeida - UFJF
(Membro)

Prof^ª. Dr^ª. Antônio Ferreira Pereira - UFRJ
(Suplente)

Prof^ª. Dr^ª. Priscila de Faria Pinto - UFJF
(Suplente)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que colaboraram para a realização deste trabalho!

RESUMO

A atividade catalítica de nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase) foi recentemente caracterizada em promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Lb), e o domínio B (r82-121) antigênico e conservado, específico da NTPDase 1 foi identificado. Neste trabalho, anticorpos policlonais de camundongos produzidos contra dois peptídeos sintéticos derivados deste domínio (LbB1LJ, r82-103; LbB2LJ, r102-121), e anticorpos produzidos contra os peptídeos potB1LJ e potB2LJ, de alta identidade com LbB1LJ e LbB2LJ respectivamente, foram usados como ferramentas de estudo desta proteína. Os anticorpos anti-LbB1LJ ou anti-LbB2LJ, imobilizados em proteína A-Sepharose, imunoprecipitaram a NTPDase 1 de 48 kDa, e depletaram aproximadamente 40% da atividade fosfohidrolítica da preparação de Lb homogeneizada em detergente. Por imunocitoquímica e análise ultraestrutural, usando os anticorpos anti-LbB1LJ, anti-LbB2LJ ou anti-potB1LJ, a NTPDase 1 foi identificada na superfície, vesículas citoplasmáticas, mitocôndria, cinetoplasto, flagelo e bolsa flagelar, e núcleo de promastigotas. Em adição, a NTPDase 1 foi isolada de fração mitocondrial de promastigotas por gel não desnaturante, e sua expressão e identidade foram confirmadas por medidas de atividade enzimática, “Western blots” e espectrometria de massas. As atividades ATPásica e ADPásica da preparação de Lb homogeneizada em detergente foram parcialmente inibidas por anticorpos anti-LbB1LJ ou anti-potB1LJ (43-79%), sendo mais efetivos que a inibição por anticorpos anti-LbB2LJ ou anti-potB2LJ (18-60%). Em adição, os soros imunes anti-LbB1LJ ou anti-potB1LJ (67-73%) e anti-LbB2LJ ou anti-potB2LJ (33-40%) foram citotóxicos, reduzindo significativamente o crescimento de promastigotas *in vitro*. Em “Western blots” e por análises em microscópio confocal de varredura a laser, os anticorpos produzidos contra o domínio B confirmaram a expressão e identidade da NTPDase 1 em amastigotas intracelulares e, também, amastigotas livres recuperadas de células Vero. Em conjunto, os resultados apontam o domínio B conservado da NTPDase 1 de *Leishmania (V.) braziliensis* como um importante alvo para o desenho de inibidores e a aplicação potencial dessas biomoléculas em protocolos experimentais de controle da leishmaniose. Os ácidos N-alquilaminoalcanotiosulfúricos (AAATs), os quais não têm efeito citotóxico *in vitro* ou *in vivo*, reduziram a proliferação *in vitro* de amastigotas intracelulares, sendo os mais efetivos o SIPA, SSEC e IBSS com CI_{50} de 24-35 μ M. O NPSO, SXIP e TBSO foram menos efetivos com CI_{50} de 54 a >100 μ M. Com exceção do TBSO, todos os outros AAATs inibiram parcialmente a atividade ATPásica e/ou ADPásica da preparação de promastigotas. O SIPA foi também um efetivo leishmanicida quando testado sobre amastigotas recuperadas de células Vero, com CI_{50} 20 μ M e, em adição, foi capaz de reduzir as atividades ATPásica e ADPásica de homogeneizado destes parasitos sugerindo um K_i de 10-100 μ M. Além disso, SIPA 30 μ M reduziu significativamente 28% do potencial de membrana mitocondrial, podendo ser este um dos mecanismos pelo qual os AAATs são leishmanicidas. A NTPDase 1 pode ter um papel fundamental na atividade mitocondrial, uma nova hipótese a ser explorada, e ser o alvo dos AAATs, os quais foram testados pela primeira vez em tripanosomatídeos e caracterizados neste trabalho como novos compostos leishmanicidas.

Palavras chave: *Leishmania braziliensis*, NTPDase, peptídeo, anticorpo, compostos leishmanicidas, ácidos N-alquilaminoalcanotiosulfúricos

ABSTRACT

Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) activity was recently characterized in *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes (Lb), and an antigenic conserved B domain (r82-121) from the specific NTPDase 1 isoform was identified. In this work, mouse polyclonal antibodies produced against two synthetic peptides belonging to this domain (LbB1LJ, r82-103; LbB2LJ, r102-121), and antibodies produced against peptides potB1LJ and potB2LJ, with high identity to the LbB1LJ and LbB2LJ respectively, were used as tools for studies of this protein. The anti-LbB1LJ or anti-LbB2LJ antibody, immobilized on Protein A-Sepharose, immunoprecipitated the NTPDase 1 of 48 kDa and depleted approximately 40% of the phosphohydrolytic activity from detergent-homogenized Lb preparation. By ultrastructural immunocytochemical microscopy, using anti-LbB1LJ, anti-LbB2LJ or anti-potB1LJ antibody, the NTPDase 1 was identified on the surface, subcellular cytoplasmic vesicles, mitochondria, kinetoplast, flagellum and flagellar pocket, and nucleus of promastigotes. In addition, the NTPDase 1 was isolated from the promastigotes mitochondrial fraction by non-denaturing gel, and its expression and identity were confirmed by enzyme activity measurements, Western blots and mass spectrometry. The ATPase and ADPase activities of detergent-homogenized preparation were partially inhibited by anti-LbB1LJ or anti-potB1LJ antibody (43-79%), which was more effective than that inhibition by anti-LbB2LJ or anti-potB2LJ antibody (18-60%). In addition, the immune sera anti-LbB1LJ or anti-potB1LJ (67-73%) and anti-LbB2LJ or anti-potB2LJ (33-40%) were cytotoxic, and significantly reduce the promastigotes growth *in vitro*. By Western blots and confocal microscopy laser scanning analyses, the antibodies produced against B domain confirmed the expression and identity of the intracellular amastigotes NTPDase 1 and, also, in free amastigotes recovered from Vero cells. All taken together, the results appoint the conserved B domain from the *L. (V.) braziliensis* NTPDase 1 as an important target for inhibitor design and the potential application of these biomolecules in experimental protocols of disease control. The N-alkylaminoalkanethiosulfuric acids, which did not have *in vitro* or *in vivo* cytotoxic effect, reduced *in vitro* intracellular amastigotes proliferation, the most effective being the SIPA, SSEC and IBSS, with IC₅₀ 24-35 μM. The NPSO, SXIP and TBSO were less effective, with IC₅₀ 54 to >100 μM. TBSO exception, all the other AAATs partially inhibited the ATPase and/or ADPase activity from the promastigotes preparation. The SIPA also was an effective antileishmanial when tested on the amastigotes recovered from the Vero cells, with IC₅₀ 20 μM and, in addition, it was capable to reduce the ATPase and ADPase activities from the homogenized of these parasites suggesting a Ki 10-100 μM. Furthermore, SIPA 30 μM significantly reduced 28% of the mitochondrial membrane potential, and it could be one of the mechanisms by which AAATs are antileishmanial compounds. The NTPDase 1 may play a key role in the mitochondrial activity, a new hypothesis to be explored, and target of AAATs, which were tested for the first time on the trypanosomatids and characterized in this work as new antileishmanial compounds.

Keywords: *Leishmania braziliensis*, NTPDase, peptides, antibody, antileishmanial compounds, N-alkylaminoalkanethiosulfuric acids

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	A <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> e a leishmaniose cutânea.....	15
1.2	Tratamento da leishmaniose cutânea.....	17
1.3	Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase).....	19
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivos gerais	23
2.2	Objetivos específicos	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Obtenção de apirase de batata, peptídeos sintéticos, r-potDomínio B e desenvolvimento de anticorpos policlonais.....	25
3.2	Obtenção de promastigotas e preparação de proteínas.....	26
3.3	Ensaio de imunoprecipitação e “Western blot”.....	26
3.4	Imunocitoquímica ultraestrutural.....	27
3.5	Efeitos dos anticorpos policlonais de camundongos anti-peptídeos sobre a atividade fosfohidrolítica de preparação de promastigotas.....	28
3.6	Atividade leishmanicida <i>in vitro</i> de soros imunes contendo anticorpos policlonais anti-peptídeos.....	29
3.7	Obtenção de fração mitocondrial de promastigotas.....	29
3.8	Purificação da NTPDase 1 de homogeneizado total ou fração mitocondrial enriquecida de <i>L. (V.) braziliensis</i> por eletroforese em gel de poliácridamida não-desnaturante e identificação por “Western blot”.....	30
3.9	Identificação da NTPDase 1 de fração mitocondrial enriquecida de <i>L. (V.) braziliensis</i> por espectrometria de massas.....	31
3.10	Cultivo e manutenção de células Vero e recuperação de amastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	32
3.11	Identificação da NTPDase 1 em amastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> por “Western blots”.....	34
3.12	Identificação da NTPDase 1 em formas amastigotas intracelulares ou livres de <i>L. (V.) braziliensis</i>	35
3.13	Síntese dos ácidos alquilaminoalcanotiosulfúricos (AAATs)	36
3.14	Efeitos dos AAATs sobre a proliferação de formas promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis in vitro</i>	37
3.15	Citotoxicidade dos compostos AAATs em macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c.....	38
3.16	Avaliação dos compostos AAATs em amastigotas intracelulares de <i>L. (V.) braziliensis</i>	39
3.17	Medida da atividade fosfohidrolítica na presença dos AAATs.....	40
3.18	Avaliação dos efeitos do SIPA sobre as formas amastigotas livres de <i>L. (V.) braziliensis</i>	40
3.19	Avaliação dos efeitos do SIPA sobre o potencial de membrana mitocondrial de formas amastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	41

4.	RESULTADOS	42
4.1	Identificação da isoforma NTPDase 1 de <i>L. (V.) braziliensis</i> por ensaios de imunoprecipitação.....	42
4.2	Imunolocalização da NTPDase 1 de promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> por microscopia eletrônica utilizando os anticorpos anti-LbB1LJ e anti-LbB2LJ	45
4.3	Efeitos dos anticorpos policlonais de camundongo anti-LbB1LJ e anti-LbB2LJ sobre a atividade da NTPDase 1 de preparação de promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	45
4.4	Atividade leishmanicida dos anticorpos anti- LbB1LJ e anti- LbB2LJ.....	47
4.5	Imunolocalização da NTPDase 1 de promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> por microscopia eletrônica utilizando anticorpos anti-potB1LJ.....	48
4.6	Efeitos dos anticorpos policlonais de camundongo anti- potB1LJ e anti- potB2LJ sobre a atividade da NTPDase 1 de preparação de promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	50
4.7	Atividade leishmanicida dos anticorpos anti-potB1LJ e anti-potB2LJ.....	51
4.8	Obtenção de fração mitocondrial de promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> e identificação da NTPDase 1 por espectrometria de massas.....	52
4.9	Identificação da NTPDase 1 em formas amastigotas intracelulares de <i>L. (V.) braziliensis</i> por imunocitoquímica e microscopia confocal de varredura.....	56
4.10	Identificação da NTPDase 1 de formas amastigotas obtidas de células Vero infectadas com <i>L. (V.) braziliensis</i> utilizando “Western blots”.....	58
4.11	Identificação da NTPDase 1 nas formas amastigotas obtidas de células Vero infectadas com <i>L. (V.) braziliensis</i> utilizando imunocitoquímica e microscopia confocal de varredura.....	60
4.12	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade leishmanicida de derivados dos ácidos alquilaminoalcanotiosulfúricos (AAATs).....	63
4.13	Efeitos de derivados dos AAATs sobre a atividade fosfolitolítica de promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	66
4.14	Efeitos dos SIPA sobre amastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> recuperadas de células Vero.....	69
4.15	Efeitos do SIPA sobre a atividade fosfolitolítica de preparação de amastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	69
4.16	Efeitos do SIPA sobre o potencial de membrana mitocondrial de forma amastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	71
5.	DISCUSSÃO	72
5.1	Localização imunocitoquímica da NTPDase1 de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> e efeitos dos anticorpos anti-peptídeos.....	72
5.2	Atividade leishmanicida e inibição da atividade NTPDásica de formas promastigotas e amastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> pelos ácidos alquilaminoalcanotiosulfúricos (AAATs).....	78
6	PERSPECTIVAS	85
7	REFERÊNCIAS	86
	ANEXOS	101

LISTA DE FIGURAS

Figura I	Cultivo de células Vero e infecção com <i>L. (V.) braziliensis</i>	33
Figura II	Ácidos alquilaminoalcanotiosulfúricos (AAATs).....	37
Fugura III	2,2'-Ditiobis-[N-(1-metilpropil)-1-octanamina-derivado dissulfeto do SSEC.....	79
Figura 1	Depleção da atividade fosfohidrolítica de preparação de promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	43
Figura 2	Reatividade da NTPDase 1 de promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> com anticorpos policlonais anti-peptídeos.....	44
Figura 3	Microscopia eletrônica mostrando a localização da NTPDase 1 em <i>L. braziliensis</i>	46
Figura 4	Inibição da atividade NTPDásica 1 em promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> por anticorpos anti-LbB1LJ e anti-LbB2LJ.....	47
Figura 5	Atividade leishmanicida dos anticorpos anti-LbB1LJ e anti-LbB2LJ.....	48
Figura 6	Microscopia eletrônica mostrando a localização da NTPDase 1 em promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> usando soro imune anti-potB1LJ.....	49
Figura 7	Inibição da atividade NTPDásica 1 de promastigotas por anticorpos anti-potB1LJ e anti-potB2LJ.....	50
Figura 8	Atividade leishmanicida dos anticorpos anti-potB1LJ e anti-pot B2LJ	51
Figura 9	Identificação da NTPDase 1 de promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> em fração mitocondrial enriquecida	53
Figura 10	Atividade ATPásica e ADPásica de homogeneizado total ou fração mitocondrial enriquecida de promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	54
Figura 11	Identificação da NTPDase 1 de <i>L. (V.) braziliensis</i> por espectrometria de massas.....	55
Figura 12	Identificação de NTPDase 1 em forma amastigota de <i>L. (V.) braziliensis</i>	57
Figura 13	Identificação da NTPDase 1 de amastigota de <i>L. (V.) braziliensis</i>	59
Figura 14	Identificação da NTPDase 1 em amastigota de <i>L. (V.) braziliensis</i> por imunocitoquímica utilizando soro imune anti-LbB1LJ.....	61
Figura 15	Identificação da NTPDase 1 em amastigota de <i>L. (V.) braziliensis</i> por imunocitoquímica utilizando soro imune anti-LbB2LJ.....	62
Figura 16	Ação dos derivados AAATs sobre amastigotas intracelulares de <i>L. (V.) braziliensis</i>	65
Figura 17	Inibição da atividade NTPDásica 1 de preparação de promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> pelo SIPA, SSEC, IBSS, NPSO, SXIP ou TBSO.....	68
Figura 18	Inibição da atividade NTPDásica da preparação de amastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> recuperadas de células Vero por SIPA	70
Figura 19	SIPA induz alterações nno potencial de membrana mitocondrial de formas amastigotas <i>L. (V.) braziliensis</i>	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade de derivados AAATs por macrófagos e dos efeitos destes compostos sobre a proliferação de promastigotas e amastigotas intracelulares.....	64
Tabela 2	Avaliação <i>in vitro</i> do efeito do derivado SIPA sobre amastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> recuperadas de células Vero.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

®	Marca registrada
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
°C	graus Celsius
AAATs	Ácidos alquilaminotiosulfúricos
ACRs	Apyrase Conserved Regions
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
BLASTp	"Basic Local Alignment Search Tool Protein"
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CC ₅₀	Concentração citotóxica média
CI ₅₀	Concentração inibitória média
cm ²	Centrímetros quadrado
C12E9	éter monododecil glicol nonaetileno
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol
DCCD	N,N'-Diciclohexilcarbodiimida
DIC	Contraste interferencial – Normaski
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidade Ótica
DP	Desvio Padrão
DTT	Ditiotreitol
ELISA	"enzyme-linked immunosorbent assay" (teste imunoenzimático)
E-NTPDase	Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase
E-NTP	Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
<i>g</i>	Força gravitacional
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IgG	Imunoglobulina da classe G

kDa	Quilo Dalton
LC	Leishmaniose cutânea
LV	Leishmaniose visceral
MOPS	Ácido propanosulfônico 3-(N-morfolino)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólico
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NCBI	“National Center Biotechnology Information”
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	dihidrocloreto de o-fenilenodiamina
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
M	Molar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
m/v	massa/volume
nm	Nanômetro
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
NDPase	Nucleosídeo difosfato hidrolase
NTPase	Nucleosídeo trifosfato hidrolase
NTPDase	Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pi	Fosfato inorgânico
RPM	Rotações por minuto

ROS	Espécie reativa de oxigênio
SBF	Soro fetal bovino
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS- Page	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano

LISTA DE ANEXOS

A- Cartas de ética para pesquisa em animais.

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

C- MAIA, A.C.; PORCINO, GN.; DETONI, M.L.; EMÍDIO, N.B.; MARCONATO, D.G.; FARIA-PINTO, P.; FESSEL, M.R.; REIS, A.B.; JULIANO, L.; JULIANO, M.A.; MARQUES, M.J.; VASCONCELOS, E.G. 2013. An antigenic domain within a catalytically active *Leishmania infantum* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is a target of inhibitory antibodies. **Parasitology International**, **62(1)**: 44-52.

D- DETONI, M.L.; FESSEL, M.R.; MAIA, A.C.R.G; PORCINO, G.N.; QUELLIS, L.R.; FARIA-PINTO, P.; MARQUES, M.J.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; DINIZ, V.A.; CÔRTE-REAL, S.; GONÇALVES-DA-COSTA, S.C.; SOUZA, C.S.; VASCONCELOS, E.G. 2013. An antigenic domain of the *Leishmania amazonensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is associated with disease progression in susceptible infected mice. **Parasitol Research**, **112(8)**: 2773-82.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A *Leishmania (V.) braziliensis* E A LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses estão entre as seis doenças mais negligenciadas do mundo e, geralmente ocorre em locais mais pobres com destaque para países em desenvolvimento, contribuindo para estabelecimento e manutenção da desigualdade social.

A infecção primária da leishmaniose é causada por diversos parasitos de espécies do gênero *Leishmania* da família Trypanosomatidae, os quais são transmitidos para o humano por meio da picada de fêmeas dos mosquitos *Lutzomyia* e *Phlebotomus* durante o repasto sanguíneo, os quais são espécies pertencentes à ordem Díptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. Ao picar a pele o mosquito injeta formas promastigotas do parasito que são fagocitados pelo macrófago e/ou outras células fagocíticas mononucleadas. Os amastigotas replicam-se dentro das células e as rompem infectando assim outras células. O mosquito, ao picar o hospedeiro, ingere as células infectadas com formas amastigotas que são transformadas em promastigotas no intestino do inseto e migram para a probóscide, infectando outras pessoas por meio da picada (DAVI et al. 2009; OMS, 2010; TOLEDO et al. 2013).

Entretanto, em décadas recentes, tem sido evidenciada a existência de vias alternativas de transmissão envolvendo contato direto com tecidos infectados em diversas situações. Visto que a leishmaniose não é considerada uma doença que pode ser transmitida entre indivíduos sem a intervenção de uma espécie vetor, testes de laboratório para a presença desses parasitos não são realizados, por exemplo, em potenciais doadores antes de procedimentos terapêuticos mais invasivos. No caso de pacientes com imunodeficiência, a possibilidade de contrair a doença é significativamente aumentada. Além disso, durante a gravidez, variações no sistema imune podem permitir a transmissão do parasito da mãe para o feto. A infecção maternal-fetal pode, também, ter origem sexual. O compartilhamento de seringa é outra importante fonte de infecção entre os dependentes toxicológicos.

Profissionais dos setores de saúde e pesquisa devem ser também considerados como população de risco na aquisição dessa doença. Considerando que o período de latência do parasito dentro do hospedeiro pode durar um ano, existem mais indivíduos infectados do que casos reportados. Desta forma, há necessidade do sistema de saúde avaliar a situação global no que tange a transmissão da leishmaniose e a implementação de estratégias que reduzam a exposição do indivíduo a infecções por *Leishmania* (AVILA-GARCÍA et al. 2014).

As duas principais formas clínicas das leishmanioses são a visceral (LV) e a cutânea (LC), porém é observado um amplo espectro clínico destas doenças devido à grande diversidade de parasitos e, também, dos vetores (OMS, 2010).

As Leishmanioses estão distribuídas geograficamente entre 98 países dentro dos continentes da América, Europa, Ásia, África e Austrália e, a OMS estima que ocorre de 200 a 400 mil casos de LV humana, e de 700 mil a 1,2 milhões de casos de LC humana anualmente. A LC é distribuída mais amplamente, com um terço ocorrendo na região das Américas, Bacia do Mediterrâneo, oeste e centro da Ásia (ALVAR et al. 2012).

A LC possui diferentes formas clínicas, incluindo localizada, disseminada, difusa e mucosa, sendo que uma proporção variável de infecções são assintomáticas (MINISTERIO DA SAÚDE, 2007; RANGEL e LAINSON, 2009). Geralmente é causada por úlceras cutâneas no local da picada do mosquito, entretanto, os parasitos podem também fazer metástases e produzir lesões mucosas, geralmente na boca, nariz, faringe e laringe. O envolvimento da mucosa pode ocorrer simultaneamente à doença cutânea (forma mucocutânea) ou meses a anos depois da cura espontânea ou induzida por tratamento das lesões cutâneas (forma mucosa). As situações envolvendo a mucosa são graves, uma vez que podem levar a destruição da mesma com cicatrizes desfigurantes (PIRMEZ, 1992; LEITE et al. 2012; ROQUELINE et al. 2014).

Os mecanismos que levam a diversidade da apresentação clínica não são bem conhecidos, embora fatores como o envolvimento da resposta imune do hospedeiro e um número limitado de parasitos, ultimamente, têm sido reconhecidos como importantes (BACELLAR et al. 2002; FARIA et al. 2005; GIUDICE et al. 2007; TUON et al. 2008; RAMASAWMY et al. 2010; BOAVENTURA et al. 2010; VENDRAME et al. 2010; MARETTI-MIRA et al. 2011).

Um agente frequente de LC no Novo Mundo é a *L. (V.) braziliensis*, que pode causar tanto a forma disseminada quanto a forma mucocutânea, e é um grande problema de saúde na América Latina, em países como Brasil, Bolívia, Peru, Venezuela e Guatemala, sendo no Brasil a espécie responsável pela maioria dos casos de LC humana (GONZALEZ et al. 2009; PANIZ et al. 2013).

Nos seres humanos, a resistência à infecção por *L. (V.) braziliensis* está associada com o estabelecimento inicial de uma resposta imune T helper do tipo 1, juntamente com o controle das respostas inflamatórias exacerbadas (BACELAR et al. 2002; ANTONELLI et al. 2004; FARIA et al. 2005; LEITE et al. 2012). Em modelos de infecção murina, tem sido demonstrado que o interferon gama (IFN- γ), em sinergia com outras citocinas derivadas de macrófagos, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), atua na ativação de macrófagos para a síntese de óxido nítrico (NO), um potente agente microbicida que leva a morte do parasito (LIEW et al. 1990; BODGAN et al. 2000; LEITE et al. 2012).

1.2 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Embora os antimoniais pentavalentes permaneçam a primeira escolha na terapia para a maioria dos casos de leishmanioses, incluindo LC no Novo Mundo causada por *L. (V.) braziliensis*, eles não são efetivos contra todas as espécies de *Leishmania*. São administrados por via parenteral e têm uma significativa toxicidade sistêmica. Outros fármacos, incluindo pentamidina, miltefosina, anfotericina B deoxicolato e anfotericina B liposomal, são também limitados por uma eficácia variável e efeitos colaterais graves, alertando para a busca de opções mais eficazes e melhor toleradas (GONZALEZ et al. 2009; SOUZA et al. 2011).

O imidazol e o triazol que são estruturalmente relacionados demonstraram atividade contra alguns tipos de LC (PANIZ et al. 2013; GONZÁLEZ et al. 2009; SOUZA et al. 2011). O fluconazol, um triazol sintético que tem uma longa meia-vida no plasma, é bem tolerado e ativo quando administrado por via oral (SOUZA et al. 2011), e tem mostrado ser promissor em alguns ensaios clínicos de tratamento de leishmaniose por espécies complexas, notadamente no Velho Mundo (SOUZA et al. 2011, MORIZOT et al. 2007). No Novo Mundo, não há consistência entre os

resultados de tratamento com o fluconazol. Souza e colaboradores (2011) relataram que em pacientes com LC do estado do Ceará, Brasil, onde a *L. (V.) braziliensis* é endêmica, obtiveram taxas de cura de 89 ou 100% fazendo uso das doses de 5 e 8 mg/Kg/dia, respectivamente. Entretanto, Schnedl e colaboradores (2007) relataram que três casos de LC, de Belize, causada por espécie de *Leishmania* do Novo Mundo, não tiveram resposta com o uso de 200 mg/dia de fluconazol oral.

Uma importante limitação de muitos relatos é o fato do parasito não ser caracterizado molecularmente, visto que é essencial a determinação da susceptibilidade a azoles entre diferentes espécies de *Leishmania*. O resultado da susceptibilidade *in vitro* pode também ser ensaio-dependente. Rangel e colaboradores (1996) relataram que a cepa *L. braziliensis* 2903 pode ser naturalmente resistente a Cetoconazol e a outros inibidores de esterol C14 α -demetilase (ex bis-triazol D0870).

Devido ao conhecimento insuficiente a respeito da patogênese do parasito e a complexidade das respostas imunes necessárias para a proteção, uma vacina para leishmaniose humana ainda não foi desenvolvida de fato, e a quimioterapia ainda é a melhor escolha (REITHINGER et al. 2007; PALATNIK-DE-SOUSA, 2008; DE OLIVEIRA et al. 2009). A combinação de drogas, como os antimoniais, e agentes imunomoduladores tem sido sugerida como uma alternativa que poderia auxiliar no tratamento, aumentando desta forma a resposta imune específica contra a doença, e diminuindo o tempo de tratamento. Porém, o uso deste procedimento para o tratamento das leishmanioses necessita de melhor avaliação antes de sua inclusão na rotina clínica (MAYRINK et al. 2006; DALTON e KAYE, 2010).

O conhecimento a respeito da morfologia e metabolismo do parasito, da genética e resposta imune do hospedeiro aos antígenos da *Leishmania*, assim como a identificação de novos antígenos, são estudos ainda necessários para o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico, tratamento, vacina e/ou imunoterapia para a leishmaniose.

1.3 A NUCLEOSÍDEO TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASE (NTPDase)

A nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase; EC 3.6.1.5) é uma enzima encontrada em uma diversidade de organismos, incluindo plantas, invertebrados, fungos, parasitos e mamíferos, sendo também chamadas de apirase em plantas e ATP difosfohidrolase em parasitos. As proteínas que fazem parte da família das NTPDases hidrolisam nucleosídeos di- e trifosfatados aos respectivos nucleosídeos monofosfatados, sob a ativação de íons bivalentes (COIMBRA et al. 2002; FARIA-PINTO et al. 2004; KETTLUN et al. 2005; GUEVARA-FLORES et al. 2008; RUCKERT et al. 2010; KNOWLES, 2011; SANSOM, 2012).

As ações biológicas das NTPDases são relacionadas à regulação das concentrações de nucleotídeos em diversos processos fisiológicos como o sistema de sinalização purinérgica, e infectividade e/ou recuperação de purinas, e foram sugeridas como possíveis alvos para tratamentos de doenças (KIKUCHI et al. 2001; GENDRON et al. 2002; PINHEIRO et al. 2006; PENIDO et al. 2007; BURNSTOCK e VERKHRATSKY, 2009; SANTOS et al. 2009; MEYER-FERNANDES et al. 2010; SOUZA et al. 2010; TAN et al. 2010; SANSOM, 2012).

Em parasitos cuja síntese de purinas não é possível, como ocorre em *Leishmania*, a recuperação destas moléculas é feita do meio extracelular com a contribuição de ecto-NTPDases (MARR et al. 1978; LEITE et al. 2012). É comum o relato de sua presença associada a 5'-nucleotidases, enzimas que hidrolisam os nucleosídeos monofosfatados ao nucleosídeos correspondentes, que por sua vez são internalizados via transporte específico (YE e RAJENDRAM, 2009).

Alguns fatores de virulência tais como lipofosfoglicano (LPG), gp63 e outras proteases têm sido associados ao estabelecimento da infecção, com o parasitismo intracelular, bem como com a inibição da resposta imune do hospedeiro (MOSSER et al. 1997; CUERVO et al. 2006). Tem sido também relatado que o aumento nos níveis de ATP extracelular por células do sistema imune dispara resposta inflamatória, e a sua hidrólise por NTPDases e nucleotidases de parasitos e a resultante produção de adenosina, a qual atua sobre o receptor P1, modula a resposta imune inflamatória pelo aumento da concentração de cAMP intracelular, sendo por isso proteínas envolvidas nos mecanismos de evasão de parasitos ao

sistema imune do hospedeiro (IA SALA et al. 2003; HASKO et al. 2009; LEITE et al. 2012). Assim, componentes protéicos das vias de metabolismo de ATP extracelular a adenosina surgem também como candidatos para determinar a virulência destes parasitos, e são capazes de influenciar a resposta imunológica do hospedeiro e, em consequência, o estabelecimento do parasito (MARQUES-DA-SILVA et al. 2008; DE SOUZA et al. 2010; MEYER-FERNANDES et al. 2010; SOUZA et al. 2011; PALETTA-SILVA et al. 2012).

Para investigar o possível envolvimento da hidrólise da ecto-nucleotidase e, especialmente, a produção de adenosina no estabelecimento da infecção de *Leishmania*, a atividade ecto-nucleotidásica em promastigotas metacíclicos foi comparada a atividade entre três espécies de *Leishmania* causadora de LC (MARQUES-DA-SILVA et al. 2008). Os resultados mostraram que *L. amazonensis* possui maior atividade enzimática que *L. braziliensis* e *L. major*. Foi demonstrado, também, que o aumento dos níveis de adenosina em infecção por *L. braziliensis* está relacionado ao aumento do tamanho e atraso no controle da lesão e parasitismo (MARQUES-DA-SILVA et al. 2008).

Foi também relatado que formas promastigotas isoladas de lesões mucosas hidrolisam maior quantidade de nucleotídeos de adenosina que aquelas isolados de lesões cutâneas, sugerindo que a atividade NTPDásica pode influenciar no resultado da doença em pacientes com infecção por *L. (V.) braziliensis* (LEITE et al. 2012). Além disso, LEITE e colaboradores (2012) avaliaram a relação da NTPDase com o controle da resposta imune na infecção de camundongos C57BL/6J e macrófagos J774, bem como na infecção e ativação de células dendríticas. Estes autores detectaram que parasitos com elevada atividade enzimática são capazes de modular a resposta imune do hospedeiro pelo mecanismo de inibição de macrófagos microbicidas e ativação de células dendríticas (LEITE et al. 2012).

Recentemente, uma isoforma ativa e antigênica de NTPDase, a NTPDase 1, foi caracterizada em promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (REZENDE-SOARES et al. 2010), o primeiro estágio de interação hospedeiro-parasito que inclui modulação da resposta imune e sinalização hospedeiro-célula (CUERVO et al. 2009; DE SOUZA 2008). Por análises experimental e *in silico* foi identificado um domínio conservado particular, chamado B, na estrutura primária da NTPDase 1 de *L. (V.) braziliensis*, o qual é também compartilhado com as apirases de batata *Solanum tuberosum* e de outras plantas e, também, com NTPDases de outros organismos patogênicos de

distintas linhagens filogenéticas. O domínio B não está incluído entre os cinco domínios da estrutura primária que caracterizam a família das NTPDases, as “apyrase conserved regions” (ACRs), os quais estão envolvidos com o ciclo catalítico destas enzimas. O domínio B está localizado entre as ACR1 e ACR2, e foi associado à antigenicidade das NTPDases de diferentes espécies de *Leishmania* e, também, de *Schistosoma mansoni*, e acredita-se que tenha sido conservado durante a evolução fazendo parte dos mecanismos de evasão de parasitos ao sistema imune do hospedeiro (FARIA-PINTO et al. 2004, 2006, 2008, 2010a,b; COIMBRA et al. 2008; VASCONCELOS et al. 2009; REZENDE-SOARES et al. 2010; MAIA et al. 2011; MENDES et al. 2011).

Em análises preliminares, a localização da atividade NTPDásica em formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foi obtida por citoquímica ultraestrutural utilizando os substratos ATP, ADP e GDP, o que permitiu a detecção dos produtos de hidrólise pelos precipitados de grânulos eletrodensos de fosfato de cério na superfície e, pela primeira vez, na mitocôndria e cinetoplasto do parasito (REZENDE-SOARES et al. 2010; PORCINO, 2012). No entanto, esta técnica não distingue a NTPDase 1 e a hipotética GDPase (PEACOCK et al. 2007; XP_001562788), também anotada no genoma desse parasito, e que é também pertencente a família das NTPDases.

Dando prosseguimento aos estudos, anticorpos produzidos contra o r-potDomínio B, uma molécula recombinante derivada do domínio B (40 aminoácidos) da apirase de batata, foram utilizados como ferramentas para o isolamento da NTPDase 1 de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* por meio de técnicas de imunoprecipitação e identificação por “Western blots”. Por meio de imunocitoquímica ultraestrutural, utilizando os mesmos anticorpos, a NTPDase 1 foi localizada na superfície, vesículas subcelulares citoplasmáticas, mitocôndria, cinetoplasto e núcleo das formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (PORCINO, 2012) confirmando a ampla distribuição desta proteína no parasito (REZENDE-SOARES et al. 2010). Além disso, o r-potDomínio B foi reativo com soros de pacientes com LC, sugerindo a antigenicidade do domínio B, e os anticorpos produzidos contra este recombinante foram aptos a inibir a atividade NTPDásica de promastigotas e, também, a proliferação destes parasitos em experimentos *in vitro* (MAIA et al., 2011; PORCINO, 2012).

Motivados por estes resultados, foram obtidos peptídeos sintéticos LbB1LJ e LbB2LJ, derivados das porções N- e C-terminal do domínio B específico da NTPDase 1 de *L. (V.) braziliensis* e, também, potB1LJ e potB2LJ, peptídeos sintéticos derivados das porções N- e C-terminal do domínio B da apirase de batata *S. tuberosum*. A reatividade entre estes peptídeos e os anticorpos IgG e subtipos de soros de pacientes com LC, oriundos de diferentes áreas endêmicas, confirmou a antigenicidade e a presença de epitopos para células B em todo o domínio B da NTPDase 1 deste parasito (CARVALHO-CAMPOS, 2011).

Os avanços nos estudos desta proteína são demonstrados neste trabalho atual. Os anticorpos produzidos contra os peptídeos sintéticos LbB1LJ, LbB2LJ, potB1LJ e potB2LJ, derivados de domínio B de NTPDases foram utilizados para a identificação e localização específica da NTPDase 1 em formas promastigotas e/ou amastigotas de *L. (V.) braziliensis*.

A confirmação da expressão da NTPDase 1 em formas amastigotas motivou os estudos de novas drogas leishmanicidas e a caracterização desta proteína como um novo alvo na terapia contra a leishmaniose.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar a NTPDase 1 em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, e avaliar os efeitos leishmanicidas de derivados dos ácidos alquilaminoalcanotiosulfúricos (AAATs) e a susceptibilidade da NTPDase 1 a estes composto, caracterizando-a como um novo alvo terapêutico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Identificar a NTPDase 1 em homogeneizado de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* usando anticorpos anti-LbB1LJ ou anti-LbB2LJ em experimentos de imunoprecipitação e depleção de atividade enzimática, seguido de “Western blots”;

2.2.2 Localizar a NTPDase 1 em formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* utilizando anticorpos anti-LbB1LJ, anti-LbB2LJ e anti-potB1LJ por análise ultraestrutural e imunocitoquímica;

2.2.3 Avaliar o potencial de anticorpos anti-LbB1LJ, anti-LbB2LJ, anti-potB1LJ e anti-potB2LJ para inibir a atividade NTPDásica e a proliferação *in vitro* de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*;

2.2.4 Obter a fração mitocondrial de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, certificar a presença de atividade fosfolitica nesta fração e purificar a NTPDase 1 por meio de gel não desnaturante, identificando-a por atividade enzimática, “Western blots” usando anticorpos anti-LbB2LJ e espectrometria de massas;

2.2.5 Identificar a NTPDase 1 na forma amastigota intracelular de *L. (V.) braziliensis* por imunocitoquímica e microscopia confocal de varredura a laser usando anticorpos anti-LbB1LJ e anti-r-potDomínio B;

2.2.6 Recuperar formas amastigotas de células Vero infectadas com *L. (V.) braziliensis* e certificar a expressão de NTPDase 1 nestas formas livres por “Western blots”, usando anticorpos anti-LbB2LJ;

2.2.7 Identificar a NTPDase 1 em formas amastigotas recuperadas de células Vero por imunocitoquímica e microscopia confocal de varredura a laser usando anticorpos anti-LbB1LJ e anti-LbB2LJ;

2.2.8 Verificar o potencial leishmanicida de ácidos alquilaminoalcanotiosulfúricos (AAATs) contra formas promastigotas e amastigotas *in vitro* e, também, seus efeitos sobre a atividade fosfolitolítica de homogeneizado de promastigotas ou amastigotas;

2.2.9 Avaliar o efeito do SIPA, um derivado AAAT, sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DE APIRASE DE BATATA, PEPTÍDEOS SINTÉTICOS, r-potDomínio B E DESENVOLVIMENTO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

A apirase de batata foi purificada de linhagem comercial de *Solanum tuberosum* e usada para obter anticorpo policlonal em coelho branco da Nova Zelândia (FARIA-PINTO et al. 2004; KETTLUN et al. 2005).

Os peptídeos LbB1LJ (r82-103; REZENDE-SOARES et al. 2010) e LbB2LJ (r102-121), cujas sequências primárias compõem o domínio B conservado da NTPDase 1 de *L. (V.) braziliensis* (PEACOCK et al. 2007; NCBI XP_001562178.1; 47,689 Da), e os peptídeos potB1LJ (r77-98) e potB2LJ (r97-116) derivados do domínio B conservado da apirase de batata (HANDA E GUIDOTTI, 1996; NCBI P80595), foram obtidos por síntese em fase sólida como anteriormente descrito (KORKMAZ et al. 2008). Esses peptídeos abrangem o domínio B (r82-121) da NTPDase 1 de *L. (V.) braziliensis* sobrepondo dois aminoácidos no C-terminal em LbB1LJ e N-terminal em LbB2LJ. Eles mantêm os epitopos preditos para ligação de anticorpos (FARIA-PINTO et al. 2008; VASCONCELOS et al. 2009). O domínio B da apirase de batata (r78-117, EYFMATEPGLSSYAEDPKAAANSLEPLLDGAEGVVPQELQ) fusionado a uma cauda N-terminal de hexahistidina (r-potDomínio B) foi obtido por expressão heteróloga em *Escherichia coli* (MAIA et al. 2011).

Soros imunes contra cada peptídeo (10 µg) ou r-potDomínio B (25 µg) foram produzidos em camundongos BALB/c com sete semanas de vida, os quais foram injetados com a molécula emulsificada em adjuvantes Completo e Incompleto de Freund por via intra-peritoneal, com quinze dias de intervalo entre as injeções, como previamente descrito (MENDES et al. 2011). Além disso, amostras de soro obtidas de camundongos BALB/c inoculados com adjuvantes Completo e Incompleto de Freund, na ausência de peptídeos e nas mesmas condições experimentais, foram usadas como controle específico em todos os experimentos (MENDES et al. 2011). Os soros foram armazenados a -20°C.

O protocolo de estudo foi realizado de acordo com as regulamentações da “Brazilian National Council of Research in Animals” e foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil, processo n° 012/2011.

3.2 OBTENÇÃO DE PROMASTIGOTAS E PREPARAÇÃO DE PROTEÍNAS

Formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) foram obtidas como descrito por Marques e colaboradores (2006). Os parasitos foram coletados na fase estacionária de crescimento (10^6 parasitos/ml), lavados três vezes em tampão Tris-HCl 5 mM, pH 7,4, a 4°C, e centrifugados a $3000 \times g$ por 10 minutos. Os parasitos foram ressuspensos em Tris-HCl 5 mM, pH 7,4, acrescido de 8% de sacarose, leupeptina (0,5 µg/ml), pepstatina (0,07 µg/ml), inibidor de tripsina (50 µg/l) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (2 µg/ml). O rompimento da membrana e a liberação de antígenos foram obtidos por três ciclos de congelamento e descongelamento e um ciclo de ultrasonicação. Esta preparação foi centrifugada a $10000 \times g$ a 4°C por 15 minutos, e o sobrenadante foi armazenado a -80°C até o uso. A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY et al. 1951).

3.3 ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO E “WESTERN BLOTS”

Uma alíquota de preparação de promastigotas foi ressuspensa em meio de reação padrão contendo 50 mM de tampão MOPS, pH 7,4, 1 mM CaCl_2 , 100 µM de ortovanadato de sódio suplementado com 1 mg/mL de detergente não- iônico C12E9 e, depois, centrifugada a $10000 \times g$ por 10 minutos a 4°C. Soro imune policlonal de camundongo anti-LbB1LJ ou anti-LbB2LJ na diluição final 1:200 foi adicionado a alíquotas de sobrenadante (5 mg de proteína/mL), seguido de incubação por 3 horas à temperatura ambiente. Ensaio usando soro controle foram feitos em paralelo. A proteína A-Sepharose foi adicionada e incubada por 2 horas adicionais. Após

centrifugação em centrífuga clínica (FANEM Mod. 204N) por 5 minutos, o sobrenadante foi usado para medir a atividade fosfohidrolítica, em triplicata, em meio de reação padrão contendo MOPS 50 mM, pH 7,4, 1 mM CaCl₂, 100 µM de ortovanadato de sódio e 0,1 mg proteína/ml. A medida de atividade hidrolítica foi iniciada com a adição de 3 mM do substrato ATP ou ADP, incubada por 60 minutos a 37°C, e interrompida pela adição de 1 volume de HCl 0,1 N. A quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado foi determinada espectrofotometricamente de acordo com Taussky e Shorr (1953).

O complexo resina-anticorpo-antígeno, que foi sedimentado por centrifugação por 5 minutos, foi lavado três vezes em tampão MOPS, pH 7,4, solubilizado em tampão de gel de amostra e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e dodecil sulfato de sódio 0,1% (SDS-PAGE 10%), usando Mini-Protean III Cell (BioRad). As proteínas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose, que foi bloqueada (0,15 M de solução de tampão fosfato, pH 7,4, suplementada com 0,3% Tween-20 e 2% de caseína) usando procedimentos padrão (REZENDE-SOARES et al. 2010). Para evitar a reatividade com subunidades de IgG de camundongo, o “Western blots” foi feito incubando as membranas de nitrocelulose com o soro imune de coelho (diluído 1:1000) contendo anticorpos policlonais anti-apirase de batata, diluído no mesmo tampão de bloqueio sem Tween-20, por 12 h.

Alíquotas (100 µg de proteína total) de preparação de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram também submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e dodecil sulfato de sódio 0,1% (10%-PAGE), e as proteínas eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose. Em “Western blot” foi utilizado o soro imune policlonal de camundongo anti-LbB1LJ ou anti-LbB2LJ, diluído 1:200.

Os sinais foram revelados por quimioluminescência usando anticorpos secundários anti-IgG de coelho ou camundongo conjugados à peroxidase e, como substrato, o luminol, e exposição a filme de raio-X de acordo com as instruções do fabricante (ECL Western blotting System; GE Healthcare, Brazil).

3.4 IMUNOCITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL

Para análise por microscopia eletrônica de transmissão, promastigotas foram fixadas em solução recém-preparada de paraformaldeído 4%, glutaraldeído 0,1% e

ácido pícrico 0,2% em uma solução tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. As amostras foram desidratadas em metanol em temperaturas progressivamente menores, embebidas em resina Lowicryl K4M (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, US), e mantidas a -20°C. Cortes micrométricos foram coletados em grades de níquel (malha 300) e incubados por 30 minutos a 25°C em cloreto de amônio 50 mM em PBS 0,1 M, pH 8. Em seguida, os cortes foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente em PBS contendo BSA 3% e Tween 20 0,2 %, pH 8, e então incubados 12 horas na presença de soro imune anti-LbB1LJ, anti-LbB1LJ, anti-potB1LJ ou soro pré-imune, diluídos 1:100. As grades foram rinsadas em PBS-BSA e, finalmente, incubadas por 60 minutos em uma diluição 1:20 de anticorpos de cabra anti-IgG de camundongo conjugados com 10 nm de partículas de ouro (Sigma) (MATOS et al. 2010). As grades foram subsequentemente lavadas com PBS e água destilada, coradas com acetato de uranila e observadas em um microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 10C). Estes experimentos foram feitos na Plataforma de Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, com a colaboração da Dra. Suzana Corte Real, pesquisadora daquele Instituto.

3.5 EFEITOS DOS ANTICORPOS POLICLONAIS DE CAMUNDONGO ANTI-PEPTÍDEOS SOBRE A ATIVIDADE FOSFOHIDROLÍTICA DE PREPARAÇÃO DE PROMASTIGOTAS

Uma alíquota da preparação de promastigotas (6 mg de proteína/mL) de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) foi adicionada a um meio de reação padrão contendo tampão MOPS 50 mM, pH 7,4, CaCl₂ 1 mM, ortovanadato 100 μM, e suplementado com 1 mg/ml do detergente não-iônico C12E9, seguido de centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C. O soro de camundongo (diluição 1:200) contendo anticorpos policlonais anti-LbB1LJ, anti-LbB2LJ, anti-potB1LJ ou anti-potB2LJ foi adicionado a uma alíquota deste solubilizado. Esta mistura foi incubada por 3 horas à temperatura ambiente sob leve agitação. Ao final deste tempo, alíquotas foram usadas para a medida da hidrólise de ATP ou ADP, como descrito no item 3.3.

3.6 ATIVIDADE LEISHMANICIDA *in vitro* DE SOROS IMUNES CONTENDO ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

Formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (cepa MHOM/BR/1975/M2903; 3×10^6 células/ml) foram contadas em câmara de Neubauer e mantidos em placas de 96 poços de microtitulação em meio BHI, suplementado com L-glutamina, 10% de soro fetal bovino e 10% de urina, e incubados com o soro imune anti-LbB1LJ, anti-LbB2LJ, anti-potB1LJ ou anti-potB2LJ, na diluição 1:100 por 24 h. Promastigotas crescidas em meio de cultura na ausência de anticorpos, ou na presença de amostras de soro de camundongo ou coelho saudável diluídos 1:100 foram usados como controle. Todos os soros foram previamente incubados a 56 °C durante 30 minutos para completa inativação do sistema complemento. Os experimentos foram realizados três vezes e em triplicatas. A atividade leishmanicida foi determinada pelo método MTT, o qual é baseado na redução do sal tetrazólio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólico) por desidrogenases mitocondriais (MOSSMAN, 1983) como descrito anteriormente (COIMBRA et al. 2008). A absorbância foi medida a 570 nm (Multiskan EX-Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finlândia). A Anfotericina B foi usada como uma referência padrão. Os dados estatísticos foram analisados pelo método T student, e foram considerados significativos quando $P < 0,05$. Estes experimentos foram realizados com a colaboração da Prof^a. Dra. Elaine Soares Coimbra do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do ICB/UFJF.

3.7 OBTENÇÃO DE FRAÇÃO MITOCONDRIAL DE PROMASTIGOTAS

Para a obtenção de fração mitocondrial de promastigotas de *L. (V) braziliensis*, $6,96 \times 10^6$ células/mL foram ressuspensos em 1,125 mL de tampão THB para tripanosomatídeos (Tris- HCl 25 mM, pH 7,8, EDTA 1 mM, sacarose 0,6 M, DTT (ditiotretol) 1 mM, e coquetel de inibidores de proteases), suplementado com 125 µL de THB contendo 0,2 mg de digitonina/mg de extrato de proteína total (homogeneizado total). Após 2 minutos, as amostras foram centrifugadas a $10000 \times g$ por 10 minutos a 4° C, obtendo-se o sobrenadante contendo a fração citosólica, e

o “pellet”, correspondente a fração mitocondrial, conforme descrito previamente (HIDE et al. 2008). O conteúdo protéico foi medido no homogeneizado total e nas frações citosólica e mitocondrial (LOWRY et al. 1951), e as proteínas fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% com dodecil sulfato de sódio 0,1% (SDS-PAGE 10%) usando Mini-Protean III Cell (BioRad). Estas amostras foram também aplicadas em gel não desnaturante para o isolamento de NTPDase 1 de *L. (V.) braziliensis*.

3.8 PURIFICAÇÃO DA NTPDase 1 DE HOMOGENEIZADO TOTAL OU FRAÇÃO MITOCONDRIAL ENRIQUECIDA DE *L. (V.) braziliensis* POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NÃO DESNATURANTE E IDENTIFICAÇÃO POR “WESTERN BLOTS”

Uma alíquota de homogeneizado total ou fração mitocondrial enriquecida de *L. (V.) braziliensis* foi solubilizada em Tampão MOPS 50 mM, pH 7,4, suplementado com CaCl₂ 1 mM, Triton X-100 0,2% e DOC 0,2% e, após 10 minutos, foi adicionado tampão de amostra composto de Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, glicerol 10% e azul de bromofenol 5%. Alíquotas de 100 µg de proteína total foram aplicadas em poços de gel de poliacrilamida 6% com Triton X-100 (0,1% p/v) e deoxicolato de sódio (DOC; 0,1% p/v) e submetida à eletroforese a 130 V usando equipamento Mini-Protean III Cell (Bio Rad) por 4 horas a 4° C e tampão de corrida contendo estas mesmas concentrações de detergentes. Após a corrida, o gel foi lavado por 40 minutos em MOPS 50 mM, pH 7,4. Os poços foram cortados e incubados em MOPS 50 mM, pH 7,4, suplementado com ortovanadato de sódio 100 µM, CaCl₂ 10 mM e 5 mM do substrato ATP a 37°C. Após 2 h, precipitados de fosfato de cálcio brancos apareceram indicando uma atividade fosfohidrolítica *in situ*, e foram fotografados contra um fundo escuro.

A região do gel correspondente ao centro de atividade da banda foi cortada, eletroeluída, e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% com dodecil sulfato de sódio 0,1% (SDS-PAGE 10%). As proteínas foram coradas com Comassie blue e prata, ou eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas (tampão fosfato 0,15 M, pH 7,4, Tween 20 0,3% e caseína 2%) e,

em seguida, incubadas por 6 horas à temperatura ambiente com o soro imune policlonal de camundongo anti-anti-LbB2LJ (1:200) usando procedimentos padrão (MAIA et al. 2011). A revelação foi feita por quimioluminescência usando anticorpos secundários específicos acoplados à peroxidase e o Luminol como substrato (Kit ECL Western blotting System; GE Healthcare Life Sciences, São Paulo, Brasil) e exposição a filmes de raio X, seguindo as instruções do fabricante.

3.9 IDENTIFICAÇÃO DA NTPDase 1 DE FRAÇÃO MITOCONDRIAL ENRIQUECIDA DE *L. (V.) braziliensis* POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Outro gel não desnaturante foi realizado sob as mesmas condições experimentais descritas no item 3.8. Em cada poço (n= 8) foram aplicados 100 µg de fração mitocondrial enriquecida de promastigotas e após a corrida eletroforética, para remoção de detergentes, o gel foi lavado por 2 vezes durante 20 minutos em tampão MOPS 50 mM, pH 7,4, suplementado com CaCl₂ 10 mM. Após a lavagem, um poço foi cortado e o gel foi incubado com ATP para identificação da banda ativa de NTPDase 1 de *L. (V.) braziliensis*.

Após a revelação, a região do gel correspondente ao centro da banda ativa existente em cada um dos outros poços corridos em paralelo no mesmo gel foi cortada. Todos os recortes de banda foram reunidos (n= 7) e preparados para análise espectrométrica. O poço que foi usado para a revelação de banda ativa com o substrato ATP teve a banda cortada, a proteína eluída e submetida a SDS-PAGE 10%. O gel da eletroforese foi corado pela prata.

As bandas ativas provenientes de 700 µg de fração mitocondrial enriquecida de promastigotas foram submetidas aos procedimentos padrão para a análise dos polipeptídeos por espectrometria de massas (WESTERMEIER E NAVEN, 2002). Inicialmente, o “pool” de bandas foi desidratado com acetonitrila 100% por 3 vezes de 10 minutos. Em seguida, a amostra foi submetida à redução por incubação por 30 minutos a 60°C em tampão bicarbonato de amônio 100 mM, pH 8,0, suplementado com ditioneitol (DTT) 10 mM, em quantidade suficiente para cobri-la. Em seguida, esta solução foi descartada e a amostra foi submetida à alquilação incubando-a em tampão bicarbonato de amônio 100 mM, pH 8,0, contendo iodoacetamina 50 mM por

30 minutos, no escuro e à temperatura ambiente. Após a alquilação, o sobrenadante foi removido e a amostra foi lavada duas vezes com bicarbonato de amônio 100 mM, pH 8,0, e em seguida em acetonitrila 100%. Em seguida, a amostra foi submetida à desidratação sucessiva com três lavagens de 10 minutos em acetonitrila 100%, a qual foi removida por evaporação em liofilizador.

A reidratação da amostra desidratada e a proteólise das proteínas foram efetuadas usando tampão bicarbonato de amônio 50 mM, contendo 20 ng/μl de tripsina (Sigma), sob resfriamento em gelo por 30 minutos. Em seguida, o excesso deste tampão foi removido, e após a adição de novo volume de tampão bicarbonato de amônio 50 mM (sem a enzima), a amostra foi incubada durante 12 horas a 37°C.

Após digerido, os peptídeos resultantes foram extraídos da amostra em solução de ácido fórmico 5% (1:1) e por incubação em banho ultra-som (Ultracleaner 800 Unique) por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado em outro tubo. Em seguida, o gel foi suplementado com acetonitrila 50%/ácido fórmico 5% (1:1), incubado por mais 10 minutos em banho ultra-som e o sobrenadante foi armazenado junto ao obtido anteriormente. Este procedimento foi repetido três vezes, e os sobrenadantes recolhidos foram concentrados em dessecador e acondicionados a -20°C.

Os peptídeos resultantes foram então ressuspensos em 40 μl de ácido fórmico 0,1 sendo 20 μl submetidos à cromatografia líquida de fase reversa acoplada ao espectrômetro de massa LCMS-IT-TOF/Schimatzu.

A análise dos espectros obtidos foi realizada utilizando o programa Mascot (www.matrixscience.com). Nesta análise foi prevista a modificação de resíduos de cisteína em carbamidometil-cisteína devido à redução por DTT e alquilação com iodoacetamida e, ainda, a presença de resíduos de serina, treonina ou tirosina fosforilados.

3.10 CULTIVO E MANUTENÇÃO DE CÉLULAS VERO, E RECUPERAÇÃO DE AMASTIGOTAS DE *L. (V.) braziliensis*

A linhagem de células Vero (fibroblastos derivados de rim de macaco verde africano *Cercopithecus aethiops*), foi cultivada em meio DMEM (Dulbecco's Modified

Eagle's Medium; LGC Biotechnology) suplementado com 10% de SBF (soro fetal bovino) e 1% dos antibióticos penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em garrafas de cultura de 25 cm² (Figura I, A), a 37°C e 5% CO₂. As células foram lavadas com PBS estéril e, incubadas com tripsina a 37°C por 3 minutos para o descolamento (FIGURA I, B), a reação da tripsina foi interrompida com a adição de meio DMEM suplementado com SBF. Em seguida, foram centrifugadas por 10 minutos a 200 x g e ressuspensas em 1 mL do meio. Para o cultivo e repique, o volume de 100 µL de células foi adicionado a garrafas de 25 cm² contendo 5 mL do meio DMEM suplementado com 10% de SBF.

Para a infecção das células Vero foram utilizadas 20 x 10⁶ promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (na proporção 10:1 de parasitos:células Vero) após serem centrifugadas por 15 minutos a 2500 rpm. As células infectadas foram mantidas em estufa 33°C, com 5% de CO₂ por 24 horas e, então, lavadas três vezes com PBS estéril para retirada de promastigotas não fagocitadas. Novo meio DMEM suplementado com 10% de SBF foi adicionado, e o cultivo foi mantido por mais 72 h. As formas amastigotas do parasito foram recolhidas do sobrenadante e centrifugadas a 2500 rpm por 15 minutos para lavagem (FIGURA I, C).

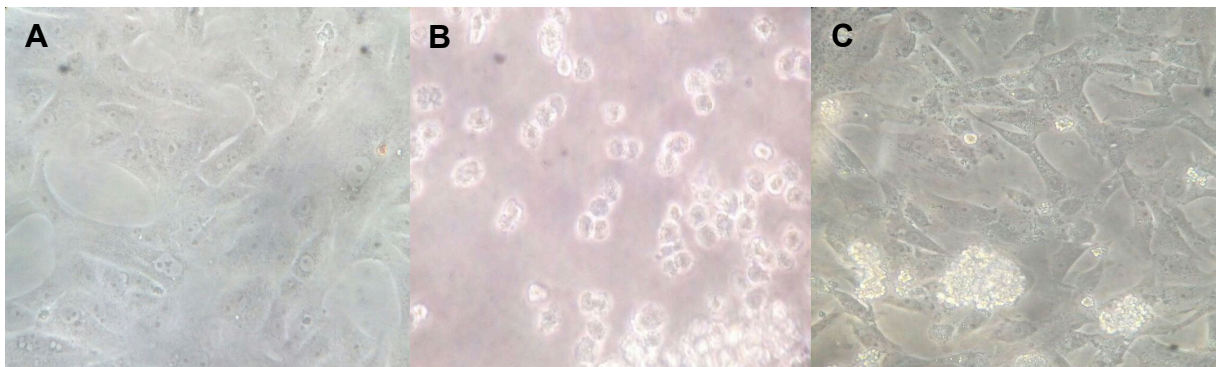


FIGURA I- Cultivo de células Vero e infecção com *L. (V.) braziliensis*. As células Vero aderidas (A), após tripsinização (B) ou com amastigotas isoladas ou formando grumos no sobrenadante da cultura (C) foram visualizadas em microscópio invertido (NIKON Eclipse TS100) e fotografadas. Aumento, 400x.

3.11 IDENTIFICAÇÃO DA NTPDase 1 EM AMASTIGOTAS DE *L. (V.) braziliensis* POR “WESTERN BLOTS”

Para a preparação de homogeneizado, as formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* (10^6 parasitas/ml) foram submetidas a três lavagens em tampão Tris-HCl 5 mM, pH 7,4, a 4 °C, por centrifugação a 2500 rpm por 15 minutos. Os parasitos foram ressuspendidas em Tris-HCl 5 mM, pH 7,4, acrescido de 8% de sacarose, leupeptina (0,5 µg/ml), pepstatina (0,07 µg/ml), inibidor de tripsina (50 µg/l) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (2 µg/ml). O rompimento da membrana e a liberação de antígenos foram obtidos por três ciclos de congelamento e descongelamento e um ciclo de ultrasonicação. A preparação foi armazenada a -80°C até o uso. A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY et al. 1951).

Alíquotas (100 µg de proteína total) do homogeneizado de amastigotas foram suplementadas com tampão de amostra e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% com dodecil sulfato de sódio 0,1% (SDS-PAGE 10%). As proteínas foram coradas com Comassie blue ou eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas (tampão fosfato 0,15 M, pH 7,4, Tween 20 0,3% e caseína 2%) e, em seguida, incubadas “overnight” à temperatura ambiente com o soro imune policlonal de camundongo anti-LbB2LJ (1:200) usando procedimentos padrão (MAIA et al. 2011). A revelação foi feita por quimioluminescência usando anticorpos secundários específicos acoplados à peroxidase e o Luminol como substrato (Kit ECL Western blotting System; GE Healthcare Life Sciences, São Paulo, Brasil), seguido de exposição a filmes de raio-X, conforme as instruções do fabricante. Como controle positivo, alíquotas (100 µg de proteína total) de homogeneizado de promastigotas foram submetidas aos mesmos procedimentos.

3.12 IDENTIFICAÇÃO DA NTPDASE 1 EM FORMAS AMASTIGOTAS INTRACELULARES OU LIVRES DE *L. (V.) braziliensis*

Para a obtenção de macrófagos, após 72 horas de estímulo com 2 mL de meio tioglicolato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) estéril a 3%, camundongos BALB/c foram sacrificados e, em seguida, 5 mL de solução salina HANKS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gelada foram injetados no peritônio dos animais, o qual foi massageado por 5 minutos. A solução salina HANKS contendo as células residentes do peritônio foi recolhida e centrifugada por 10 minutos a 1000 rpm em centrífuga clínica (FANEM Mod. 204N). O precipitado foi ressuspensionado em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), e uma alíquota foi retirada para contagem em câmara de Neubauer. Para a adesão dos macrófagos (2×10^6 macrófagos/poço), 300 μ L de uma suspensão de RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF e 0,1% de antibiótico penicilina-estreptomicina foram adicionados em placas com 24 poços (Corning), nos quais continha uma lamínula de vidro redonda (13 mm de diâmetro, Vidrobras), e a placa foi incubada em estufa à 33° C, com 5% de CO₂, por 16 h.

As células foram lavadas e infectadas com 300 μ L de uma suspensão de 20×10^6 promastigotas/ mL em fase estacionária em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF e 0,1% de antibiótico. A interação foi realizada durante 4 horas em estufa a 33°C, com 5% de CO₂. Os poços foram lavados com PBS estéril cinco vezes e o meio de cultura foi novamente adicionado, retornando assim à estufa a 33°C, com 5% CO₂, por mais 72 h (ANTINARELLI, 2013).

As formas amastigotas intracelulares de *L. (V.) braziliensis* contidas nas lamínulas foram fixadas em paraformaldeído 4% por 10 minutos, permeabilizadas em tampão PBS mais Triton 0,2% por 2 minutos, e bloqueadas com SBF 4%. Após o bloqueio, foram incubadas com soro imune anti-LbB1LJ (1:200) ou anti-potDom B (1:400) por 12 horas em câmara úmida. Como secundário, foi utilizado anticorpos anti-IgG de camundongo conjugados ao Alexa Fluor 488 (Invitrogen) (1:1000) por 1 hora em estufa 36° C. Para a marcação de núcleo e cinetoplasto foi utilizado DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol) por 30 minutos em estufa a 36°C, procedimento realizado no escuro. A montagem das lâminas foi feita utilizando anti-fading (FLUORO-GEL w/ Anti Fading Agent – Electron Microscopy Sciences), agente que

inibe a redução da intensidade de emissão de fluorescência. As imagens da estrutura e topologia foram capturadas em DIC (Contraste interferencial – Normaski).

Os mesmos procedimentos foram empregados para a identificação da NTPDase 1 em amastigotas livres recuperadas de células VERO, utilizando os anticorpos anti-LbB1LJ (1:200) e anti-LbB2LJ (1:200).

3.13 SÍNTESE DOS ÁCIDOS ALQUILAMINOALCANOTIOSSULFÚRICOS (AAATs)

Os derivados AAATs (Figura II) foram sintetizados de acordo com Penido et al. (1990). Eles foram obtidos na forma de sólidos cristalinos, solúveis em solventes orgânicos, e gentilmente doados pelo Prof. Dr. Marcos Luiz de Oliveira Penido (Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG).

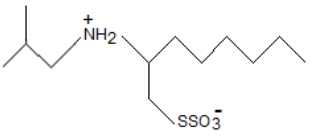
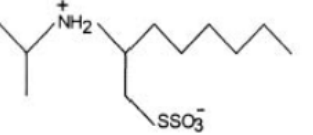
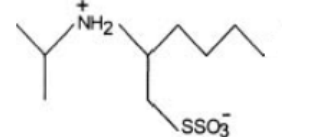
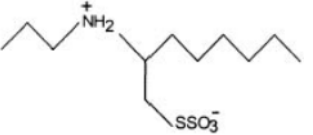
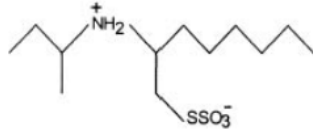
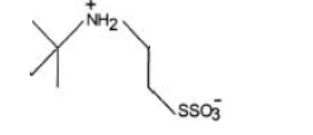
COMPOSTO	NOMENCLATURA	ESTRUTURA
IBSS	Ácido 2-[(isobutil)amino]-1-octanotiosulfúrico	
SIPA	Ácido 2-[(isopropil)amino]-1-octanotiosulfúrico	
SXIP	Ácido 2-[(isopropil)amino]-1-hexanotiosulfúrico	
NPSO	Ácido 2-[(n-propil)amino]-1-octanotiosulfúrico	
SSEC	Ácido 2-[(metilpropil)amino]-1-octanotiosulfúrico	
TBSO	Ácido 1-[(terc-butil)amino]-2-etanotiosulfúrico	

FIGURA II. Ácidos alquilaminoalcanotiosulfúricos (AAATs).

3.14 EFEITOS DOS AAATs SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. (V.) braziliensis* IN VITRO

Formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (cepa MHOM/BR/1975/M2903) em fase logarítmica de crescimento (3×10^6 células/ml) foram contadas em câmara de Neubauer, e usadas para triagem *in vitro*. Os parasitos foram mantidos em placas de 96 poços de microtitulação em meio BHI, suplementado com L-glutamina, 10% de soro fetal bovino e 10% de urina, e incubados com o AAAT por 72 h, em concentrações decrescentes do composto. Promastigotas crescidas em meio de

cultura na ausência do composto foram usadas como controle. Os experimentos foram realizados três vezes e em duplicatas. A atividade leishmanicida foi determinada pelo método MTT (Mossman, 1983). A absorbância foi medida a 570 nm (Multiskan EX- Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finlândia). A Anfotericina B foi usada como uma referência padrão. Os dados estatísticos foram analisados pelo programa Probit e foi considerado significativo quando $P < 0,05$. Estes experimentos foram realizados com a colaboração da Profa. Dra. Elaine Soares Coimbra do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do ICB/UFJF.

3.15 CITOTOXIDADE DOS COMPOSTOS AAATs EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/c

Os macrófagos foram obtidos conforme descrito no item 3.12. Para a adesão dos macrófagos, uma alíquota de 100 μL de 2×10^6 macrófagos/mL em meio RPMI-1640 contendo 10% de SBF foi adicionada a cada poço (2×10^5 células por poço) de placas de 96 poços (Corning), as quais foram mantidas a 37°C, com 5% de CO_2 , por 16 h. Os poços foram lavados com 100 μL de PBS estéril para a retirada dos macrófagos não aderidos. Após a adição de meio RPMI-1640 com 10% SBF, os compostos AAATs foram diluídos seriadamente, e a placa foi novamente incubada a 37°C, em estufa com 5% de CO_2 .

Após 72 horas de tratamento, foi adicionado 10 μL de MTT 5 mg/mL (MOSSMAM, 1983), e a viabilidade dos macrófagos foi conferida por meio de microscópio óptico invertido (NIKON Eclipse TS100), o que permitiu comparar a morfologia dos macrófagos tratados ou não com os AAATs. Após 2 h, a reação foi interrompida pela adição de 100 μL de solução de isopropanol/HCl 0,4%, e a leitura foi realizada a 570 nm utilizando um espectrofotômetro de microplacas (Multiskan EX-Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finlândia). Como controles negativos, foram usados os poços nos quais foram adicionados somente o meio RPMI-1640 com 10% SBF. A concentração de AAAT que reduziu 50% da viabilidade dos macrófagos em comparação com o controle sem tratamento (CC_{50}) foi calculada pelo programa estatístico Probit considerando a média de dois experimentos independentes realizados em duplicata (ANTINARELLI, 2013).

3.16 AVALIAÇÃO DA AÇÃO DOS COMPOSTOS AAATs EM AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE *L. (V.) braziliensis*

Para a obtenção de amastigotas intracelulares, macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, obtidos conforme descrito no item 3.12, foram infectados com formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, e usados para os testes com os AAATs.

A interação dos parasitos com as células foi efetuada durante 4 horas a 33°C em estufa, com 5% de CO₂. Os poços foram lavados com 300 µL de PBS estéril por poço, por 5 vezes, e os compostos AAATs foram adicionados em concentrações de 100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM e 5 µM permanecendo por 72 horas a 33°C, em estufa com 5% de CO₂. As células foram fixadas com etanol absoluto, e desidratadas sequencialmente em soluções contendo acetona e/ou xilol (acetona pura; 90% acetona/10% xilol; 50% acetona/50% xilol; 90% xilol/10% acetona; xilol puro) e, em seguida, coradas pelo Giemsa (Doles, Goiania, Brasil). As lâminas foram montadas sob lamínulas e analisadas ao microscópio.

A carga parasitária global foi avaliada pela contagem do número de amastigotas intracelulares e macrófagos infectados e não-infectados (total de 200 células infectadas), calculando a porcentagem de redução de amastigotas por macrófago, e comparando ao controle por meio de microscopia de luz (OPYMPUS bx41), como descrito por Antinarelli (2013). A concentração necessária para inibir 50% do crescimento dos parasitos (CI₅₀) foi determinada pelo programa estatístico Probit, no qual foi usada a média de dois experimentos diferentes. Como controles positivos, foram usados os fármacos Anfotericina B e miltefosina.

3.17 MEDIDA DA ATIVIDADE FOSFOHIDROLÍTICA NA PRESENÇA DOS AAATs

A preparação de promastigotas foi pré-incubada por 30 minutos a 37°C com os derivados AAATs (SSEC, SXIP, SIPA, NPSO, IBSS ou TBSO) nas concentrações de 1 µM a 1000 µM em meio de reação padrão contendo MOPS 50 mM, pH 7,4, 1 mM CaCl₂, 100 µM de ortovanadato de sódio e 0,1 mg proteína/ml. A medida de atividade hidrolítica foi iniciada pela adição de 3 mM do substrato ATP ou ADP, incubada por 60 minutos a 37°C, e interrompida pela adição de 1 volume de HCl 0,1 N. A quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado foi determinada espectrofotometricamente de acordo com Taussky e Shorr (1953). Amostras incubadas sem a adição de AAATs e na presença e ausência de DMSO 2,5% (v/v), o solvente usado para solubilizar os compostos, foram usadas como controle.

Sob as mesmas condições experimentais, o homogeneizado de amastigotas de *L. (V.) braziliensis*, obtido como descrito no item 3.11, foi incubado com o derivado SIPA, e as atividades ATPásica e ADPásica foram determinadas.

3.18 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO SIPA SOBRE AS FORMAS AMASTIGOTAS LIVRES DE *L. (V.) braziliensis*

Formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* recuperadas da infecção de células Vero foram mantidas em placas de 96 poços de microtitulação em meio DMEM suplementado 10% de SBF e 1% de antibiótico, e incubadas com a droga SIPA por 24 h, em concentrações decrescentes do composto. Como controles foram usadas formas amastigotas na ausência do composto. A atividade leishmanicida foi determinada pelo método MTT. A absorbância foi medida a 570 nm (Multiskan EX-Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finlândia). A Miltefosina foi usada como controle. Os dados estatísticos foram analisados pelo programa Probit e foi considerado significativo quando $P < 0,05$. Estes experimentos foram realizados com a colaboração da Profa. Dra. Elaine Soares Coimbra do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do ICB/UFJF.

3.19 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO SIPA SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_m$) DE FORMAS AMASTIGOTAS DE *L. (V.) braziliensis*

Formas amastigotas recolhidas do sobrenadante de células Vero foram centrifugadas por 15 minutos a 2500 rpm e ressuspensas em meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 1% de antibiótico. As amastigotas (10×10^6 células/mL) foram colocadas em garrafas de 25 cm² na presença de 30 μ M de SIPA, e como controle foi usado o fármaco Miltefosina na concentração de 25 μ M. As garrafas permaneceram a 33° C, na presença de 5% de CO₂, por 24 horas. Após este tempo, o conteúdo das garrafas foi centrifugado por 15 minutos a 2500 rpm, ressuspensado em 2 mL de PBS estéril e centrifugado novamente, sendo então ressuspensado em 1 mL de solução de HANKS. O número de células foi contado e ajustado para 20×10^6 células/mL no volume de 1 mL de solução de HANKS. O reagente JC-1 (Cayman Chemical Company) na concentração final de 10 μ g/mL foi adicionado e incubado por 20 minutos a 37°C ao abrigo da luz. Após a incubação, foi realizada três lavagens sob as mesmas condições utilizando solução de HANKS, ressuspensando as amastigotas em 1 mL. Alíquotas de 200 μ L foram transferidas para placas negras de 96 poços e a leitura foi realizada em fluorímetro (FLX 800 multiscan; Biotek) nos comprimentos de onda 485/540 (excitação) e 528/600 (emissão). A razão entre fluorescência vermelha/verde (528/600) multiplicada por 100 representa o potencial de membrana. A significância dos dados por avaliada pelo teste Mann Whitney, com *P < 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO DA ISOFORMA NTPDase 1 DE *L. (V.) braziliensis* POR ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO

Os anticorpos policlonais de camundongos anti-LbB1LJ ou anti-LbB2LJ imobilizados em proteína A-Sepharose foram utilizados para a imunoprecipitação de atividade fosfohidrolítica presente em preparação de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (FIGURA 1). Os anticorpos anti-LbB1LJ depletaram aproximadamente 30% da atividade ATPásica e 40% da ADPásica, enquanto os anticorpos anti-LbB2LJ depletaram 53% e 44% das atividades ATPásica e ADPásica, respectivamente, quando comparado ao controle (FIGURA 1).

O “pellet” contendo o complexo resina-anticorpo-antígeno, obtido dos ensaios de imunoprecipitação, foi lavado e submetido à eletroforese e “Western blots”. Os anticorpos anti-LbB1LJ e anti-LbB2LJ imobilizados na proteína A-Sepharose imunoprecipitaram bandas de 48 e 43 kDa da preparação de promastigotas (Wb-I, poços C e D), as quais foram reconhecidas por anticorpos policlonais de coelho anti-apirase de batata (FIGURA 2A). Estas mesmas bandas de 48 e 43 kDa foram reconhecidas pelos anticorpos anti-LbB1LJ (Wb, poço A) ou anti-LbB2LJ (Wb, poço B) quando a preparação de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foi usada em “Western blots” (FIGURA 2A), corroborando os dados obtidos dos ensaios de imunoprecipitação. Soros controle diluídos 1:200 obtidos de camundongos normais não foram reativos com esta preparação (dados não mostrados).

As sequências primárias dos peptídeos sintéticos LbB1LJ e LbB2LJ, as quais compõem o domínio conservado B da NTPDase 1 de *L. (V.) braziliensis*, foram alinhadas com as respectivas contrapartes de isoformas NTPDase 1 de diferentes espécies de *Leishmania*. Como evidenciado na Figura 2B, existe >80% de identidade entre elas, confirmando o elevado nível de conservação do domínio B (FIGURA 2B). Em contraste, o alinhamento com as respectivas contrapartes da isoforma GDPase, outro membro da família das NTPDases também presente em *L. (V.) braziliensis*, resultou em baixo nível de identidade (FIGURA 2B; <20%).

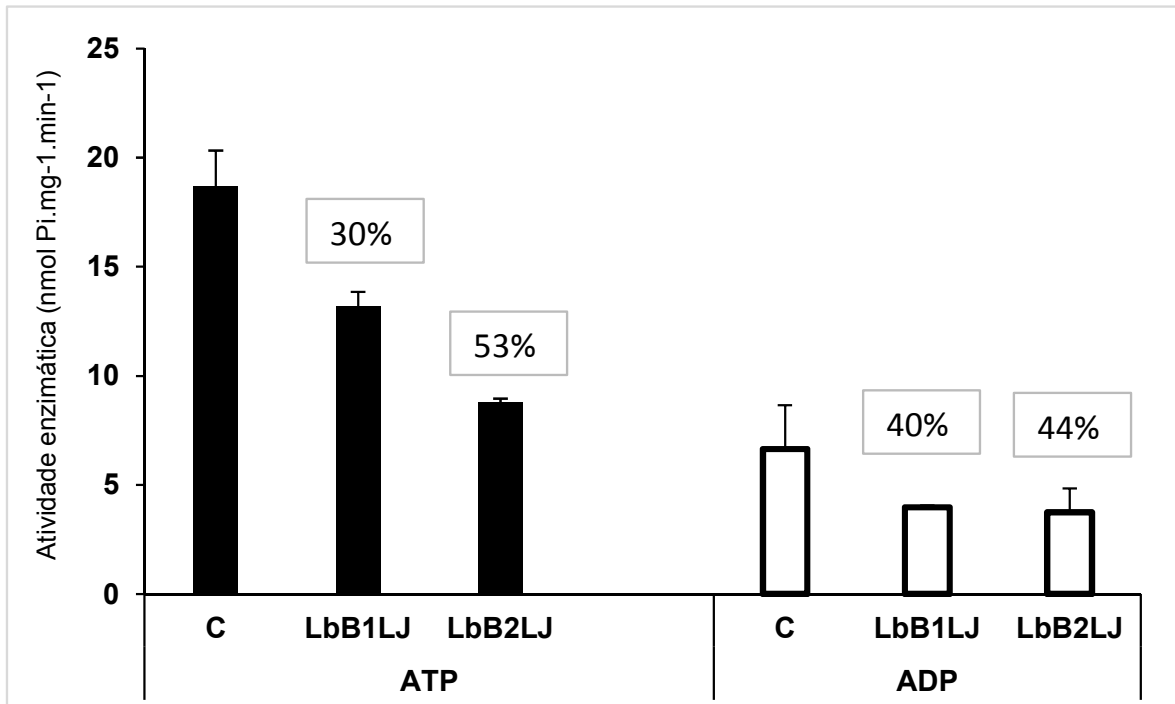


FIGURA 1. Depleção da atividade fosfohidrolítica de preparação de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. A preparação de promastigotas foi homogeneizada em detergente C12E9 e incubada com anticorpos policlonais de camundongos imobilizados em Proteína A-Sepharose, os quais foram produzidos contra os peptídeos LbB1LJ e LbB2LJ. Após centrifugação, as atividades ATPásica (ATP) e ADPásica (ADP) foram medidas no sobrenadante. O resultado é a média \pm DP de dois experimentos diferentes, cada um deles feito em triplicata. Dentro da caixa está a porcentagem da imunodepleção comparada ao soro controle.

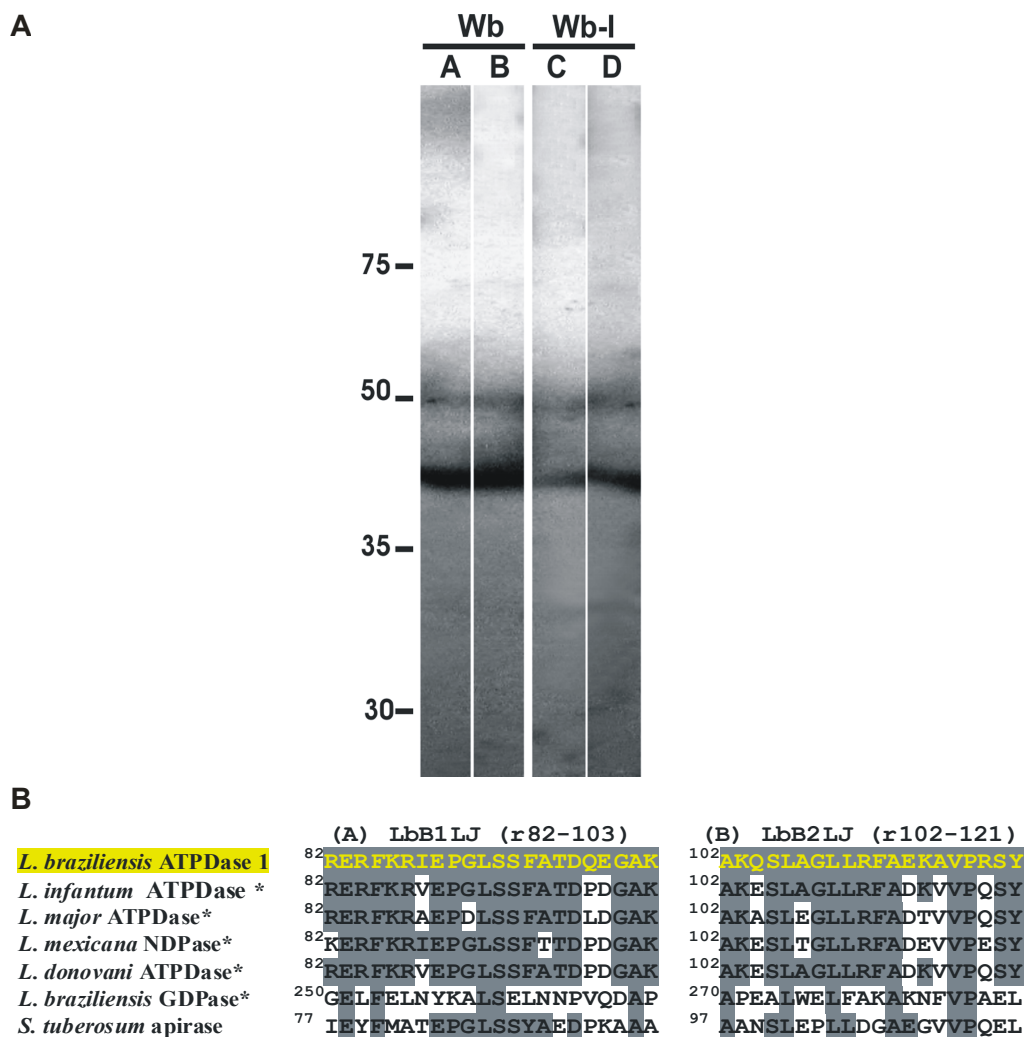


FIGURA 2. (A) Reatividade da NTPDase 1 de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* com anticorpos policlonais anti-peptídeos. Uma alíquota (100 µg de proteínas) de preparação de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (Wb, A e B) foi submetida a SDS-PAGE 10%, eletrotransferida para membrana de nitrocelulose, e os “Western blots” foram desenvolvidos com soro policlonal de camundongo (1:200) contra LbB1LJ (A) ou LbB2LJ (B). Em Wb-I, o complexo imunoprecipitado proteína A-anticorpo-antígeno isolado da preparação de promastigotas por anticorpo policlonal anti-LbB1LJ (C) ou anti-LbB2LJ (D) foi submetido à eletroforese sob as mesmas condições, e as bandas de 48 e 43 kDa imunoprecipitadas foram identificadas por meio do soro policlonal de coelho anti-apirase de batata (dil. 1:1000). As membranas foram reveladas por quimioluminescência. Em (B), alinhamento da sequência primária do peptídeo sintético LbB1LJ (A) ou LbB2LJ (B) com a sua contraparte em NTPDases 1 de *Leishmania* spp.*, GDPase de *L. braziliensis* e peptídeos sintéticos potB1LJ e potB2LJ derivados da apirase de batata. Os resíduos de aminoácidos idênticos aos peptídeos LbB1LJ e LbB2LJ são mostrados na coluna cinza. Os números de acesso ao GenBank são: ATPDase 1 de *L. braziliensis*, *XP_001562178; ATPDase de *L. infantum*, CAM66723.1; NDPase de *L. major*, CAJ03227.1; NDPase *L. mexicana*, CBZ25018.1; ATPDase de *L. donovani*, CBZ32820.1; GDPase de *L. braziliensis*, XP_001562788; apirase de batata *S. tuberosum*, P80595.

4.2 IMUNOLOCALIZAÇÃO DA NTPDase 1 DE PROMASTIGOTAS DE *L. (V.) braziliensis* POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA UTILIZANDO OS ANTICORPOS ANTI-LbB1LJ E ANTI-LbB2LJ

A localização da NTPDase 1 foi obtida por técnica de imunocitoquímica ultraestrutural utilizando anticorpos policlonais de camundongo anti-LbB1LJ ou anti-LbB2LJ (diluição 1:100) e um anticorpo secundário conjugado a ouro coloidal. Como mostrado na Figura 3, os anticorpos anti-LbB1LJ (A-D) e anti-LbB2LJ (E-F) identificaram a NTPDase 1 na superfície da membrana plasmática, na vesícula citoplasmática, na bolsa flagelar (FP), no flagelo (F), mitocôndria (M), cinetoplasto (K) e núcleo (N).

Nenhuma reatividade foi observada quando formas promastigotas foram incubadas com o soro de camundongo controle ou apenas com o anticorpo secundário (dados não mostrados).

4.3 EFEITOS DOS ANTICORPOS POLICLONAIS DE CAMUNDONGO ANTI-LbB1LJ E ANTI-LbB2LJ SOBRE A ATIVIDADE DA NTPDase 1 DE PREPARAÇÃO DE PROMASTIGOTAS DE *L. (V.) braziliensis*

Os efeitos dos anticorpos policlonais anti-LbB1LJ ou anti-LbB2LJ produzidos em camundongos foram testados sobre a atividade fosfolifítica da NTPDase 1 usando a preparação de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* homogeneizada em detergente (FIGURA 4). Nas condições experimentais empregadas, os anticorpos policlonais anti-LbB1LJ inibiram significativamente ($P < 0,01$) a atividade ATPásica (79%) ou ADPásica (43%) da preparação de promastigotas quando comparada ao controle (FIGURA 4). Os anticorpos policlonais anti-LbB2LJ também inibiram significativamente ($P < 0,05$) a atividade ATPásica (47%) e, em menor extensão a atividade ADPásica (18%) (FIGURA 4).

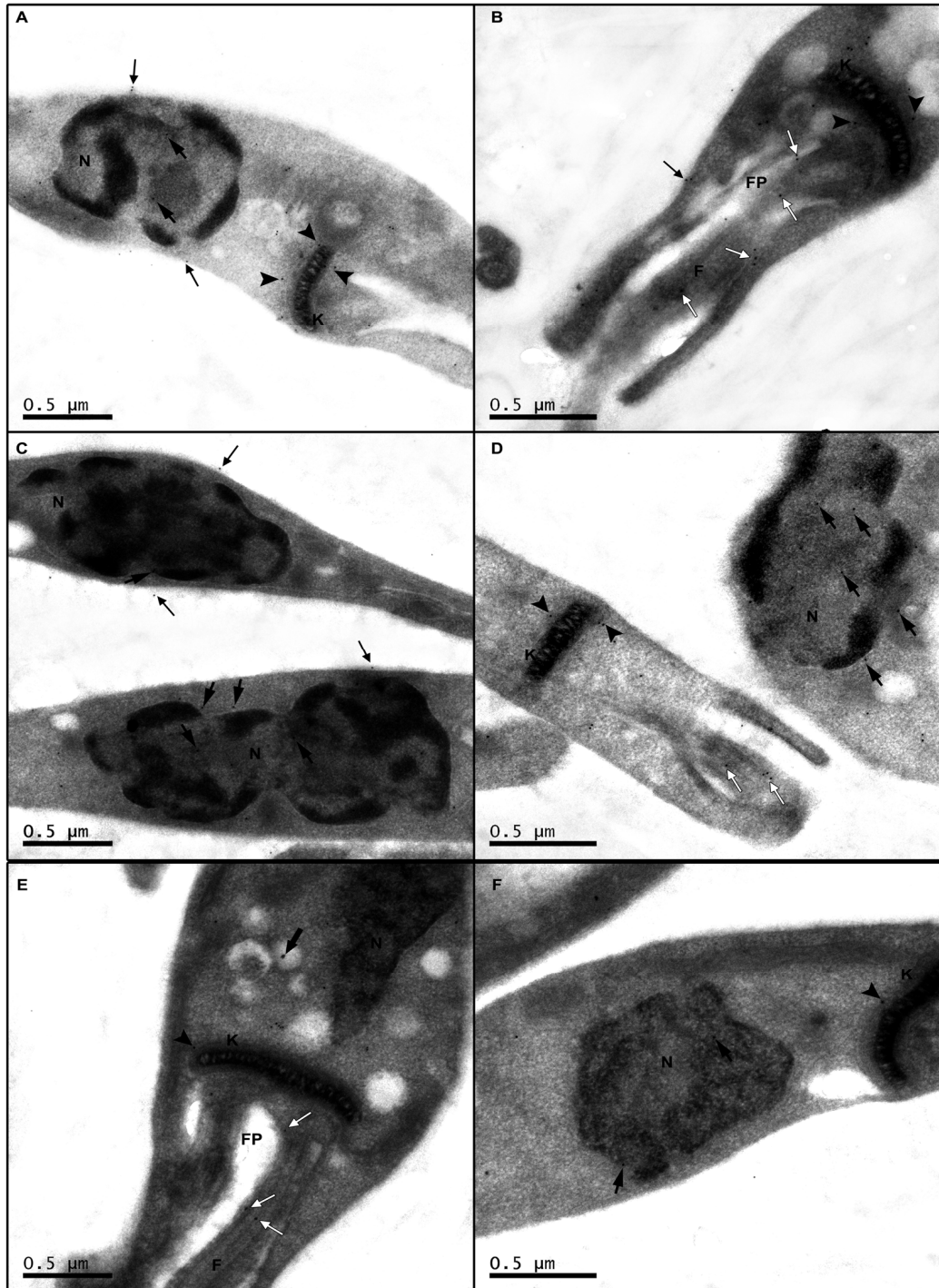


FIGURA 3. Microscopia eletrônica mostrando a localização da NTPDase 1 em promastigotas de *L. (V.) braziliensis* usando soro anti-LbB1LJ (A-D) ou anti-LbB2LJ (E-F) e anticorpo secundário conjugado ao ouro coloidal. Os imunocomplexos estavam distribuídos (A-D) na superfície da membrana plasmática (seta), núcleo (seta), mitocôndria e cinetoplasto (cabeça de seta). (B) bolsa flagelar e flagelo (seta branca); (C) núcleo em divisão (seta). Usando anticorpos anti-LbB2LJ, a NTPDase 1 foi identificada por visualização dos imunocomplexos (E, F) na mitocôndria e cinetoplasto (cabeça de seta); bolsa flagelar e flagelo (seta branca), vesículas citoplasmáticas (seta) e núcleo (seta). FL, flagelo; FP, bolsa flagelar; K, cinetoplasto; N, núcleo.

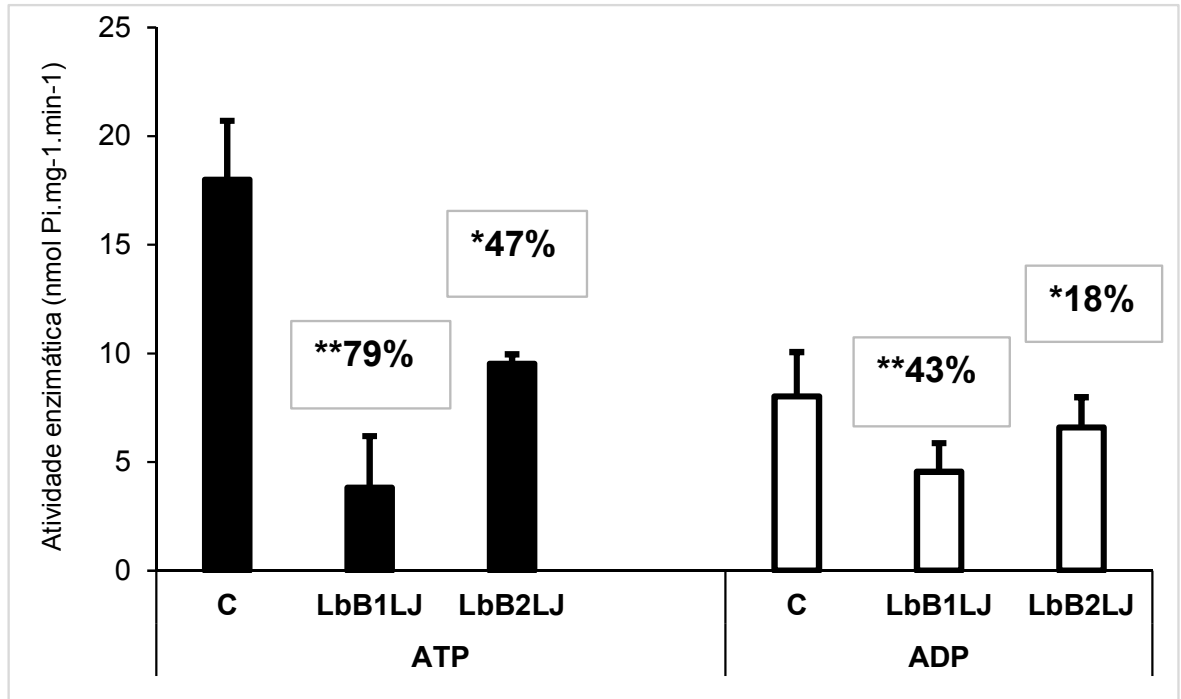


FIGURA 4. Inibição da atividade NTPDásica 1 de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* por anticorpos anti-LbB1LJ e anti-LbB2LJ. A hidrólise de ATP ou ADP foi medida na preparação de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* pré-incubada com soro diluído 1:200 de camundongo normal (C) ou soro imune produzido contra o peptídeo LbB1LJ ou LbB2LJ. O resultado é a média \pm DP de três experimentos diferentes, cada um deles feito em triplicata. Dentro da caixa, está a porcentagem da inibição comparada ao soro controle. A significância estatística foi determinada usando Test *t* student. $P < 0,05^*$ ou $< 0,01^{**}$.

4.4 ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE ANTICORPOS ANTI-LbB1LJ E ANTI-LbB2LJ

Os efeitos dos anticorpos policlonais de camundongos anti-peptídeos foram testados sobre a proliferação de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (FIGURA 5). O crescimento das promastigotas foi significativamente inibido na presença dos anticorpos anti-LbB1LJ (67%; $P < 0,01$) ou anti-LbB2LJ (33%; $P < 0,05$) quando comparado ao soro controle de camundongo, o qual representa 100% de crescimento celular (FIGURA 5; C3). As promastigotas crescidas em meio de cultura (C1) ou suplementado com o soro de coelho saudável (C2) ou soro controle de camundongo (C3) foram similares entre si (FIGURA 5).

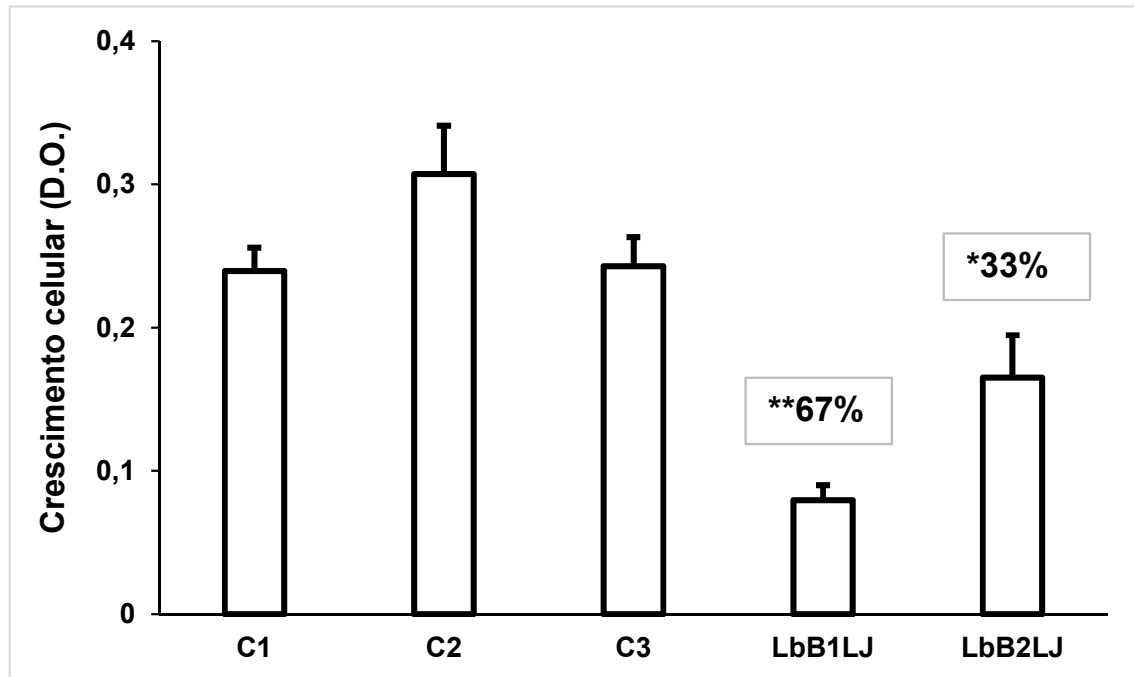


FIGURA 5. Atividade leishmanicida dos anticorpos anti-LbB1LJ ou anti-LbB2LJ. As promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram mantidas em placas com 96 poços a 24°C e incubadas com soro policlonal anti-LbB1LJ ou anti-LbB2LJ diluído 1:100 por 24 h. Como controle, foram usadas promastigotas crescidas no meio de cultura sem adições (C1), ou suplementado com o soro de coelho saudável (C2; 1:100) ou soro de camundongo normal (C3; 1:100). A atividade leishmanicida foi determinada pelo método colorimétrico MTT. Os resultados foram expressos como média da densidade óptica \pm DP de três experimentos diferentes, cada um deles realizado em triplicata. A significância estatística da diferença entre soro controle de camundongo (C3, 100% de crescimento celular) e soro imune foi determinada usando Test *t* student. $P < 0,05^*$ ou $< 0,01^{**}$.

4.5 IMUNOLocalização DA NTPDase 1 DE PROMASTIGOTAS DE *L. (V.) braziliensis* POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA UTILIZANDO ANTICORPOS ANTI-potB1LJ

A localização da NTPDase 1 foi também obtida por técnica de imunocitoquímica ultraestrutural utilizando anticorpos policlonais de camundongo produzidos contra potB1LJ (FIGURA 2B) diluídos 1:100 e, similar aos anticorpos anti-LbB1LJ e anti-LbB2LJ, a NTPDase 1 foi identificada na superfície, vesícula citoplasmática, na bolsa flagelar (B), cinetoplasto (C) e núcleo (N) de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*.

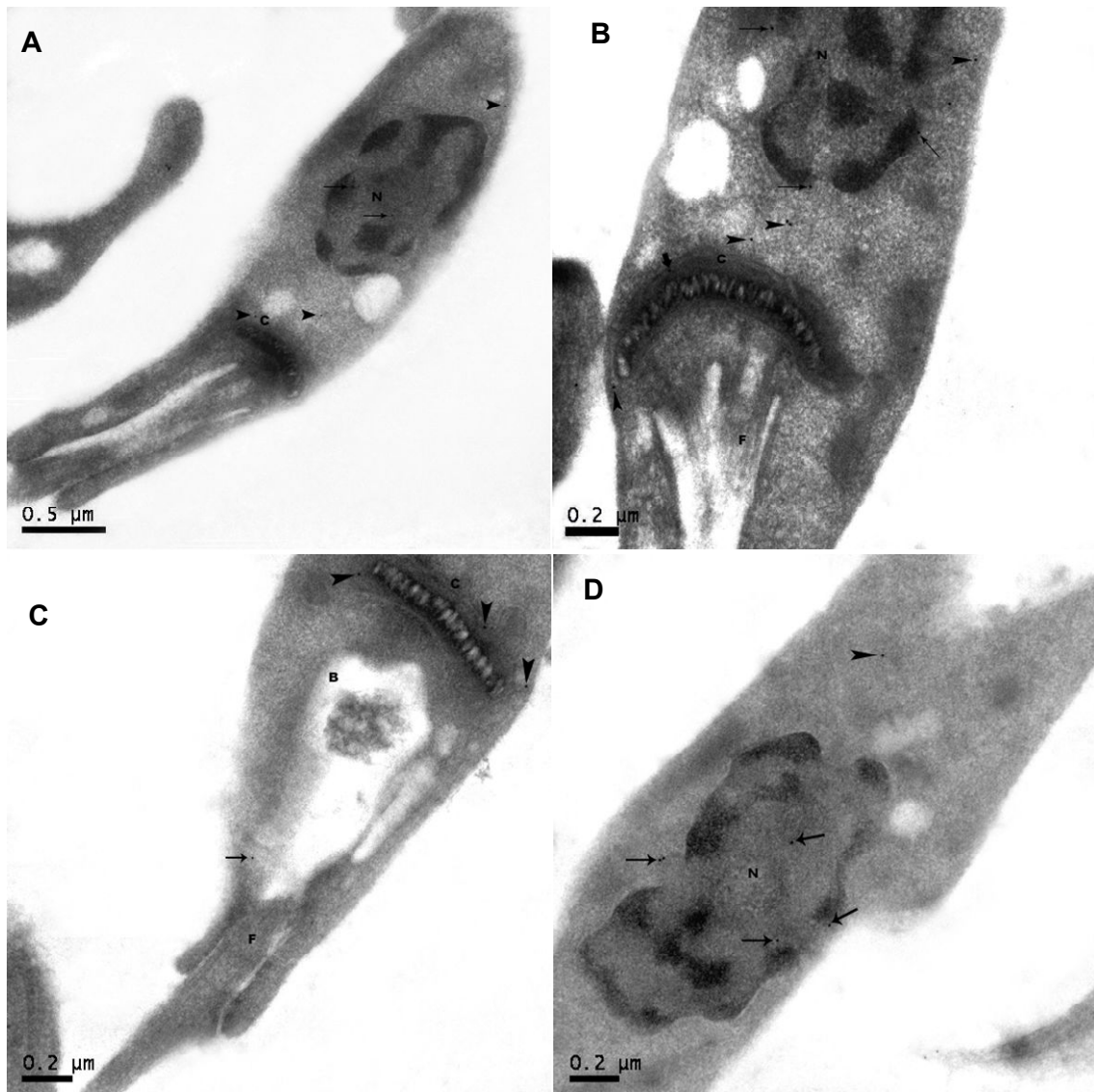


FIGURA 6. Microscopia eletrônica mostrando a localização da NTPDase 1 em promastigotas de *L. (V.) braziliensis* usando soro imune anti-potB1LJ e anticorpo secundário conjugado ao ouro coloidal. A- Os imunocomplexos estavam distribuídos na superfície, núcleo, mitocôndria e cinetoplasto, vesícula citoplasmática e bolsa flagelar; aumento de 40000x; B- destaque para marcação no núcleo e cinetoplasto, aumento 60000x; C- destaque para mitocôndria (cabeça de seta) e bolsa flagelar (seta); aumento 60000x; D- destaque para marcação no núcleo (seta), aumento 60000x. F, flagelo; B, bolsa flagelar; C, cinetoplasto; N, núcleo.

4.6 EFEITOS DOS ANTICORPOS POLICLONAIS DE CAMUNDONGO ANTI-potB1LJ E ANTI-potB2LJ SOBRE A ATIVIDADE DA NTPDase 1 DE PREPARAÇÃO DE PROMASTIGOTAS DE *L. (V.) braziliensis*

Os efeitos de anticorpos policlonais de camundongos produzidos contra potB1LJ e potB2LJ (FIGURA 2B) foram também testados sobre a atividade fosfohidrolítica da NTPDase 1 de *L. (V.) braziliensis*, sob as mesmas condições experimentais do item 4.3. Os anticorpos potB1LJ inibiram 60% e 63% das atividades ATPásica e ADPásica, respectivamente, quando comparado ao controle, enquanto os anticorpos anti-potB2LJ inibiram 60% da atividade ATPásica, e em menor extensão (29%) a atividade ADPásica (FIGURA 7).

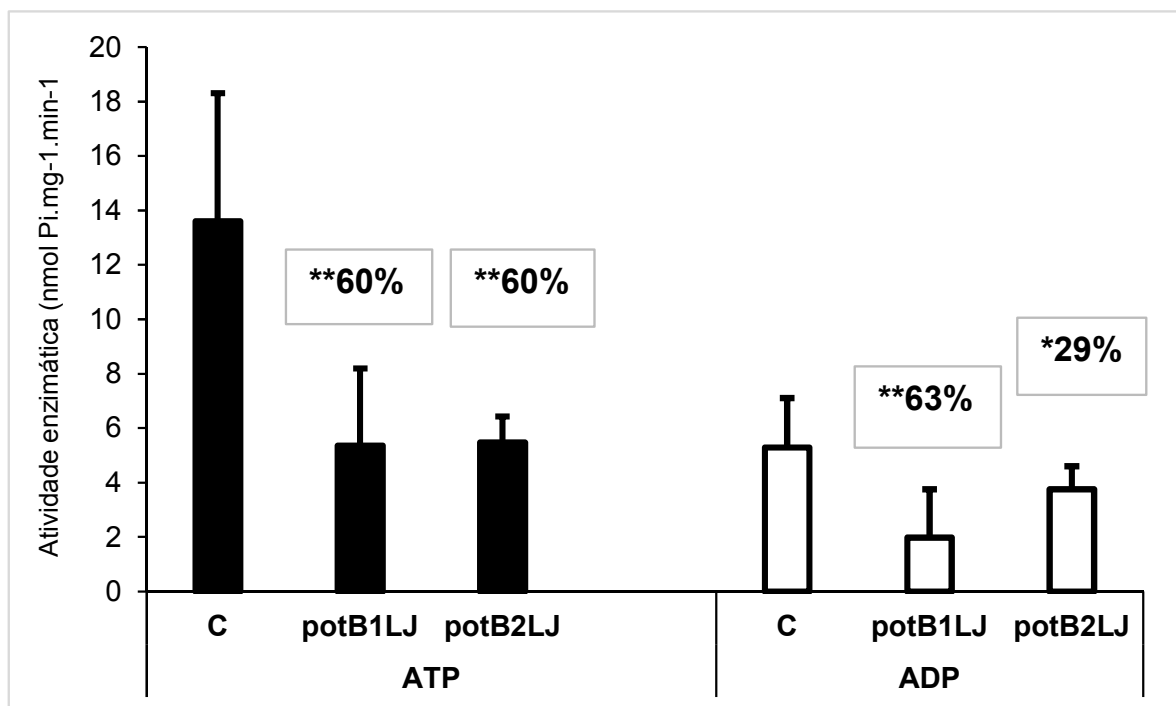


FIGURA 7. Inibição da atividade NTPDásica 1 de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* por anticorpos anti-potB1LJ e anti-potB2LJ. A hidrólise de ATP ou ADP foi medida na preparação de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* pré-incubada com soro diluído 1:200 de camundongo normal (C) ou soro imune produzido contra o peptídeo potB1LJ. O resultado é a média \pm DP de três experimentos diferentes, cada um deles feito em triplicata. Dentro da caixa, está a porcentagem da inibição comparada ao soro controle. A significância estatística foi determinada usando Test *t* student. $P < 0,05^*$ ou $< 0,01^{**}$.

4.7 ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE ANTICORPOS ANTI-potB1LJ E ANTI-potB2LJ

Os efeitos de anticorpos policlonais de camundongos produzidos contra potB1LJ e potB2LJ foram testados sobre a proliferação de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (FIGURA 8). O crescimento dos promastigotas foi significativamente inibido na presença dos anticorpos anti-potB1LJ (73%; $P < 0,01$) ou potB2LJ (40%; $P < 0,05$) quando comparado ao soro controle de camundongo, o qual representa 100% de crescimento celular (FIGURA 8; C3). As promastigotas crescidas em meio de cultura (C1) ou suplementado com o soro de coelho saudável (C2) ou soro controle de camundongo (C3) foram similares entre si (FIGURA 8).

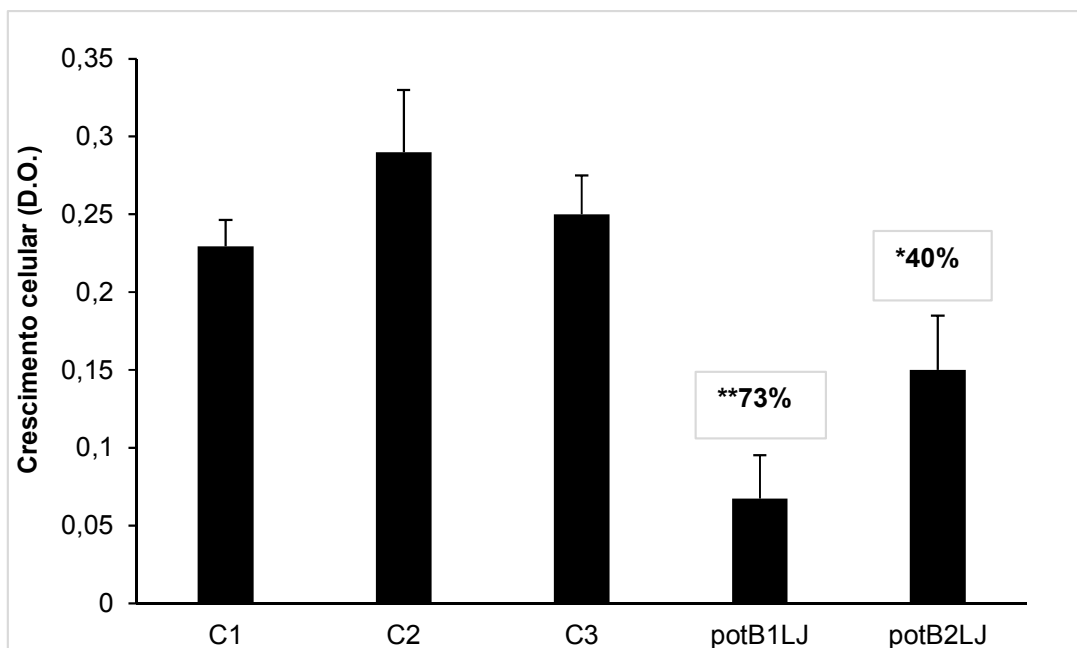


FIGURA 8. Atividade leishmanicida dos anticorpos anti-potB1LJ ou anti-potB2LJ. As promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram mantidas em placas com 96 poços a 24°C e incubadas com soro policlonal anti-potB1LJ ou anti-potB2LJ diluído 1:100 por 24 h. Como controle, foram usadas promastigotas crescidas no meio de cultura sem adições (C1), ou suplementado com o soro de coelho saudável (C2; 1:100) ou soro de camundongo normal (C3; 1:100). A atividade leishmanicida foi determinada pelo método colorimétrico MTT. Os resultados foram expressos como média da densidade óptica \pm DP de três experimentos diferentes, cada um deles realizado em triplicata. A significância estatística da diferença entre soro controle de camundongo (C3, 100% de crescimento celular) e soro imune foi determinada usando Test *t* student. $P < 0,05^*$ ou $< 0,01^{**}$.

4.8 OBTENÇÃO DE FRAÇÃO MITOCONDRIAL DE PROMASTIGOTAS DE *L. (V.) braziliensis* E IDENTIFICAÇÃO DE NTPDase 1 POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Alíquotas (100 µg) de homogeneizado total (H), fração solúvel (S) ou fração mitocondrial enriquecida (P) de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram submetidas à SDS-PAGE 10% e coradas por Coomassie blue (FIGURA 9). Diferentes perfis foram identificados entre as amostras, com ampla distribuição de polipeptídeos em H, e visível enriquecimento de bandas de 20 a >76 kDa em S ou P (FIGURA 9, painel CB). Numerosos polipeptídeos foram coincidentes nas amostras S e P. Porém, a presença de diferentes bandas majoritárias entre estas amostras indicou a eficiência do procedimento previamente descrito por Hide e Cols (2008).

Embora o procedimento envolva a solubilização em digitonina, aparentemente este detergente não altera a atividade enzimática da NTPDase 1 de *L. (V.) braziliensis*, desde que foi possível evidenciá-la quando medida em meio de reação suplementado com ortovanadato de sódio 100 µM e DCCD 100 µM, descartando a contribuição de atividades catalíticas contaminantes provenientes de ATPases de transporte, incluindo a ATPase mitocondrial. Como mostrado na Figura 10, as atividades ATPásica ($12,06 \pm 5,29$ nmol Pi x mg⁻¹ x min⁻¹) e ADPásica ($13,26 \pm 6,19$ nmol Pi x mg⁻¹ x min⁻¹) da preparação de homogeneizado total de promastigotas (H) foram mantidas e, também, as atividades ATPásica ($19,28 \pm 5,2$ nmol Pi x mg⁻¹ x min⁻¹; $P < 0,01$) e ADPásica ($16,99 \pm 8,15$ nmol Pi x mg⁻¹ x min⁻¹) da fração mitocondrial (P), medidas sob as mesmas condições experimentais. Estas atividades estavam elevadas quando comparadas ao homogeneizado total (H), sugerindo um enriquecimento da atividade NTPDásica 1 (FIGURA 10).

Alíquotas de homogeneizado total (HT; 100 µg de proteína total/poço) ou de fração mitocondrial enriquecida (P; 100 µg de proteína total/poço), previamente solubilizadas em Triton X-100 0,2% e deoxicolato de sódio 0,2%, foram aplicadas em gel não desnaturante, e o ATP foi usado para a revelação de banda ativa (FIGURA 9, painel NDG). As proteínas contidas em recortes da banda ativa foram eletroeluídas, dessalinizadas, aplicadas em SDS-PAGE 10% e, em seguida, coradas por prata ou eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose.

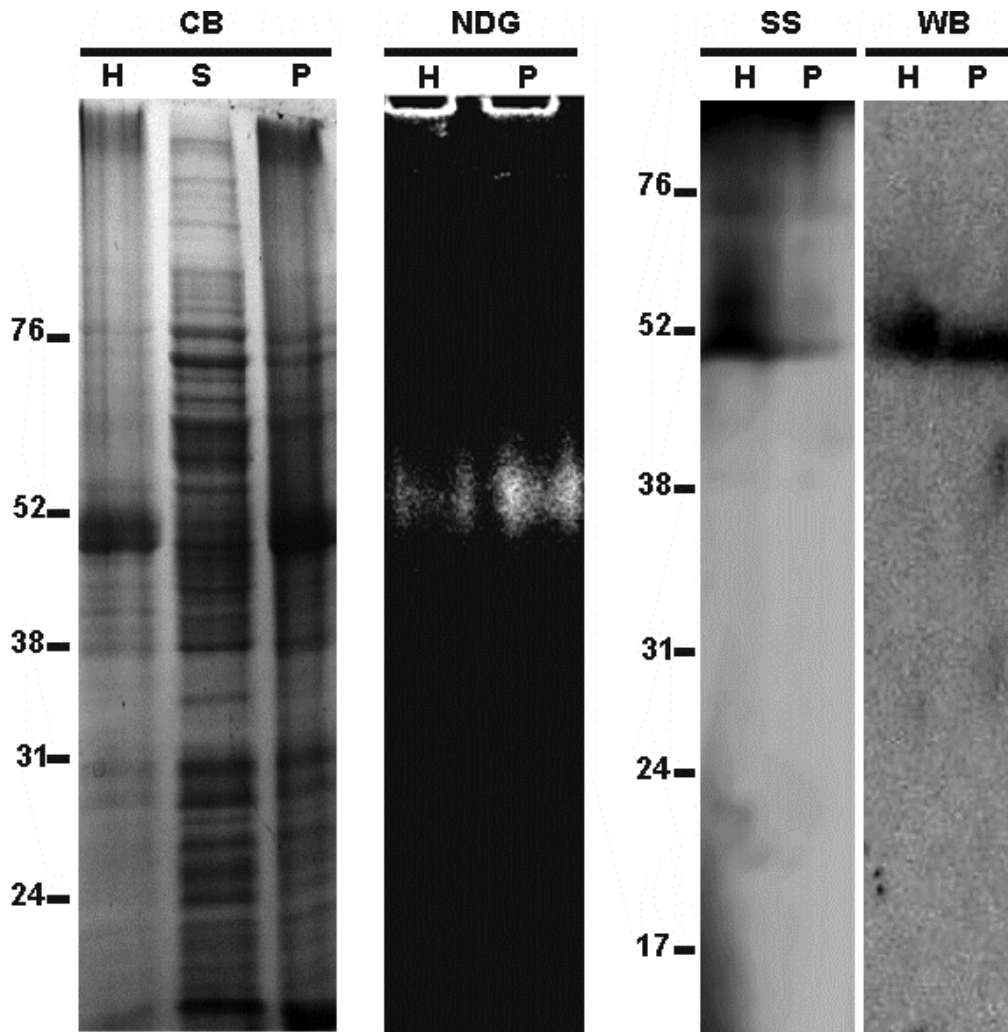


FIGURA 9. Identificação da NTPDase 1 de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* em fração mitocondrial enriquecida. (A) Alíquotas (100 μ g de proteína total) de homogeneizado total (H), e as frações solúvel (S) e mitocondrial (P) obtidas de promastigotas foram submetidas à eletroforese (SDS-PAGE 10%), e as proteínas foram coradas por Coomassie blue (Painel CB). (B) Alíquotas (100 μ g de proteína total) de homogeneizado total (H) e fração mitocondrial enriquecida (P) foram submetidas à eletroforese em gel não desnaturante. O gel foi lavado em tampão MOPS 50 mM, pH 7,4, e o poço foi cortado e imerso em tampão fresco contendo CaCl_2 10 mM, ortovanadato de sódio 100 μ M e 5 mM do substrato ATP. Após 2 h de incubação a 37° C, depósitos brancos de fosfato de cálcio apareceram como um resultado da hidrólise do nucleotídeo catalisada pela enzima presente em H ou P, e o gel foi fotografado contra um fundo escuro (painel NDG). A região correspondente a banda ativa foi cortada de poços paralelos corridos no mesmo gel não-desnaturante, e as proteínas de H ou P foram eluídas e separadas por SDS-PAGE 10%, seguido de coloração pela prata ou eletrotransferência para membrana de nitrocelulose (painel SS). Os “Western blots” foram desenvolvidos com o soro imune anti-LbB2LJ diluído 1:200 (WB; poços H e P). A membrana foi revelada por quimioluminescência.

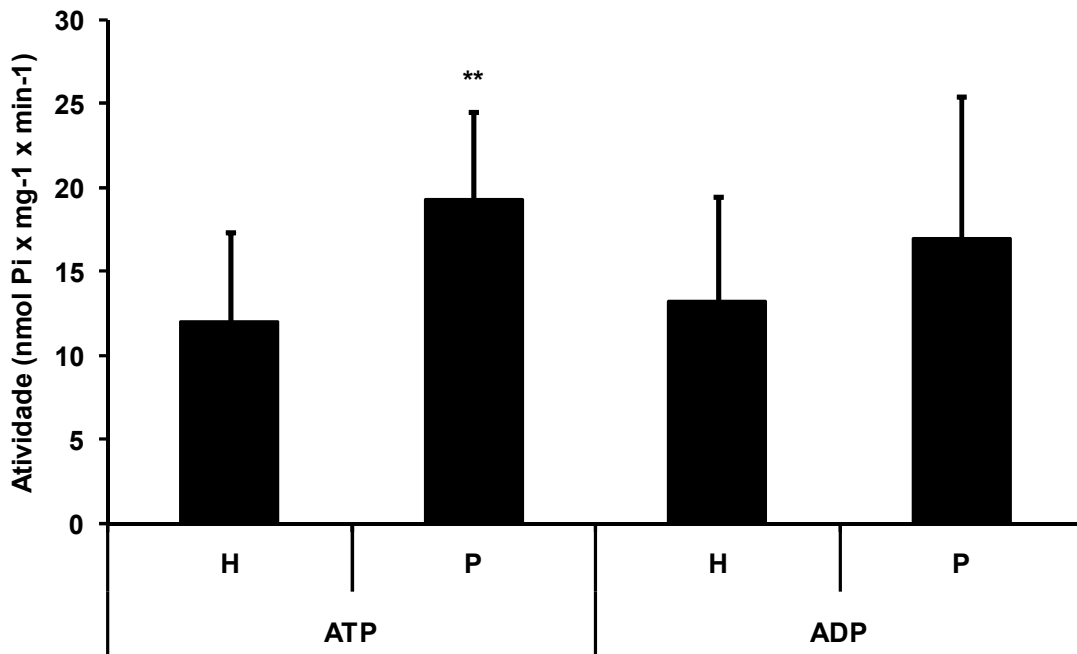


FIGURA 10. Atividade ATPásica (ATP) e ADPásica (ADP) de homogeneizado total (H) ou fração mitocondrial enriquecida (P) de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. A atividade enzimática foi medida em alíquota (0,01 mg/ml) de H ou P usando o meio de reação padrão contendo MOPS pH 7,4, 1 mM de CaCl₂ e 3 mM de ATP ou ADP, suplementado com 100 μM de ortovanadato e 100 μM de DCCD. A atividade ATPásica ou ADPásica está expressa em nmol Pi x mg⁻¹ x min⁻¹. Os resultados estão representados pela média ± desvio padrão de 4 experimentos diferentes, cada um deles feito em triplicata. A significância estatística da diferença entre H e P foi determinada usando Test *t* student. P < 0,01**.

A coloração pela prata permitiu a identificação de um polipeptídeo de aproximadamente 48 kDa em homogeneizado total (H), e outros de maior PM, possíveis agregados deste mesmo polipeptídeo ou proteínas contaminantes (FIGURA 9; painel SS, poço H). Na amostra de fração mitocondrial enriquecida, apenas um polipeptídeo de aproximadamente 48 kDa foi visualizado (FIGURA 9, painel SS, poço P).

Adicionalmente, o polipeptídeo de 48 kDa isolado de homogeneizado total (H) ou fração mitocondrial (P) por gel não desnaturante foi reconhecido pelo soro imune anti-LbB2LJ, confirmando a identidade da NTPDase 1 de *L. (V.) braziliensis* (FIGURA 9, painel WB). Após isolamento da banda ativa usando o fracionamento em gel não desnaturante, não foi possível a localização do polipeptídeo de 43 kDa, previamente identificado pelos soros imunes anti-LbB1LJ e anti-LbB2LJ como

NTPDase 1 (FIGURA 2), sugerindo que ele é resultante de uma proteólise inespecífica ou resultado de uma modificação pós-tradução e, possivelmente, de menor ou nenhuma atividade enzimática.

Em função dos resultados obtidos, alíquotas de fração mitocondrial enriquecida foram aplicadas em novo gel não desnaturante (100 µg/poço; 700 µg de proteína total) como aquele mostrado na Figura 9. Após a revelação de banda ativa com o substrato ATP, sua porção central foi cortada do gel e submetida aos procedimentos padrão para análise espectrométrica, conforme descrito em Material e Métodos, usando LCMS-IT-TOF/Schimatzu. A pureza da banda de 48 kDa foi confirmada por SDS-PAGE 10% e coloração pela prata (FIGURA 11; A). A análise espectrométrica permitiu a identificação de 3 peptídeos coincidentes com a NTPDase 1 anotada no NCBI (FIGURA 11; B; gi|134060473), correspondente a uma cobertura de 16% da sequência primária desta proteína (FIGURA 11; C).

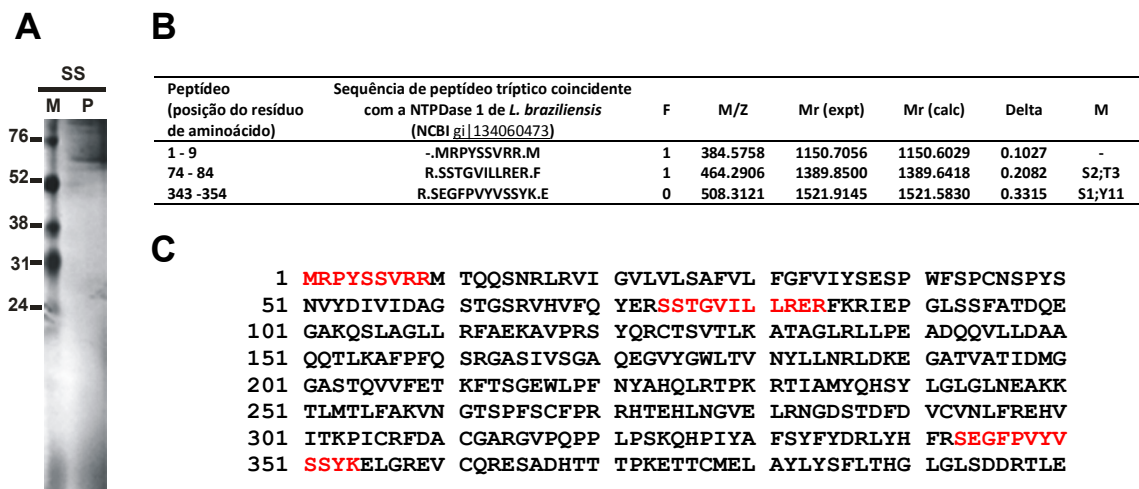


FIGURA 11. Identificação da NTPDase 1 de *L. (V.) braziliensis* por espectrometria de massas. A proteína de 48 kDa, de alto grau de pureza como mostrado por coloração pela prata (A) foi identificada como NTPDase 1 (NCBI, gi|134060473) por meio de três peptídeos coincidentes (B), correspondentes a uma cobertura de 16% da sequência primária desta proteína (C). F, falha na tripsinização; M/Z, massa/carga observada; Mr (expt), massa experimental; Mr (calc), massa calculada; Delta, diferença entre Mr (expt) e Mr (calc); M, possíveis modificações no peptídeo (S, T ou Y, fosforilação de serina, treonina ou tirosina).

4.9 IDENTIFICAÇÃO DA NTPDase 1 EM FORMA AMASTIGOTA INTRACELULAR DE *L. (V.) braziliensis* POR IMUNOCITOQUÍMICA E MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA

A detecção da NTPDase 1 de formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* foi feita por imunocitoquímica usando macrófagos infectados com o parasito e anticorpos policlonais anti-LbB1LJ (diluição 1:200) ou anti-r-potDomínio B (diluição 1:400), seguido de análises por microscopia de varredura confocal a laser.

Como mostrado na Figura 12, a reatividade de anticorpos anti-LbB1LJ (A-D) ou anti-r-potDomínio B (E-H) permitiu a identificação da NTPDase 1, revelada por anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugados ao Alexa Fluor 488, como evidenciado pelos sinais puntiformes verdes nas amastigotas (D, 400X, seta; H, 400X e “zoom”, seta), também mostrados em DIC (C, 400X, seta; G, 400X e “zoom”, seta). O núcleo do macrófago (n), bem como o núcleo e o cinetoplasto de amastigotas (seta, a) são mostrados pela marcação com DAPI (B, 400X; F, 400X e “zoom”) e, também em DIC, onde o aspecto geral dos macrófagos infectados é visualizado (FIGURA 13; A, 400X; E, 400X e “zoom”).

Nenhum sinal foi detectado quando somente os anticorpos secundários ou o soro normal de camundongo foram usados (dados não mostrados).

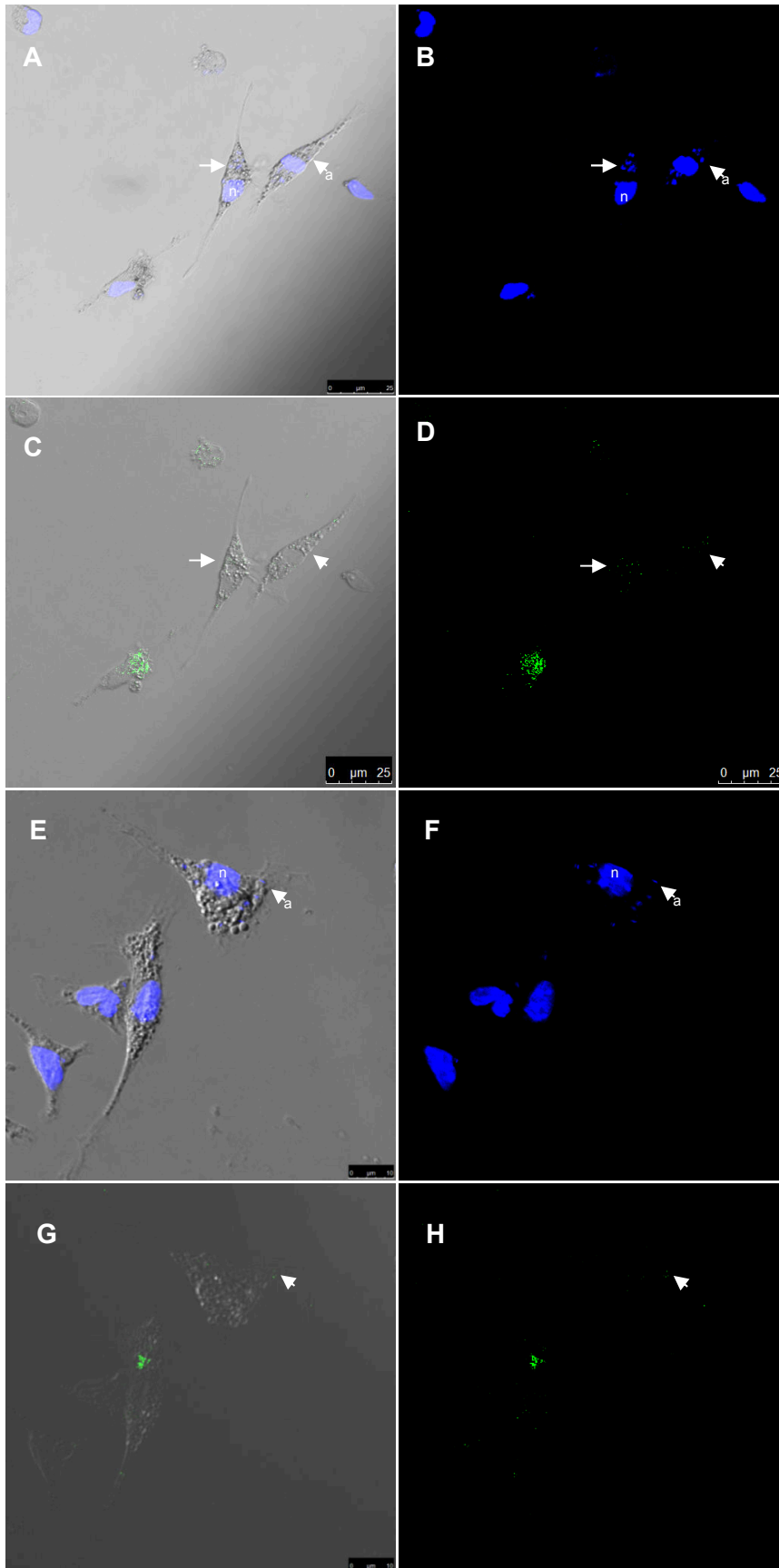


FIGURA 12. Identificação da NTPDase 1 em forma amastigota intracelular de *L. (V.) braziliensis*. Macrófagos infectados com amastigotas foram fixados em paraformaldeído 4% e permeabilizados em tampão PBS e Triton 0,1% e, em seguida, incubados com soro imune anti-LbB1LJ (A-D; 1:200) ou anti-anti-r-potDomínio B (E-H; 1:400) e, como secundários, anticorpos anti-IgG de camundongo conjugados ao Alexa Fluor 488 (1:1000). A análise foi feita por microscopia confocal de varredura usando para excitação o laser de diodo (405 nm) para DAPI (azul; A, B, E, F) e laser de argônio (488 nm) para Alexa Fluor 488 (verde; C, D, G, H). Os sinais puntiformes verdes de reatividade (C, D, G, H; setas) foram detectados nas amastigotas. As imagens foram também obtidas em DIC (A, C, E, G). A-D, 400X; E-H, 400X com "zoom". n, núcleo; a, amastigotas.

4.10 IDENTIFICAÇÃO DA NTPDase 1 DE FORMA AMASTIGOTA OBTIDA DE CÉLULAS VERO INFECTADAS COM *L. (V.) braziliensis* UTILIZANDO “WESTERN BLOTS”

Alíquotas (100 µg) de homogeneizado total de formas amastigotas recuperadas de cultura de células Vero infectadas (poço A) ou de promastigotas obtidas de cultura (poços P) foram submetidas à SDS-PAGE 10% e as proteínas foram coradas por Coomassie blue. Polipeptídeos distintos ou compartilhados entre as formas amastigotas (A) e promastigotas (P) foram evidenciados (FIGURA 13; painel CB).

“Western blots” desenvolvidos com o soro policlonal de camundongo anti-LbB2LJ permitiu a identificação da NTPDase 1 em formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* (A), com massa molecular de aproximadamente 48 kDa, idêntica àquela encontrada em promastigotas (P), confirmando a presença da proteína nesta fase do ciclo biológico do parasito (FIGURA 13; painel WB). Soros controle obtidos de camundongos normais não foram reativos com esta preparação (dados não mostrados).

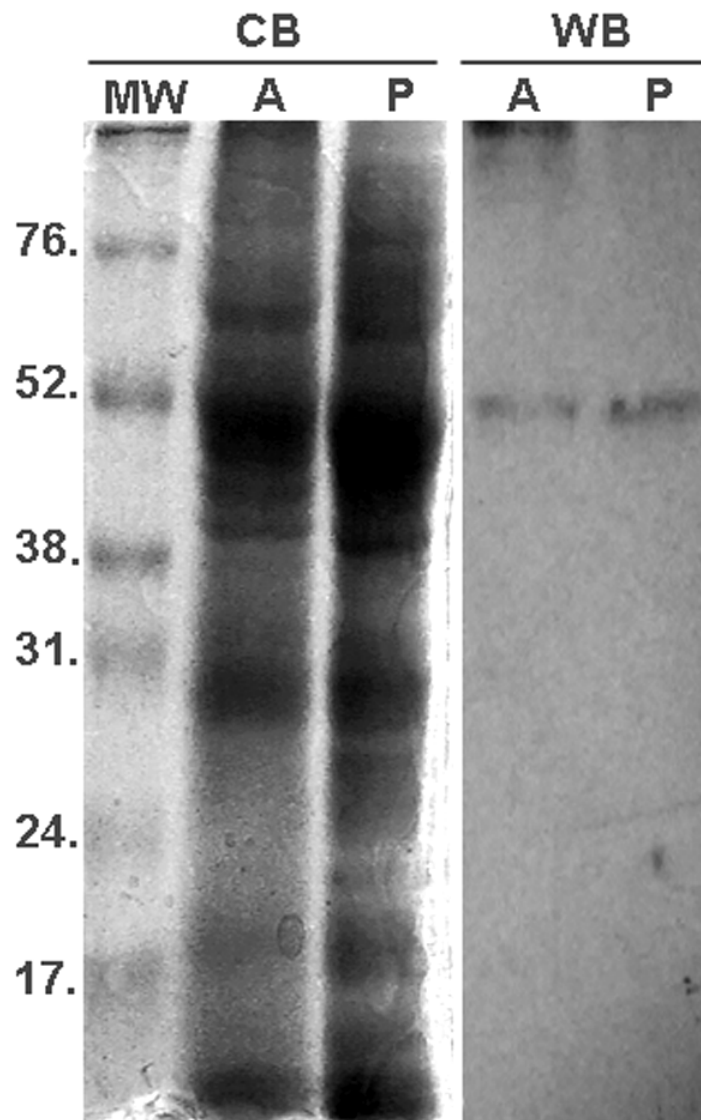


FIGURA 13. Identificação da NTPDase 1 de amastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Alíquotas (100 µg de proteína total) de homogeneizado total de amastigotas obtidas de cultura de células Vero infectadas (A) ou promastigotas (P) foram submetidas à eletroforese (SDS-PAGE 10%), e as proteínas foram coradas por Coomassie blue (Painel CB) ou eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose (painel WB). Os “Western blots” foram desenvolvidos com o soro imune anti-LbB2LJ diluído 1:200 (WB; poços A e P). A membrana foi revelada por quimioluminescência. MW, padrão de peso molecular pré-corado.

4.11 IDENTIFICAÇÃO DA NTPDase 1 EM FORMA AMASTIGOTA OBTIDA DE CÉLULAS VERO INFECTADAS COM *L. (V.) braziliensis* UTILIZANDO IMUNOCITOQUÍMICA E MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA

Por imunocitoquímica e microscopia confocal de varredura a laser, a NTPDase 1 foi também localizada em formas amastigotas recuperadas de células Vero infectadas com *L. (V.) braziliensis*.

A reatividade dos anticorpos anti-LbB1LJ (FIGURA 14) ou anti-LbB2LJ (FIGURA 15) permitiu identificar a NTPDase 1, revelada por anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugados ao Alexa Fluor 488, como evidenciado pelos sinais puntiformes verdes presentes nas amastigotas livres (FIGURA 14, D; FIGURA 15, D e H), também mostrados em DIC (FIGURA 14, C; FIGURA 15, C e G). O núcleo e o cinetoplasto das amastigotas são evidenciados pela marcação com DAPI (FIGURA 14, B; FIGURA 15, B e F), como também visualizados nas imagens obtidas em DIC (FIGURA 14, A; FIGURA 15; A e E).

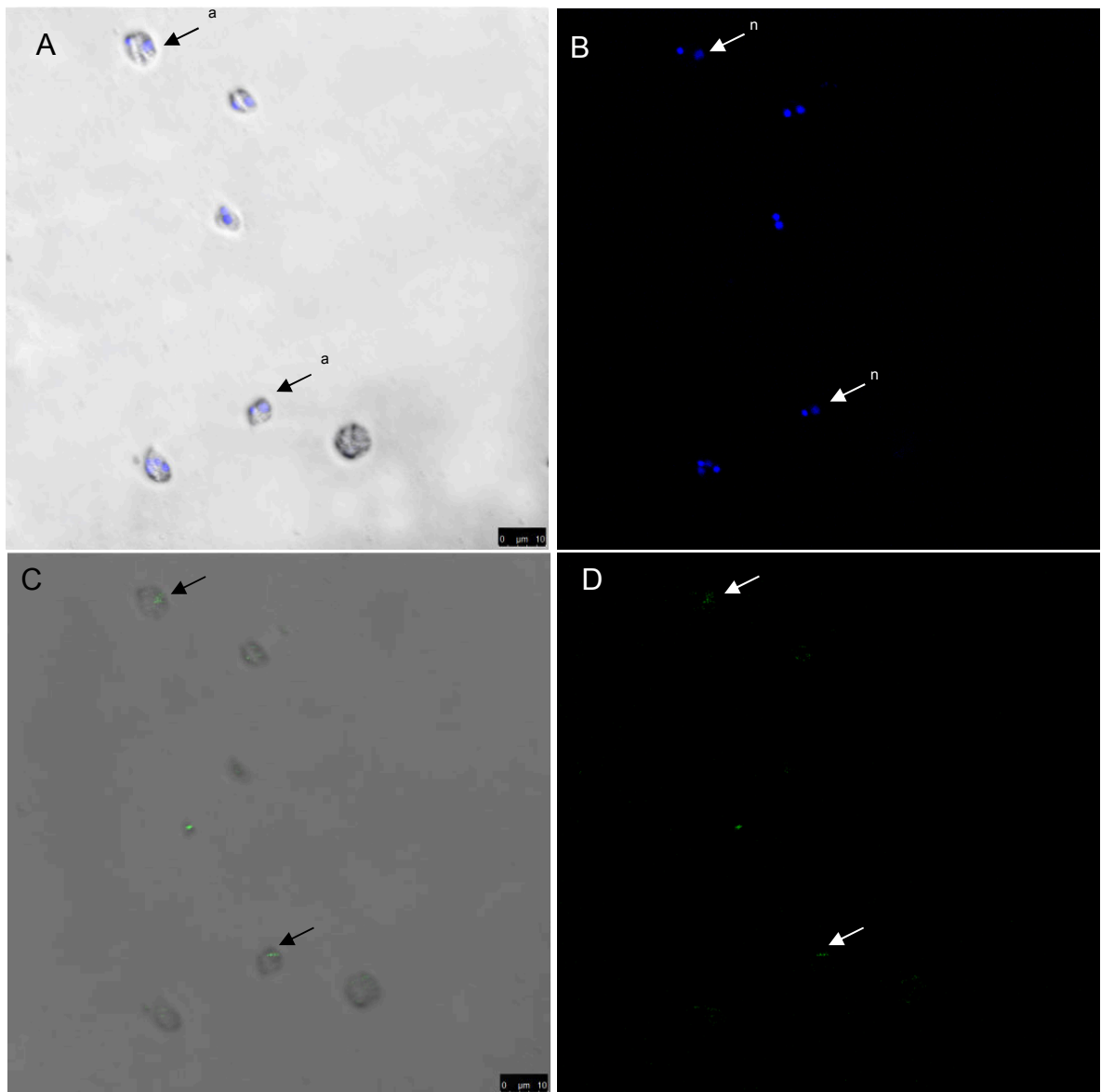


FIGURA 14. Identificação da NTPDase 1 em amastigotas de *L. (V.) braziliensis* por imunocitoquímica utilizando soro imune anti-LbB1LJ. Formas amastigotas foram obtidas de cultura de células Vero infectadas com *L. (V.) braziliensis*, fixadas em paraformaldeído 4% e permeabilizadas em tampão PBS e Triton 0,1% e, em seguida, incubadas com soro imune anti-LbB1LJ (A-D; 1:200) e, como secundários, anticorpos anti-IgG de camundongo conjugados ao Alexa Fluor 488 (1:1000). A análise foi feita por microscopia confocal de varredura usando para excitação o laser de diodo (405 nm) para DAPI (azul; A, B) e laser de argônio (488 nm) para Alexa Fluor 488 (verde; C, D). As imagens obtidas em DIC (A, C) mostram o aspecto geral das amastigotas. Os sinais puntiformes verdes de reatividade (C, D; setas) são evidenciados nas amastigotas. A-D, 660X e “zoom”; n, núcleo; a, amastigotas.

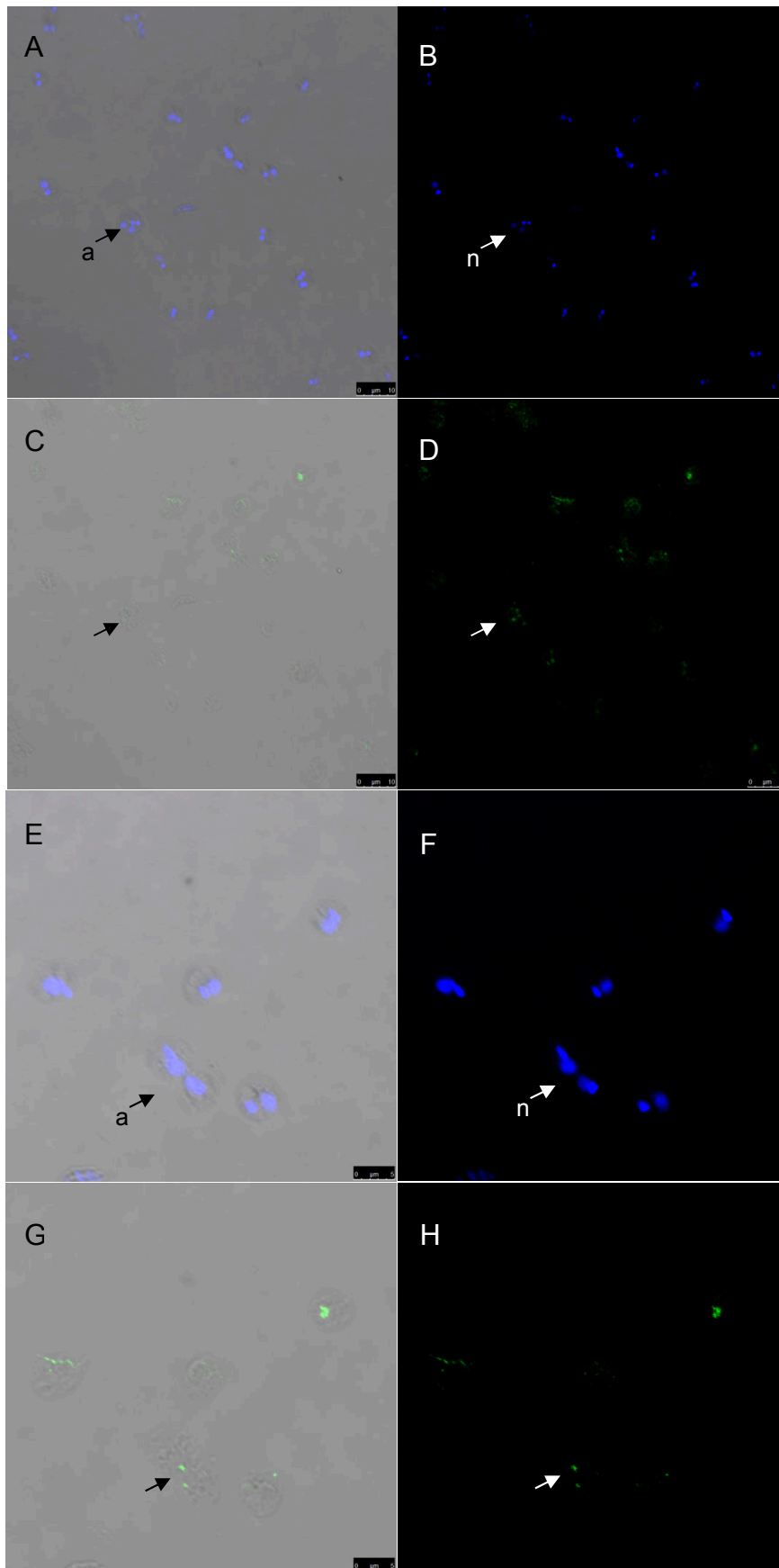


FIGURA 15. Identificação da NTPDase 1 em amastigotas de *L. (V.) braziliensis* por imunocitoquímica utilizando soro imune anti-LbB2LJ (1:200). Formas amastigotas foram obtidas de cultura de células Vero infectadas com *L. (V.) braziliensis*, fixadas em paraformaldeído 4% e permeabilizadas em tampão PBS e Triton 0,1% e, em seguida, incubadas com soro imune anti-LbB2LJ (A-H; 1:200) e, como secundários, anticorpos anti-IgG de camundongo conjugados ao Alexa Fluor 488 (1:1000). A análise foi feita por microscopia confocal de varredura usando para excitação o laser de diodo (405 nm) para DAPI (azul; A, B, E, F) e laser de argônio (488 nm) para Alexa Fluor 488 (verde; C, D, G, H). Os sinais puntiformes verdes de reatividade (C, D, G, H; setas) são evidenciados nas amastigotas. As imagens obtidas em DIC (A, C, E, G) mostram o aspecto geral das amastigotas. A-D, 400X; E-H, 660X e "zoom"; n, núcleo; a, amastigotas.

4.12 AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE DERIVADOS DOS ÁCIDOS ALQUILAMINOALCANOTIOSSULFÚRICOS (AAATs)

Culturas de macrófagos foram incubadas com os derivados AAATs e, como mostrado na Tabela 1, SIPA, SSEC, IBSS, NPSO, SXIP e TBSO tiveram baixa citotoxicidade com valores de $CC_{50} > 100 \mu\text{M}$.

Os derivados AAATs foram então testados *in vitro* contra as formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Os compostos SIPA ($IC_{50} 25 \mu\text{M}$), SSEC ($IC_{50} 34 \mu\text{M}$) e NPSO ($IC_{50} 55 \mu\text{M}$) tiveram significativa atividade leishmanicida contra promastigotas em cultura, enquanto o IBSS, SXIP e TBSO foram menos efetivos, com valores de $IC_{50} > 80 \mu\text{M}$ (TABELA 1).

Contra amastigotas intracelulares, os mais efetivos foram os compostos SIPA ($IC_{50} 25 \mu\text{M}$), SSEC ($IC_{50} 29 \mu\text{M}$), e IBSS ($IC_{50} 35 \mu\text{M}$), enquanto NPSO, SXIP e TBSO foram menos efetivos, com valores de $IC_{50} > 80 \mu\text{M}$ (TABELA 1).

O DMSO foi também testado como o controle no mesmo volume usado para solubilizar os AAATs, e quando comparado à proliferação de promastigotas ou amastigotas *in vitro*, nenhuma alteração foi observada (dados não mostrados).

Os compostos anfotericina B e miltefosina, os quais são efetivos leishmanicidas, foram usados como controles deste experimento (TABELA 1).

Uma infecção típica de macrófagos em cultura por amastigotas de *L. (V.) braziliensis* é ilustrada na Figura 16A, com a evidência de um vacúolo multiparasitado. O efeito de derivados AAATs sobre as amastigotas intracelulares é também mostrado, com destaque para o SIPA (B, $25 \mu\text{M}$), SSEC (C, $25 \mu\text{M}$) e IBSS (D, $50 \mu\text{M}$) que nas concentrações indicadas foram aptos a reduzir aproximadamente 50% da proliferação das amastigotas (FIGURA 16).

TABELA 1. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade de derivados AAATs para macrófagos e dos efeitos destes compostos sobre a proliferação de promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. (V.) braziliensis*.

Composto	Macrófagos CC₅₀ (µM) (95% C.I.)^a	Promastigotas IC₅₀ (µM) (95% C.I.)^a	Amastigotas IC₅₀ (µM) (95% C.I.)^a
SIPA	109,99 (89,91-134,55)	25,02 (19,72-31,75)	24,67 (19,66-30,96)
SSEC	117,48 (96,55-142,94)	33,89 (29,43-39,03)	28,75 (22,30-37,07)
IBSS	148,32 (102,08-215,40)	>100,0	34,51 (28,09-42,38)
NPSO	111,80 (84,25-148,35)	54,64 (47,70-62,59)	85,67 (55,47-132,30)
SXIP	> 150,0	81,01 (71,48-91,80)	>100,0
TBSO	> 150,0	>100,0	>100,0
Miltefosina	99,8 (85,6-116,3)	25,5 (22,1-29,7)	5,9 (5,0-7,1)
Anfotericina B	NT	0,12 (0,09-0,14)	0,06 (0,05-0,08)

a, intervalo de confiança calculado pelo método de Litchfiet e Wilcoxon.

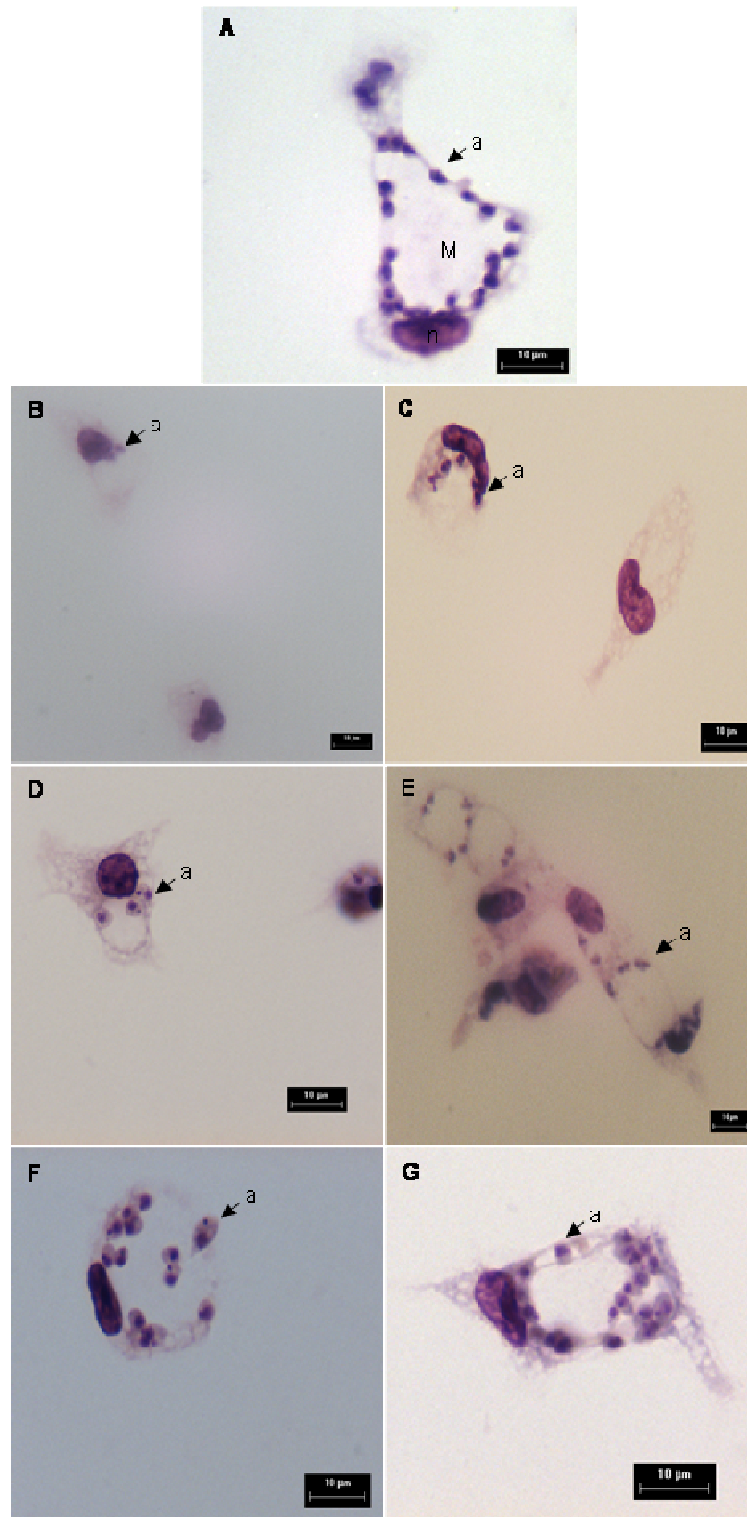


FIGURA 16. Ação dos derivados AAATs sobre amastigotas intracelulares (a, seta) de *L. (V.) braziliensis*. A, macrófagos infectados (M), sem adição de AAAT, ou com adição de SIPA (B, 25 μ M); SSEC (C, 25 μ M); IBSS (D, 50 μ M); NPSO (E, 100 μ M); SXIP (F, 100 μ M); ou TBSO (G, 100 μ M). n, núcleo. As células foram coradas pelo Giemsa, e visualizadas por microscopia de luz (1000x).

4.13 EFEITOS DE DERIVADOS DOS AAATs SOBRE A ATIVIDADE FOSFOHIDROLÍTICA DE PREPARAÇÃO DE PROMASTIGOTAS DE *L. (V.) braziliensis*

A preparação de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foi pré-incubada durante 30 minutos a 37°C com SIPA (A), SSEC (B), IBSS (C), NPSO (D), SXIP (E) ou TBSO (F) nas concentrações de 1 a 1000 µM, e em seguida as atividades ATPásica e ADPásica foram medidas em meio de reação padrão (FIGURA 17).

Como mostrado na Figura 17A, O SIPA alterou 16 a 30% da atividade ATPásica quando as concentrações 1 a 100 µM do composto foram usadas, alcançando a máxima inibição (45%) desta atividade com 1 mM, sugerindo um K_i próximo deste valor (FIGURA 17A). A máxima inibição de atividade ADPásica foi alcançada com 10 µM (45%) deste composto, mantendo esta mesma proporção até a última concentração testada (1 mM), sugerindo um K_i próximo de 10 µM quando o ADP foi o substrato (FIGURA 17A).

A inibição da atividade ATPásica foi dependente da concentração de SSEC (FIGURA 17B), e uma progressiva e significativa redução (1 µM, 15%; 10 µM, 22%; 100 µM, 36%; 1 mM, 67%; $P < 0,01$) foi observada quando comparada ao valor do controle. Inibição significativa ($P < 0,01$) da atividade ADPásica foi observada nas concentrações 100 µM (42%) e 1000 µM (48%), sugerindo um valor de K_i entre 100 e 1000 µM para ambos os substratos (FIGURA 17B).

Quando IBSS foi testado, apenas a concentração 1 mM foi apta a inibir a atividade ADPásica (66%), enquanto a atividade ATPásica foi inibida significativamente e progressivamente (1 µM, 10%; 10 µM, 16%; 100 µM, 33%; 1 mM, 69%; $p < 0,01$), sugerindo um valor de K_i entre 100 µM e 1 mM (FIGURA 17C).

Para NPSO, uma progressiva e significativa redução da atividade ATPásica foi observada nas concentrações de 1 µM a 1000 µM (1 µM, 31%; 10 µM, 60%; 100 µM, 82%; 1 mM, 88%; $p < 0,01$), sugerindo um valor de K_i de aproximadamente 10 µM (FIGURA 17D). Uma redução progressiva e significativa foi também observada quando o substrato foi o ADP (1 µM, 47%; 10 µM, 56%; 100 µM, 66%, 1 mM, 67%) sugerindo um valor de K_i entre 1 e 10 µM (FIGURA 17D).

O SXIP inibe significativamente ($P < 0,05$) as atividades ATPásica e ADPásica nas concentrações 100 µM (ATP, 43%; ADP, 26%) e 1 mM (ATP, 51%; ADP, 57%), sugerindo um K_i de aproximadamente 1 mM (FIGURA 17E).

O derivado TBSO inibiu significativamente 27% ($P < 0,05$) da atividade ADPásica quando foi usado na concentração 1 μM , mas ao aumentar a concentração deste composto não foi possível observar inibição da hidrólise de ADP (FIGURA 17F). Quando o ATP foi o substrato, a inibição foi variável nas diversas concentrações do composto (1 μM , 18%; 10 μM , 31%; 100 μM , 21%; $P < 0,05$), não inibindo significativamente a atividade ATPásica na última concentração testada (1 mM, 15%) (FIGURA 17F).

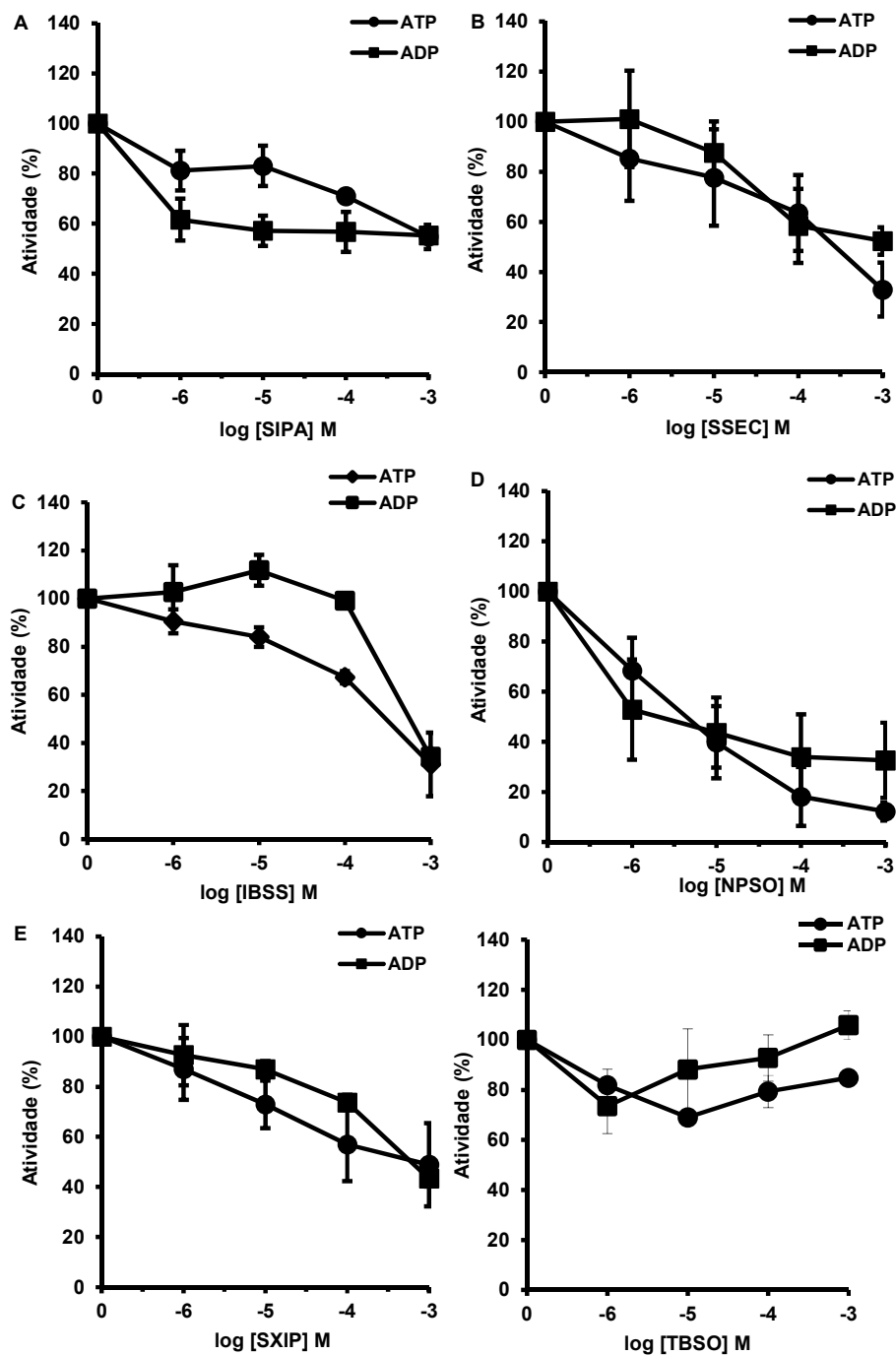


FIGURA 17. Inibição da atividade NTPDásica da preparação de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* pelo SIPA (A), SSEC (B), IBSS (C), NPSO (D), SXIP (E) ou TBSO (F). Uma alíquota de preparação de promastigotas (0,1 mg proteína/ml) foi pré-incubada por 30 min a 37°C em meio de reação padrão contendo as concentrações indicadas de AAAT e, subsequentemente, 3 mM de ATP ou ADP foi adicionado, dando início à reação enzimática. A média de atividade ATPásica ou ADPásica na presença de 2,5% (v/v) de dimetil sulfóxido (controle 100%) foi $17,10 \pm 3,94$ nmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹ e $7,85 \pm 1,71$ nmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹, respectivamente. A Figura mostra a média de quatro experimentos diferentes para cada AAAT, cada um deles feito em triplicatas.

4.14 EFEITOS DO SIPA SOBRE AMASTIGOTAS DE *L. (V.) braziliensis* RECUPERADAS DE CÉLULAS VERO

Formas amastigotas recuperadas de células Vero foram incubadas durante 24 h com o composto SIPA nas concentrações 5 a 100 μM , e sua viabilidade foi medida pelo método MTT. Como mostrado na Tabela 2, SIPA teve atividade leishmanicida com IC_{50} 20 μM , um valor similar ao fármaco Miltefosina (24 μM), usado neste experimento como um controle positivo.

TABELA 2. Avaliação *in vitro* do efeito do derivado SIPA sobre amastigotas de *L. (V.) braziliensis* recuperadas de células Vero.

Compostos	Amastigotas
	IC_{50} (μM) (95% C.I.) ^a
SIPA	20,13 (16,80-24,11)
Miltefosina	23,61 (19,08-29,21)

a, intervalo de confiança calculado pelo método de Litchfiet e Wilcoxon.

4.15 EFEITOS DO SIPA SOBRE A ATIVIDADE FOSFOHIDROLÍTICA DE PREPARAÇÃO DE AMASTIGOTAS DE *L. (V.) braziliensis*

Alíquotas de homogeneizado total de formas amastigotas recuperadas de cultura de células Vero infectadas com *L. (V.) braziliensis* foram pré-incubadas durante 30 minutos a 37°C com SIPA, o composto que mostrou-se o mais efetivo leishmanicida entre os derivados AAATs testados, com IC_{50} em torno de 25 μM para promastigotas ou amastigotas intracelulares (TABELA 1) e, como confirmado, para formas amastigotas recuperadas de células Vero (TABELA 2). Em seguida, a atividade fosfohidrolítica foi medida usando meio de reação padrão. Como mostrado na Figura 18, a inibição da atividade ATPásica foi dependente da concentração de SIPA, e uma progressiva e significativa redução (1 μM , 27%; 10 μM , 38%; 100 μM , 56%; 1 mM, 60%; $P < 0,01$) foi observada quando comparada ao valor do controle.

Resultado similar foi observado para o substrato ADP, com inibição significativa ($P < 0,01$) da atividade ADPásica nas concentrações 1 μM (37%) e 10 μM (29%), alcançando em torno de 50% de inibição quando as concentrações 100 e 1 mM foram testadas. Estes resultados sugerem um K_i em torno de 10 a 100 μM (FIGURA 18).

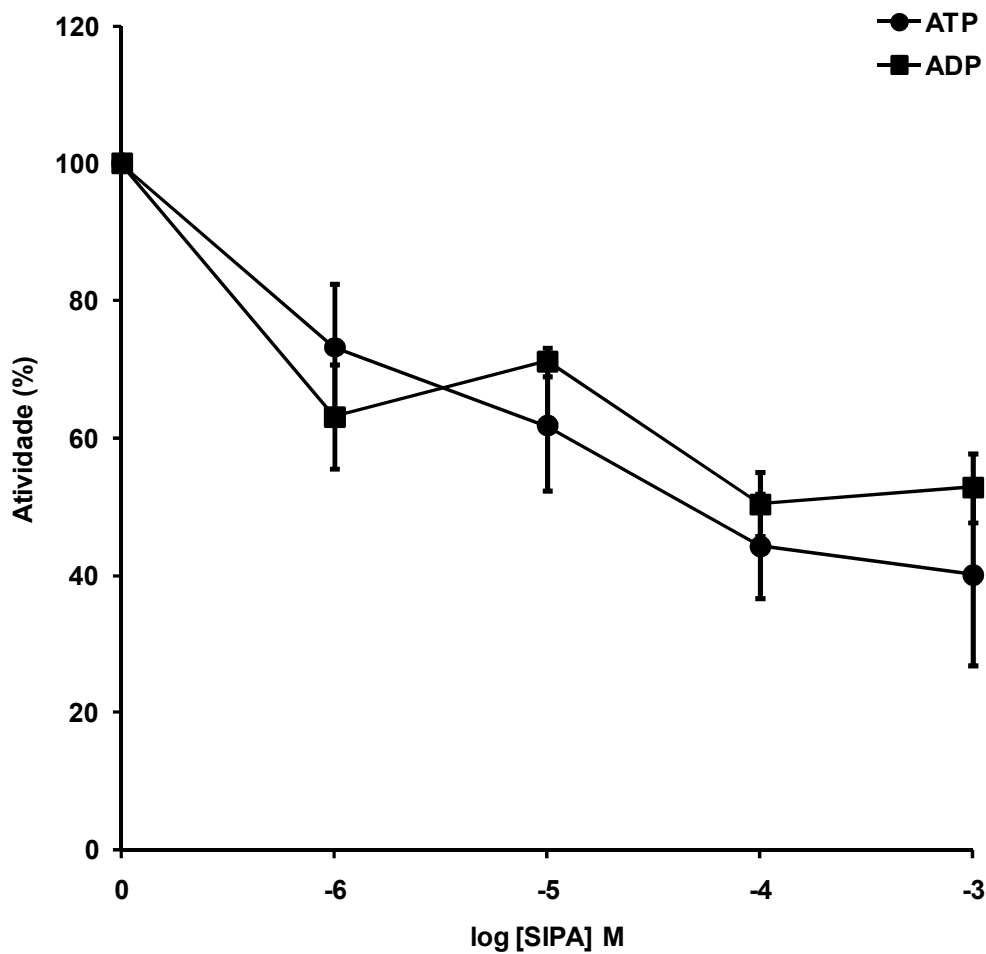


FIGURA 18. Inibição da atividade NTPDásica da preparação de amastigotas de *L. (V.) braziliensis* recuperadas de células Vero por SIPA. Uma alíquota de preparação de amastigotas (0,1 mg proteína/ml) foi pré-incubada por 30 min a 37°C em meio de reação padrão contendo as concentrações indicadas do SIPA e, subsequentemente, 3 mM de ATP ou ADP foi adicionado, dando início à reação enzimática. A média de atividade ATPásica ou ADPásica na presença de 2,5% (v/v) de dimetil sulfoxido (controle 100%) foi $33,81 \pm 3,71$ nmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹ e $6,01 \pm 4,06$ nmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹, respectivamente. A Figura mostra a média de dois experimentos diferentes, cada um deles feito em triplicatas.

4.16 EFEITOS DO SIPA SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_m$) DE FORMAS AMASTIGOTAS DE *L. (V.) braziliensis*

Os efeitos do SIPA sobre o potencial de membrana mitocondrial foi avaliado por espectrofluorimetria. Como mostrado na Figura 19, amastigotas na ausência de SIPA acumulou o corante lipofílico (carbocianina catiônica lipofílica JC-1) no interior da membrana mitocondrial, a qual é negativa, agregando-se no interior desta organela e emitindo fluorescência vermelha, mostrando a geração de voltagem pela membrana mitocondrial e a produção de gradiente eletroquímico. Por outro lado, SIPA 30 μM reduziu significativamente 28% desta capacidade, como observado pela emissão de fluorescência verde, um indicativo que o corante lipofílico permaneceu em sua forma monomérica, e que o potencial de membrana mitocondrial foi alterado.

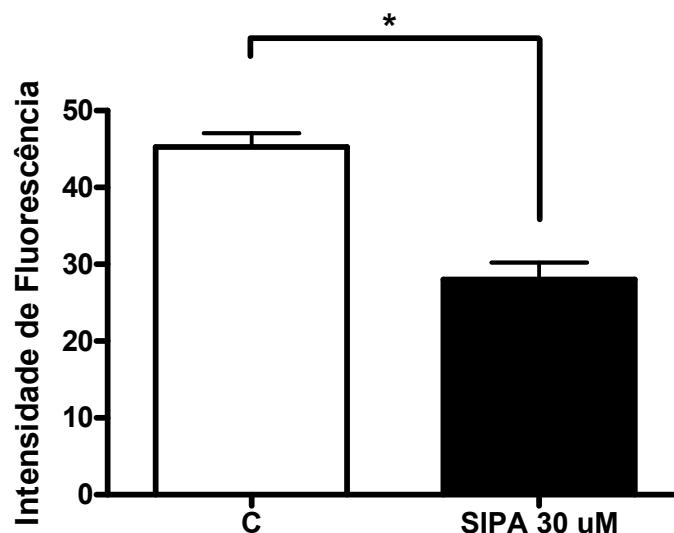


FIGURA 19. SIPA induz alterações no potencial de membrana mitocondrial de formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Amastigotas obtidas de células Vero foram tratadas com 30 μM de SIPA por 24 h e marcadas com JC-1 (10 $\mu\text{g/ml}$). O experimento foi feito em triplicata (média \pm DP), e a alteração no valor do potencial de membrana mitocondrial foi calculado pela razão entre a fluorescência vermelha e verde multiplicada por 100 (528/600 par de emissão e, 485/540 par de excitação; fluorímetro FLX 800 multiscan, Biotek). A significância dos dados (* $P < 0,05$) foi obtida utilizando-se o teste Mann Whitney.

5. DISCUSSÃO

5.1 LOCALIZAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DA NTPDase 1 DE *Leishmania (V.) braziliensis* E EFEITOS DOS ANTICOPOS ANTI-PEPTÍDEOS

Neste trabalho nós mostramos que anticorpos policlonais produzidos contra peptídeos sintéticos LbB1LJ (r82-103) e LbB2LJ (r102-121), os quais abrangem o domínio B antigênico e conservado da NTPDase 1 de *L. (V.) braziliensis* (PEACOCK et al. 2007; NCBI XP_001562178.1) foram aptos a reconhecer esta proteína em formas promastigotas deste parasito.

Como mostrado, os soros imunes anti-LbB1LJ e anti-LbB2LJ identificaram duas bandas de aproximadamente 48 e 43 kDa em “Western blots” de homogeneizado total de promastigotas. Imobilizados em proteína A-Sepharose, estes anticorpos imunoprecipitaram os mesmos polipeptídeos, como observado por “Western blots” do imunocomplexo resina-anticorpo-antígeno, nos quais os polipeptídeos isolados deste imunocomplexo foram reconhecidos por anticorpos policlonais de coelho anti-apirase de batata, confirmando a identificação prévia da NTPDase 1 de *L. (V.) braziliensis* obtida pela imunoreatividade cruzada com este soro imune (REZENDE-SOARES et al. 2010) ou com anticorpos produzidos contra r-potDomínio B, um polipeptídeo recombinante fusionado a hexahistidina derivado do domínio B da apirase de batata (r78-117) (MAIA et al. 2011; PORCINO, 2012).

A banda de 48 kDa possivelmente corresponde a NTPDase anotada no genoma de *L. braziliensis* (PEACOCK et al. 2007; NCBI XP_001562178.1) de massa molecular predita de 47,689 Da e, como foi a primeira a ter a sua expressão comprovada, nós a denominamos NTPDase 1, motivo de recente publicação (PORCINO et al. 2012). O polipeptídeo de 43 kDa, também reconhecido pelos anticorpos, é o possível resultado de um processo proteolítico postranscricional da NTPDase 1 de *L. (V.) braziliensis*, ou de uma proteólise inespecífica durante o experimento, como previamente relatado (REZENDE-SOARES et al. 2010; MAIA et al. 2011).

Em adição, esses anticorpos policlonais imobilizados em proteína A-Sepharose imunodepletaram aproximadamente 40% da atividade fosfohidrolítica da NTPDase 1 de preparação de promastigotas. É interessante observar que não existe identidade significativa entre os peptídeos sintéticos LbB1LJ e LbB2LJ e suas respectivas contrapartes da GDPase, um proteína hipotética anotada no genoma de *L. braziliensis* (PEACOCK et al. 2007; XP_001562788) de massa molecular predita de 75 kDa, também pertencente à família das NTPDases, e que não foi ainda caracterizada neste parasito. Portanto, os anticorpos usados neste trabalho são considerados específicos para a NTPDase 1, não descartando porém que a atividade enzimática remanescente pode ter a contribuição desta GDPase.

Todos juntos, esses resultados mostraram a especificidade, sensibilidade e afinidade dos anticorpos policlonais de camundongo anti-LbB1LJ ou anti-LbB2LJ para epitopos do domínio B (r82-121) da NTPDase 1 de *L. (V.) braziliensis*. Como recentemente demonstrado por nosso grupo usando estes mesmos anticorpos, o domínio B é altamente conservado nas NTPDases de *L. infantum* (MAIA et al. 2013) e *L. amazonensis* (DETONI et al. 2013), bem como nas NTPDases hipotéticas anotadas nos genomas de *L. major*, *L. donovani* e *L. mexicana*. Possivelmente, este domínio protéico foi mantido evolutivamente no parasito para a modulação de resposta imune do hospedeiro (FARIA-PINTO et al. 2008; VASCONCELOS et al. 2009; MAIA et al. 2011; PORCINO, 2012; PORCINO et al. 2012)

As NTPDases de parasitos têm sido descritas por nós e por outros autores como ecto-enzimas na superfície do parasito (KIKUCHI et al. 2001; COIMBRA et al. 2002; FARIA-PINTO et al. 2004, 2006; PINHEIRO et al. 2006; GUEVARA-FLORES et al. 2008; SANTOS et al. 2009; MEYER-FERNANDES et al. 2010; RUCKERT et al. 2010; SANSOM, 2012). Como aqui demonstrado por imunocitoquímica e análise ultraestrutural, os anticorpos policlonais de camundongo anti-LbB1LJ ou anti-LbB2LJ identificaram especificamente a NTPDase 1 na superfície da membrana plasmática, bolsa flagelar e flagelo, mitocôndria e cinetoplasto, no núcleo e associada a vesículas citoplasmáticas de promastigotas, confirmando os resultados previamente reportados por nós (REZENDE-SOARES et al. 2010), quando foi evidenciada por citoquímica e análise ultraestrutural a ampla distribuição da atividade fosfohidrolítica desta enzima na superfície da membrana plasmática, bolsa flagelar e flagelo, mitocôndria e cinetoplasto. Resultados similares foram evidenciados posteriormente em estudos da NTPDase de *Trypanosoma cruzi*, uma proteína que é também

amplamente distribuída em epimastigotas (MARIOTINI-MOURA et al. 2014), possivelmente uma característica em comum entre as NTPDases de tripanosomatídeos.

A *Leishmania* usa metabólitos do ambiente como fonte de energia para o seu crescimento e mudanças morfológicas durante o ciclo de vida. O parasito interage com o hospedeiro pela participação direta dos componentes de sua superfície ou por secreção, sendo a bolsa flagelar uma organela com intensa atividade endocítica e exocítica em *Leishmania* (DE SOUZA, 2008; SILVERMAN et al. 2008; CUERVO et al. 2009; COSTA et al. 2011). A associação entre a atividade NTPDásica e a virulência de promastigotas de *L. amazonensis* (DE SOUZA et al. 2011) ou *L. braziliensis* (LEITE et al. 2012) intervindo na resposta inflamatória do hospedeiro foi recentemente demonstrada. Portanto, esta distribuição ubíqua da NTPDase 1 em promastigotas aqui demonstrada sugere a sua participação em vias metabólicas distintas envolvidas desde os estágios iniciais da infecção por *Leishmania*, e que podem ser importantes para a sobrevivência, infectividade e/ou virulência deste parasito.

A localização da NTPDase 1 em mitocôndria e cinetoplasto de *Leishmania* por meio de imunocitoquímica e análise ultraestrutural foi uma descoberta que induziu aprofundarmos nesta investigação. Como demonstrado, a fração mitocondrial de promastigotas foi obtida, e as medidas de hidrólise de ATP e ADP sugeriram um enriquecimento da atividade NTPDásica nesta organela subcelular. A NTPDase 1 ativa foi então isolada por meio de gel não desnaturante e, por “Western blots” e espectrometria de massas, a expressão e identidade de forma ativa de NTPDase 1 na mitocôndria foram confirmadas. A proliferação de promastigotas é dependente principalmente da glicólise aeróbia ou anaeróbia e do metabolismo de aminoácidos como fonte primária de geração de energia, vias que envolvem os glicossomos e a mitocôndria, com um ciclo ativo dos ácidos tricarbóxicos ligado a cadeia de transporte de elétrons. Em amastigotas, o metabolismo energético também envolve os glicossomos e a mitocôndria, e a β -oxidação de ácidos graxos é a principal via geradora de energia. A mitocôndria, além de ser uma organela central no metabolismo energético de *Leishmania*, também contém o cinetoplasto, que consiste de uma rede fibrosa de DNA mitocondrial (kDNA), correspondente a 30% do DNA celular total, e que codifica proteínas componentes da cadeia respiratória e da maquinaria de tradução mitocondrial (OPPERDOES e COOMBS, 2007; OPPERDOES e MICHELS, 2008). Estes resultados são indícios de que a NTPDase

1 desempenha importante função na mitocôndria única de *Leishmania*, o que pode envolver tanto as vias do metabolismo energético, quanto aquelas de síntese do kDNA ou de proteínas codificadas por ele, estimulando novos estudos funcionais. Além disso, a NTPDase 1 de mitocôndria pode representar uma nova estratégia terapêutica contra a *Leishmania*, tendo esta proteína como o alvo.

A reatividade entre os peptídeos sintéticos LbB1LJ ou LbB2LJ e soros de pacientes com LC confirmaram a antigenicidade do domínio B de *L. (V.) braziliensis*, também comprovada pela produção de anticorpos quando eles foram injetados em camundongos BALB/c (CARVALHO-CAMPOS, 2011). Em trabalho subsequente, anticorpos produzidos contra o r-potDomínio B, que abrange todo o domínio B derivado da apirase de batata, foram aptos a localizar a proteína na superfície da membrana plasmática e, também, em organelas subcelulares de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, além de inibirem a atividade ATPásica (22%) e ADPásica (72%) de homogeneizado, e reduzirem 42% da proliferação *in vitro* destes parasitos (MAIA et al. 2011; PORCINO, 2012). Este conjunto de resultados, associados à imunolocalização da NTPDase 1 por anticorpos anti-LbB1LJ e anti-LbB2LJ, demonstrando que ambas as porções N- e C-terminal são ligadoras de anticorpos, nos motivaram a investigar a especificidade da inibição da atividade enzimática e a redução da proliferação de promastigotas *in vitro* promovidas por estes dois novos soros imunes.

Como mostrado neste trabalho, as atividades ATPásica (79%) e ADPásica (43%) de preparação de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* homogeneizada em detergente foi parcialmente inibida por anticorpos anti-LbB1LJ, os quais foram mais efetivos que a inibição da hidrólise de ATP (47%) ou ADP (18%) promovida pelos anticorpos anti-LbB2LJ. Estes resultados sugerem que o bloqueio do domínio B por anticorpos, principalmente aqueles dirigidos ao(s) epitopo(s) de sua porção N-terminal (r82-103), pode alterar a sua atividade catalítica e, conseqüentemente, as funções desta proteína.

Paralelamente, o potencial dos anticorpos produzidos contra os peptídeos sintéticos potB1LJ e potB2LJ, de alta identidade com os peptídeos LbB1LJ e LbB2LJ, foram também avaliados. Por análise ultraestrutural e imunocitoquímica, os anticorpos anti-potB1LJ localizaram a NTPDase 1 na superfície da membrana plasmática, vesículas citoplasmáticas, bolsa flagelar, cinetoplasto e núcleo de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, um resultado idêntico àquele obtido quando os

soros imunes anti-LbB1LJ e anti-LbB2LJ foram utilizados. Além disso, os anticorpos potB1LJ inibiram em torno de 60% as atividades ATPásica e ADPásica, enquanto os anticorpos anti-potB2LJ inibiram 60% da atividade ATPásica, e em menor extensão (29%) a atividade ADPásica, corroborando os resultados obtidos com os anticorpos específicos anti-LbB1LJ e anti-LbB2LJ.

Embora não possamos descartar a contribuição de atividade enzimática da GDPase hipotética, as diferentes porcentagens de inibição da hidrólise de ATP ou ADP sugerem um papel modulatório do domínio B na atividade catalítica da NTPDase de *L. (V.) braziliensis*, reforçando ser ele um alvo para a criação de inibidores específicos. Para os estudos que associam atividade enzimática e inibição por anticorpos nós estabelecemos previamente um meio de reação contendo 1 mM de Ca^{2+} (COIMBRA et al. 2002, 2008; MAIA et al. 2011; REZENDE-SOARES et al. 2010), uma vez que elevada concentração molar (1-10 mM) desse íon bivalente poderia inibir a ligação antígeno-anticorpo, como tem sido evidenciado por outros autores (ZHOU et al. 2005; BECK et al. 2007). É possível que esse meio de reação mantenha a NTPDase 1 em conformação similar à sua forma nativa e, como predito por modelagem molecular (FARIA-PINTO et al. 2008; MAIA et al. 2011), esse domínio B é mantido exposto na superfície da proteína, disponível para a ligação de anticorpos. Esses novos dados motivam estudos de um recombinante ativo da NTPDase 1 de *L. (V.) braziliensis* e, comparativamente, outros com mutagêneses sítio dirigidas no domínio B, o que permitirá a identificação dos resíduos de aminoácidos que de fato compõem os epítopos.

Nos experimentos *in vitro* de proliferação destes parasitos, os dois soros imunes – anti-LbB1LJ e anti-LbB2LJ- foram significativamente citotóxicos. O soro imune anti-LbB1LJ, que inibiu com mais eficiência a atividade da NTPDase 1, reduziu 67% do crescimento celular, enquanto o soro imune anti-LbB2LJ reduziu 33%, o que foi confirmado quando os soros imunes anti-potB1LJ e anti-potB2LJ foram usados sob as mesmas condições experimentais, induzindo 73% e 40% de redução de proliferação celular, respectivamente. Estes dados sugerem fortemente que existe de fato uma associação entre a ligação de anticorpos e redução de atividade catalítica, mais eficiente quando é dirigida à porção N-terminal do domínio B da NTPDase, e o bloqueio funcional da proteína levando a morte do parasito.

Em estudos prévios, a NTPDase de *T. gondii* foi caracterizada como antigênica (ASAI et al. 1992), e a sua atividade catalítica foi quase totalmente inibida

por anticorpos monoclonais (KIKUCHI et al. 2001). Recentemente, foi demonstrado que anticorpos monoclonais produzidos contra a NTPDase II de *T. gondii* inibiram a sua atividade catalítica e reduziram significativamente a infectividade de taquizoítas (TAN et al. 2010). Além disso, protocolo de imunização que incluíram um recombinante da NTPDase II de *T. gondii* promoveu respostas imune e celular, com proteção parcial de camundongos BALB/c contra o desafio com uma cepa virulenta de *T. gondii*, e esta molécula foi indicada como um candidato efetivo para o desenvolvimento de vacina contra toxoplasmose (TAN et al. 2011). Já foi também demonstrado que soro policlonal imune produzido contra a NTPDase de *T. cruzi* inibe significativamente a infectividade de tripomastigotas *in vitro* (SANTOS et al. 2009).

Anticorpos policlonais anti-apirase de batata (FARIA-PINTO et al. 2006) ou anticorpos policlonais de camundongo contra peptídeo sintético (r175-194) pertencente ao domínio B de ATPase 2 de *Schistosoma mansoni* (MENDES et al. 2011) não reconheceu NTPDases presentes em fígado de camundongos, o que é corroborado pela baixa identidade encontrada entre o domínio B de plantas ou parasitos e as NTPDases de mamíferos (FARIA-PINTO et al. 2008; MAIA et al. 2001). Esses dados reforçam que anticorpos produzidos contra o domínio B da apirase de batata e de NTPDases de parasitos não são indutores de resposta auto-imune.

Em conjunto, esses resultados sugerem uma aplicação potencial desses anticorpos para o estudo da estrutura e função da NTPDase de *L. (V.) braziliensis* e, também, da isoforma da NTPDase de outros parasitos que compartilham o domínio B. Nossa hipótese é que o recombinante r-potDomínio B, ou os peptídeos sintéticos LbB1LJ, potB1LJ, LbB2LJ e potB2LJ, ou modificações destas moléculas, podem induzir a produção de anticorpos inibitórios alterando a atividade catalítica da NTPDase 1 de formas promastigotas, uma resposta imune que poderá afetar a infectividade e/ou virulência dos parasitos desde os estágios iniciais da infecção. Portanto, estas novas moléculas poderão fazer parte de protocolos experimentais de vacina contra a leishmaniose.

A NTPDase 1 é também expressa em formas amastigotas intracelulares da *L. (V.) braziliensis*, uma informação que foi obtida por imunocitoquímica usando anticorpos anti-LbB1LJ ou anti-r-potDomínio B e análise por microscopia confocal de varredura a laser, com o auxílio adicional do DAPI, um marcador de DNA, que

identificou o núcleo e o cinetoplasto de amastigotas infectando macrófagos. A NTPDase 1 foi também visualizada em formas amastigotas livres recuperadas de células Vero infectadas com este parasito, por meio de imunocitoquímica usando anticorpos anti-LbB1LJ ou anti-LbB2LJ e análise por microscopia confocal de varredura a laser. Prova definitiva da expressão da NTPDase 1 de amastigotas foi obtida por meio da medida de atividade enzimática e, também, de “Western blots” de homogeneizado de amastigotas livres, nos quais a proteína foi reconhecida por anticorpos anti-LbB2LJ. Em amastigotas de *L. amazonensis* foi detectada uma atividade ecto-NTPDásica 14 vezes maior que a encontrada em promastigotas, e foi sugerido pelos autores que sua função está relacionada à aquisição de nutrientes pelo parasito e, também, à produção de adenosina, uma molécula que suprime a produção de superóxido e óxido nítrico, importantes para a eliminação de organismos patogênicos intracelulares (PINHEIRO et al. 2006). Portanto, a identificação de NTPDase 1 em amastigotas, mostradas pela primeira vez em *L. (V.) braziliensis*, é de relevância uma vez que a hipótese da NTPDase 1 ser um alvo de fármaco e a inibição de sua atividade catalítica ser parte do mecanismo de ação é dependente da expressão e funcionalidade desta proteína durante a proliferação intracelular de amastigotas na progressão da leishmaniose.

Motivados por estes resultados, os estudos dos efeitos de derivados dos ácidos alquilaminoalcanotiosulfúricos sobre a proliferação *in vitro* de promastigotas e amastigotas e atividade NTPDásica de *L. (V.) braziliensis* foram iniciados.

5.2 ATIVIDADE LEISHMANICIDA E INIBIÇÃO DA ATIVIDADE NTPDásica DE FORMAS PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE *L. (V.) braziliensis* PELOS ÁCIDOS ALQUILAMINOALCANOTIOSSULFÚRICOS (AAATs)

Os antimoniais indicados para o tratamento das leishmanioses, o Pentostan® e o Glucantime®, bem como aqueles de segunda escolha, a Anfotericina B® ou a Pentamidina®, são de alto custo e tóxicos (ZAULI- NASCIMENTO et al. 2010; SEIFERT, 2011), motivando o estudo do efeito leishmanicida de novos compostos.

Os ácidos alquilaminoalcanotiosulfúricos (AAATs) testados neste trabalho, o SIPA, SSEC, IBSS, NPSO, SXIP e TBSO (FIGURA II), não tiveram efeito citotóxico

sobre macrófagos *in vitro*, confirmando estudos prévios que já caracterizaram estes compostos como esquistossomicidas em experimentos *in vitro* e *in vivo* (PENIDO et al. 1990, 1994, 1995, 1999; 2008; MOREIRA et al. 2007). Como já reportado, estes AAATs não apresentam efeito tóxico em animais experimentais quando administrados 600 mg/kg por via oral durante 5 dias consecutivos (PENIDO et al. 1994; 1995; 1999; 2008). A análise cromatográfica e fluorográfica de extratos orgânicos do estômago, fígado e amostras de sangue de animais infectados com *S. mansoni* e tratados com o composto SSEC contendo o átomo de enxofre divalente radioativo (^{35}S) mostrou que a droga é extensivamente metabolizada ainda no estômago, onde pelo menos 16 metabólitos são formados. Um destes foi identificado como sendo o derivado dissulfeto do AAAT original, o composto 2,2'-ditiobis[N-(1-metilpropil)-1-octanamina] (FIGURA III) um metabólito ainda mais lipofílico do que o seu precursor (PENIDO et al. 1995; 2008).

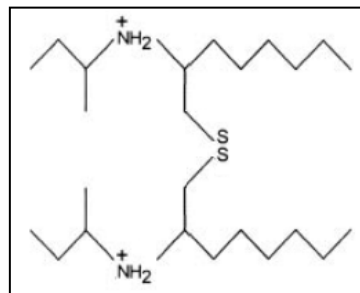


Figura III. 2,2'-Ditiobis-[N-(1-metilpropil)-1-octanamina] - derivado dissulfeto do SSEC.

A capacidade do SIPA, SSEC, IBSS, NPSO, SXIP ou TBSO inibir a redução de MTT pelos promastigotas ou amastigotas intracelulares de *L. (V.) braziliensis* foi testada visando acessar o seu potencial de atividade leishmanicida, pela primeira vez em Tripanosomatídeos. Os compostos SIPA e SSEC, que têm também elevada atividade esquistossomida (PENIDO et al. 1995; 2008) foram os que demonstraram menor Cl_{50} , de 24 μM a 33 μM , para ambas as formas do parasito. É curioso observar que o IBSS não teve atividade leishmanicida significativa sobre promastigotas, mas foi efetivo contra amastigotas, com Cl_{50} de 35 μM , um dado que fortalece a necessidade de triagem de novas drogas usando amastigotas

intracelulares. Os compostos NPSO, SXIP e TBSO foram os menos efetivos com CI_{50} variando de 54 a $>100 \mu\text{M}$.

É de relevância apontar que o SSEC, um efetivo esquistossomicida, foi usado em protocolos de tratamento da esquistossomose em dose única de 800 mg/kg, administrada por via oral, e atingiu alta concentração no soro de animais (200 $\mu\text{g/ml}$) em aproximadamente 3 horas, indicando rápida absorção. Seis horas após, a concentração elevada foi mantida, em torno de 170 $\mu\text{g/ml}$ ou 943 μM como o tiosulfato ou 472 μM como o dissulfeto, indicando baixa taxa de eliminação (PENIDO et al. 1995). Portanto, baseado no efeito leishmanicida *in vitro* dos compostos SIPA, SSEC e IBSS, com $CI_{50} < 50 \mu\text{M}$, e da baixa toxicidade *in vitro* e *in vivo*, é possível que sejam efetivos leishmanicidas *in vivo* quando usados em concentração na ordem de magnitude similar àquela usada para o tratamento da esquistossomose experimental (943 μM ; PENIDO et al. 1995). Estudos adicionais são necessários para determinar os efeitos *in vivo* dos AAATs na leishmaniose cutânea.

Os resultados sugerem certas características estruturais modulando a atividade leishmanicida por estas moléculas anfipáticas, resultantes de grupo substituinte alquil com 3 ou 4 carbonos combinado à um alceno de 6 ou 8 carbonos. O radical alquil substituinte do SIPA (isopropil), SSEC (metilpropil), IBSS (isobutil), NPSO (n-propil), SXIP (isopropil) ou TBSO (terc-butil) é uma cadeia de tamanho médio, com 3 ou 4 carbonos, que confere a molécula um caráter apolar. Este caráter apolar é aumentado com a adição de cadeia lateral hidrocarbonada, com 6 (SXIP) ou 8 (SIPA, SSEC, IBSS ou NPSO) átomos de carbono, e com menor efeito no TBSO, cuja cadeia lateral tem apenas 2 átomos de carbono (FIGURA II). A hidrofobicidade de compostos leishmanicidas é de relevância, considerando que deverão vencer barreiras como as membranas plasmáticas da célula do mamífero e do vacúolo parasitóforo, o plasmalema do amastigota e, em alguns casos, a membrana da organela que contém o alvo em questão. Como mostrado neste trabalho, a combinação do radical isopropil com a cadeia lateral de 8 carbonos no SIPA parece conferir um potencial leishmanicida significativamente maior para este composto, com $CI_{50(am)} 25 \mu\text{M}$, uma vez que o seu homólogo SXIP, com o mesmo radical alquil substituinte mas com cadeia lateral de 6 carbonos apresentou $CI_{50(am)} > 100 \mu\text{M}$. Aparentemente, a manutenção da cadeia lateral com 8 carbonos, e a substituição do radical n-propil do NPSO ($CI_{50(am)} 86 \mu\text{M}$) pelo radical isopropil do

SIPA ($CI_{50(am)}$ 25 μM), metilpropil do SSEC ($CI_{50(am)}$ 29 μM) ou isobutil do IBSS ($CI_{50(am)}$ 35 μM), foi suficiente para reduzir o IC_{50} destes 3 últimos compostos, sugerindo que pequenas modificações introduzidas nestes novos compostos leishmanicidas poderão elevar ainda mais o seu potencial contra amastigotas de *Leishmania*. Entre todos os AAATs, o NPSO e o IBSS foram os menos efetivos esquistossomicidas (PENIDO et al. 1990; 1994), sugerindo que a efetividade do IBSS como leishmanicida ($CI_{50(am)}$ 35 μM), como aqui demonstrada, está vinculada às diferentes formas biológicas de cada um dos parasitos, isto é, o verme adulto do *S. mansoni* é extracelular, enquanto as amastigotas são intracelulares.

É interessante observar que o TBSO, um derivado que tem como cadeia lateral apenas 2 átomos de carbonos ligados ao grupo tiosulfato e, portanto, menos lipofílicidade que os outros AAATs, não tem efeito leishmanicida significativo, com $CI_{50} > 100 \mu M$. A ausência de efetividade do TBSO, que também não está incluído entre os melhores esquistossomicidas e apenas reduz a oviposição (PENIDO et al., 1990), reforça mais uma vez a importância do caráter hidrofóbico, que é necessário para o composto atingir as formas amastigotas intracelulares.

A parte hidrofílica dos AAATs é representada pelo grupo amino que confere carga positiva ao composto, além da presença de um grupo tiosulfato, que pode fazer ligações dissulfeto com outras moléculas, por exemplo, a glutathione (PENIDO et al. 1995; 1999; 2007; 2008). O balanço entre hidrofobicidade e carga é requerido para a translocação de compostos através da membrana de parasitos (LUQUE-ORTEGA et al. 2010). Compostos com caráter hidrofóbico associado à presença de carga positiva têm sido mostrados como capazes de atravessar membranas biológicas, acumulando-se em organelas com um forte potencial eletroquímico, tal como a mitocôndria (LUQUE-ORTEGA et al. 2010). Trocas na polaridade da molécula, obtida com a simples incorporação de substituintes, ou mudanças em sua hidrofobicidade, prejudicam ou impedem a atividade leishmanicida (LUQUE-ORTEGA et al. 2010). A lipofilia dos AAATs, ou de seu possível metabólito dissulfeto, conferida pela cadeia carbônica, associada à carga positiva conferida pelo grupo amino, permite sugerir a interação destes compostos com a membrana, e a atividade letal observada pode envolver a translocação do composto, também atuando intracelularmente.

A NTPDase 1 tem ampla distribuição em promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, incluindo superfície de membrana plasmática e organelas subcelulares, e foi identificada em formas amastigotas intracelulares. Em adição, a expressão e a identidade de forma ativa de NTPDase 1 foram confirmadas em mitocôndria de promastigotas, como mostrado neste trabalho, e podemos supor que esta proteína é também expressa em mitocôndria de amastigotas, podendo ser ela um alvo a ser considerado nos estudos dos mecanismos leishmanicidas dos AAATs. Em células de mamíferos milhares de mitocôndrias podem ser detectadas representando cerca de 20% do volume total celular, enquanto em tripanosomatídeos há apenas uma organela, o que foi confirmado em todas as formas de desenvolvimento do *T. cruzi* por meio de reconstrução ultraestrutural 3D, uma observação que foi estendida a outros tripanosomatídeos patogênicos. O volume de toda a organela depende diretamente da disponibilidade de nutrientes, atingindo 12% do volume do protozoário. Como já abordado anteriormente, outra característica peculiar de tripanosomatídeos é a organização de DNA no cinetoplasto. Nestes protozoários, o genoma mitocondrial é constituído por uma rede complexa de anéis entrelaçados de DNA, representando aproximadamente 30% do total do genoma celular, e codifica vários genes dos complexos da cadeia respiratória, como a citocromo-oxidase, NADH desidrogenase e subunidades de ATP sintase. Devido às diferenças de volume e número de mitocôndrias entre mamíferos e tripanosomatídeos, esta organela é um excelente candidato para a intervenção de drogas e é alvo de numerosos estudos (PAULIN, 1975; NEWBERRY e PAULIN, 1989; SARAIVA et al. 1989; SHAPIRO e ENGLUND, 1995; SCHNEIDER, 2000; MODICA-NAPOLITANO et al. 2001; FIDALGO e GILLE, 2011; OSELLAME et al. 2012; MENNA-BARRETO e CASTRO, 2014). Iniciamos, então, os estudos do mecanismo de ação dos AAATs, e indícios de que afetam a função mitocondrial foram obtidos. Como mostrado, SIPA 30 μM reduziu significativamente 28% do potencial de membrana mitocondrial, podendo ser este um dos mecanismos pelo qual os AAATs são leishmanicidas. É possível, ainda, que a NTPDase 1 tem um papel fundamental na atividade mitocondrial de *Leishmania*, uma nova hipótese a ser explorada.

Como demonstrado neste trabalho, os AAATs foram inibidores parciais da atividade fosfohidrolítica presente no homogeneizado de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, com K_i variando de 1 a 1000 μM para as atividades ATPásica e

ADPásica, concentrações inferiores ou similares às aquelas alcançadas no soro de animais tratados com AAAT, como já citado (943 μM ; PENIDO et al. 1995).

A atividade fosfohidrolítica detectada no homogeneizado de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* pode ser em decorrência da NTPDase 1, aqui descrita, e da GDPase, esta última anotada no genoma, mas cujo isolamento e caracterização não foram ainda descritos. A contribuição de atividade fosfohidrolítica de cada uma delas pode ser diferente, resultando em variações nos níveis de inibição das atividades ADPásica e ATPásica, como as demonstradas neste trabalho. No entanto, é possível que estas enzimas possuam propriedades catalíticas e funcionais distintas, e o meio de reação favoreça predominantemente a NTPDase 1.

SIPA, o composto que mostrou ser um efetivo leishmanicida, com CI_{50} em torno de 25 μM para promastigotas ou amastigotas intracelulares, foi testado sobre amastigotas livres recuperadas de células Vero e, também, teve atividade leishmanicida, com CI_{50} 20 μM . Sobre a atividade fosfohidrolítica de homogeneizado de amastigotas livre, o SIPA promoveu redução da hidrólise de ATP e ADP, sugerindo um K_i em torno de 10 a 100 μM . Novamente, estes valores de concentração são inferiores àqueles encontrados após 6 horas no sangue de animais tratados com SSEC em dose única de 800 mg/kg, isto é, 943 μM como o tiosulfato ou 472 μM como o dissulfeto (PENIDO et al. 1995) e, portanto, capaz de inibir a atividade fosfohidrolítica de *L. (V.) braziliensis*.

Recentemente, foi relatado que a inibição da atividade ATP difosfohidrolásica do tegumento de verme adulto de *S. mansoni*, também presente nas outras formas do ciclo biológico deste parasito (VASCONCELOS et al. 1993; 1996; 1997; DE MARCO et al. 2003; FARIA-PINTO et al. 2004; LEVANO-GARCIA et al. 2007), pode ser parte do mecanismo de ação dos AAATs, os quais foram efetivos inibidores reversíveis desta proteína e, também, da apirase de batata (PENIDO et al. 2007), a proteína de planta que tem alta identidade com as NTPDases de parasitos (FARIA-PINTO et al. 2006; 2008; VASCONCELOS et al. 2009; MAIA et al. 2011).

O mecanismo pelo qual os AAATs inibem atividade ATP difosfohidrolásica de *S. mansoni* foi investigado (PENIDO et al. 2007). A mudança de pH do meio de reação padrão, de 7,4 para 6,5, não afetou a inibição observada pelos AAATs (PENIDO et al. 2007), o que pode ser interessante para o efeito leishmanicida dos AAATs levando em conta o pH ácido intracelular de macrófagos.

Aparentemente, além da importância da hidrofobicidade para a interação com membrana, foi constatado que estes compostos são capazes de formar ligação dissulfeto com a enzima, inibindo parcialmente sua atividade (PENIDO et al. 2007). É possível que resíduos de cisteína da NTPDase 1 de *L. (V.) braziliensis* estejam também envolvidos no mecanismo de ação dos AAATs, motivando novos estudos.

Como já relatado, a atividade NTPDásica de parasitos está associada à recuperação de purinas e/ou ao mecanismo de proteção contra o organismo hospedeiro em condições que envolvem ATP ou ADP, como a resposta imune e a ativação plaquetária. Além disso, está envolvida com a infectividade de Tripanosomatídeos em células de mamíferos. Nós mostramos que a NTPDase 1 está associada à superfície externa, e a organelas subcelulares, incluindo a mitocôndria dos promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e, também, está presente em formas amastigotas. O controle da atividade de NTPDases tem sido apontado para o tratamento de diversas doenças (GENDRON et al. 2002; MARCUS et al. 2003; MULLER et al. 2006; PENIDO et al. 2007). Temos a hipótese de que os AAATs alteram a atividade catalítica destas enzimas, e este poderia ser um dos mecanismos de ação destes compostos sem, contudo bloquear totalmente a atividade enzimática. Este modo de ação pode ser uma vantagem para o hospedeiro, desde que isoformas de NTPDases foram descritas em células de mamíferos (MARCUS et al. 2003). Os AAATs poderão ser explorados ainda como novas ferramentas de estudo de NTPDases.

6. PERSPECTIVAS

1. Identificação da NTPDase 1 em formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* contidas em lesão de orelha de camundongo BALB/c previamente infectados utilizando técnica de imunocitoquímica;
2. Avaliação da taxa de infecção de amastigotas de *L. (V.) braziliensis* em células VERO, por meio de contagens e coloração por Giemsa;
3. Efetuar medidas comparativas de atividade fosfolitolítica de preparações de promastigotas e amastigotas;
4. Avaliação do mecanismo de ação dos compostos AAATs em formas amastigotas intracelulares e livres, utilizando kits de detecção de espécie reativa de oxigênio (ROS) e de concentração de ATP intracelular;
5. Quantificar espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) em sobrenadante de cultura de células infectadas com *L. (V.) braziliensis* após tratamento com os compostos AAATs;
6. Imunização de camundongos BALB/c com as biomoléculas r-LiDomínioB, r-potDomínio B e GST e desafio com promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, seguido de avaliação de lesão, quantificação de parasitos de lesão, e quantificação de citocinas e anticorpos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One** **7(5)** e35671.

ANTINARELLI, L.M.R. 2013. **Atividade leishmanicida de derivados de quinolinas: 4-aminoquinolinas complexadas a esteróide e amodiaquina.** Dissertação Acadêmica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

ASAI, T.; MIZUNO, F.; KOJIMA, S.; TAKEUCHI, T.; KOBAYASHI, A.; SUZUKI, Y. 1992. High correlation in antibody titers between the Sabin-Feldman dye test and an enzyme-linked immunosorbent assay detecting immunoglobulin G antibodies to the nucleoside triphosphate hydrolase of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Microbiology**, **30(5)**: 1291-1293.

ANTONELLI, L.R.; DUTRA, W.O.; ALMEIDA, R.P.; BACELLAR, O.; GOLLOB, K.J. 2004. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clinical & Experimental Immunology**, **136**: 341–348.

AVILA-GARCÍA, M.; MANCILLA, J.; SEGURA-CERVANTES, E.; GALINDO-SEVILLA, N. 2014. Transmission to Humans. Leishmaniasis – Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment. Intech, chapter 2, p. 27-44.

BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.; RIBEIRO DE, J.A.; DUTRA, W.O.; GOLLOB, K.J.; CARVALHO, E.M. 2002. Up- regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity** **70**: 6734–6740.

BECK, Z.; KARASAVVAS, N.; TONG, J.; MATYAS, G.R.; RAO, M.; ALVING, C.R. 2007. Calcium modulation of monoclonal antibody binding to phosphatidylinositol phosphate. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **354**:747-51.

BOAVENTURA, V.S.; SANTOS, C.S.; CARDOSO, C.R.; DE ANDRADE, J.; DOS SANTOS, W.L. CLARÊNCIA, J.; SILVA, J.S.; BORGES, V.M.; BARRAL-NETO, M.; BRODSKYN, C.I., BARRAL, A. 2010. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. **European Journal Immunology**, **40**: 2830–2836.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. 2000. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological Review**, **173**: 17–26.

BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A. 2009. Evolutionary origins of the purinergic signaling system. **Acta Physiologica**, **195**: 415-447.

CARVALHO-CAMPOS, C. 2011. **Identificação de um domínio da NDPase de *Leishmania braziliensis* como um alvo para a resposta imune humoral humana através de análise de peptídeos sintéticos**. Dissertação Acadêmica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

COIMBRA, E.S.; GONÇALVES-DA-COSTA, S.C.; COSTA, B.L.; GIAROLA, N.L.; REZENDE-SOARES, F.A.; FESSEL, M.R.; FERREIRA, A.P.; SOUZA, C.S.; ABREU-SILVA, A.L.; VASCONCELOS, E.G. 2008. A *Leishmania (L.) amazonensis* ATP diphosphohydrolase isoform and potato apyrase share epitopes: antigenicity and correlation with disease progression. **Parasitology**, **135 (3)**: 327-35.

COIMBRA, E.S.; GONÇALVES-DA-COSTA, S.C.; CORTE-REAL, S.; DE FREITAS, F.G.; DURÃO, A.C.; SOUZA, C.S.; SILVA-SANTOS, M.I.; VASCONCELOS, E.G. 2002. Characterization and cytochemical localization of an ATP diphosphohydrolase from *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Parasitology**, **124 (Pt 2)**:137-43.

COSTA, T.L.; RIBEIRO-DIAS, F.; OLIVEIRA, M.A.P.; BEZERRA, J.C.B.; VINAUD, M.C. 2011. Energetic metabolism of axenic promastigotes of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Experimental Parasitology**, **128**: 438–443.

CUERVO, P.; DE JESUS, J.B.; SABÓIA-VAHIA, L.; MENDONÇA-LIMA, L.; DOMONT, G.B.; CUPOLILLO, E. 2009. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. **Journal of proteomics**, **73**: 79-92.

CUERVO, P.; SABOIA-VAHIA, L.; COSTA SILVA-FILHO, F.; FERNANDES, O.; CUPOLILLO, E.; DE JESUS, J.B. 2006. A zymographic study of metalloprotease activities in extracts and extracellular secretions of *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. **Parasitology**, **132**: 177–185.

DALTON, J.E.; KAYE, P.M. 2010. Immunomodulators: use in combined therapy against leishmaniasis. **Expert Review of Anti- Infective Therapy**, **8**: 739-742.

DAVID, C.V.; CRAFT, N. 2009. Cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis. **Dermatology Therapy**, **22(6)**: 491-502.

DE MARCO, R.; KOWALTOWSKI, A.T.; MORTARA, R.A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. 2003. Molecular characterization and immuno-localization of *Schistosoma mansoni* ATP-diphosphohydrolase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **307**: 831-838.

DE OLIVEIRA, C.I.; NASCIMENTO, I.P.; BARRAL, A.; SOTO, M.; BARRAL-NETTO, M. 2009. Challenges and perspectives in vaccination against leishmaniasis. **Parasitology International**, **58(4)**:319-24.

DE SOUZA, W. 2008. An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. **Current Pharmaceutical Design**, **14**: 822-838.

DE SOUZA, V.L.; VERAS, P.S.T.; WELBY-BORGES, M.; SILVA, T.M.C.; LEITE, B.R.; FERRARO, R.B.; MEYER-FERNANDES, J.R.; BARRAL, A.; COSTA, J.M.L.; FREITAS, L.A.R. 2011. Immune and inflammatory responses to *Leishmania amazonensis* isolated from different clinical forms of human leishmaniasis in CBA mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **106**: 23–31.

DE SOUZA, M.C.; DE ASSIS, E.A.; GOMES, R.S.; MARQUES- DA- SILVA, E.A.; MELO, M.N. FIETTO, J.L.; AFONSO, L.C. 2010. The influence of ecto-nucleotidases on *Leishmania amazonensis* infection and immune response in C57B/6 mice. **Acta Tropica**, **115**: 262–269.

DETONI, M.L.; FESSEL, M.R.; MAIA, A.C.R.G; PORCINO, G.N.; QUELLIS, L.R.; FARIA-PINTO, P.; MARQUES, M.J.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; DINIZ, V.A.; CÔRTE-REAL, S.; GONÇALVES-DA-COSTA, S.C.; SOUZA, C.S.; VASCONCELOS, E.G. 2013. An antigenic domain of the *Leishmania amazonensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is associated with disease progression in susceptible infected mice. **Parasitology Research**, **112(8)**: 2773-82.

FARIA, D.R.; GOLLOB, K.J.; BARBOSA, J. JR.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.R.; LESSA, H.; CARVALHO, L.P.; ROMANO-SILVA, M.A.; DE JESUS, A.R.; CARVALHO, E.M.; DUTRA, W.O. 2005. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. **Infection and Immunity**, **73**: 7853–7859.

FARIA-PINTO, P.; MONTESANO, M.A.; JACINTO, A.A.; SANTOS, R.S.; BORDIN, F.H.S.; FERREIRA, A.P.; PENIDO, M.L.O.; COELHO, P.M.Z.; VASCONCELOS, E.G. 2010a. Antibody reactivity against potato apyrase, a protein that shares epitopes with *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase isoforms, in acute and chronically infected mice, after chemotherapy and reinfection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **105 (4)**: 374-379.

FARIA-PINTO, P.; MENDES, R.G.P.R.; CARVALHO-CAMPOS, C.; MAIA, A.C.R.G.; OLIVEIRA, A.A.; COELHO, P.M.; VASCONCELOS, E.G. 2010b. Detection of IgG1 and IgG4 subtypes reactive against potato apyrase in schistosomiasis patients. 2010. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **105**: 370-373.

FARIA-PINTO, P.; REZENDE-SOARES, F.A.; MOLICA, A.M.; MONTESANO, M.A.; MARQUES, M.J.; ROCHA, M.O.; GOMES, J.A.; ENK, M.J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COELHO, P.M.; NETO, S.M.; FRANCO, O.L.; VASCONCELOS, E.G. 2008. Mapping of the conserved antigenic domains shared between potato apyrase and parasite ATP diphosphohydrolases: potential application in human parasitic diseases. **Parasitology**, **135 (8)**: 943-53.

FARIA-PINTO, P.; MEIRELLES, M.N.L.; LENZI, H.L.; MOTA, E.M.; PENIDO, M.L.O.; COELHO, P.M.Z.; VASCONCELOS, E.G. 2006. Cross-immunoreactivity between anti-potato apyrase antibodies and mammalian ATP diphosphohydrolases: potential use of the vegetal protein in experimental schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **101**: 359-363.

FARIA-PINTO, P.; MEIRELLES, M.N.L.; PENIDO, M.L.O.; LENZI, H.L.; COELHO, P.M.Z.; VASCONCELOS, E.G. 2004. ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni* egg: characterization of a new antigen. **Parasitology**, **129**: 51-57.

FIDALGO, L.M.; GILLE, L. 2011. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. **Pharmaceutical Research**, **28(11)**: 2758–2770.

GENDRON, F.P.; BENREZZAK, O.; KRUGH, B.W.; KONG, Q.; WEISMAN, G.A.; BEAUDOIN, A.R. 2002. Purine signaling and potential new therapeutic approach: possible outcomes of NTPDase inhibition. **Current Drug Targets**, **3**: 229-245.

GIUDICE, A.; CAMADA, I.; LEOPOLDO, P.T.; PEREIRA, J.M.; RILEY, L.W.; WILSON, M.E.; HO, J.L.; DE JESUS, A.R.; CARVALHO, E.M.; ALMEIDA, R.P. 2007. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BMC Infectious Diseases**, **7**: 7.

GONZÁLEZ, U.; PINART, M.; RENGINFO-PARDO, M.; MACAYA, A.; ALVAR, J.; TWEED, J.A. 2009. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, **2**: CD004834.

GUEVARA-FLORES, A.; OLVERA-SÁNCHEZ, S.; GÓMEZ-CONCHA, C.; JUÁRES, O.; ESPARZA-PERUSQUÍA, M.; PARDO, J.P.; MENDOZA-HERNÁNDEZ, G.; MARTÍNEZ, F.; FLORES-HERRERA O. 2008. 5'-p-Fluorosulfonyl benzoyl adenosine inhibits an ecto-ATP-diphosphohydrolase in the tegument surface of *Taenia crassiceps cysticerci*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **162 (2)**: 123-33.

HANDA, M.; GUIDOTTI, G. 1996. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). **Biochemistry Biophysical Research Communications**, **218 (3)**: 916-23.

HASKO, G.; CSOKA, B.; NEMETH, Z.H.; VIZI, E.S.; PACHER, P. 2009. A (2B) adenosine receptors in immunity and inflammation. **Trends in Immunology**, **30**: 263–270.

HIDE, M.; RITLENG A.S.; BRIZARD, J.P.; MONTE-ALLEGRE, A.; SERENO, D. 2008. *Leishmania infantum*: tuning digitonin fractionation for comparative proteomic of the mitochondrial protein content. **Parasitology Research**, **103(4)**: 989-92.

LA SALA, A.; FERRARI, D.; DI VIRGILIO, F.; IDZKO, M.; NORGAUER, J.; GIROLOMONI, G. 2003. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. **Journal of Leukocyte Biology**, **73**: 339–343.

KETTLUN, A.M.; ESPINOSA, V.; GARCIA, L.; VALENZUELA, M.A. 2005. Potato tuber isoapyrases: substrate specificity, affinity labeling, and proteolytic susceptibility. **Phytochemistry**, **66**: 975-982.

KIKUCHI, T.; FURUTA, T.; KOJIMA, S. 2001. Membrane localization and demonstration of isoforms of nucleoside triphosphate hydrolase from *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, **122**: 15-23.

KNOWLES, A.F. 2011. The GDA1_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. **Purinergic Signalling**, **7**: 21-45.

KORKMAZ, B.; ATTUCCI, S.; JULIANO, M. A.; KALUPOV, T.; JOURDAN, M. L.; JULIANO, L.; GAUTHIER, F. 2008. Measuring elastase, proteinase 3 and cathepsin G activities at the surface of human neutrophils with fluorescence resonance energy transfer substrates. **Nature Protocols**, **3**: 991-1000.

LEITE, P.M.; GOMES, R.S.; FIGUEIREDO, A.B.; SERAFIM, T.D.; TAFURI, W.L.; DE SOUZA, C.C.; MOURA, S.A.; FIETTO, J.L.; MELO M.N.; RIBEIRO-DIAS, F.; OLIVEIRA, M.A.; RABELLO, A.; AFONSO, L.C. 2012. Ecto-nucleotidase activities of promastigotes from *Leishmania (Viannia) braziliensis* relates to parasite infectivity and disease clinical outcome. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, **6(10)**: e1850.

LEVANO-GARCIA, J.; MORTARA, R.A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DEMARCO, R. 2007. Characterization of *Schistosoma mansoni* ATPDase2 gene, a novel apyrase family member. **Biochemistry Biophysical Research Communications**, **352 (2)**: 384-389.

LIEW, F.Y.; PARKINSON, C.; MILLOTT, S.; SEVERN, A.; CARRIER, M. 1990. Tumour necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. **Immunology** **69**: 570-573.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.; 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Biology Chemistry**, **193**: 265-275.

LUQUE-ORTEGA JR, REUTHER P, RIVAS L, DARDONVILLE C. 2010. New benzophenone-derived bisphosphonium salts as leishmanicidal leads targeting mitochondria through inhibition of respiratory complex II. **Journal of Medicinal Chemistry**, **53(4)**: 1788-98.

MAIA, A.C.; PORCINO, GN.; DETONI, M.L.; EMÍDIO, N.B.; MARCONATO, D.G.; FARIA-PINTO, P.; FESSEL, M.R.; REIS, A.B.; JULIANO, L.; JULIANO, M.A.; MARQUES, M.J.; VASCONCELOS, E.G. 2013. An antigenic domain within a catalytically active *Leishmania infantum* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is a target of inhibitory antibodies. **Parasitology International**, **62(1)**: 44-52.

MAIA, A.C.R.G.; DETONI, M.L.; PORCINO, G.N.; SOARES, T.V.; GUSMÃO, M.A.N.; FESSEL, M.R.; MARQUES, M.J.; SOUZA, M.A.; COELHO, P.M.Z.; ESTANISLAU, J.A.S.; ROCHA, M.O.C.; SANTOS, M.O.; FARIA-PINTO, P.; VASCONCELOS, E.G. 2011. Occurrence of a conserved domain in ATP diphosphohydrolases from pathogenic organisms associated to antigenicity in human parasitic diseases. **Developmental and Comparative Immunology**, **35**: 1057-1065.

MARCUS, A.J.; BROEKMAN, M.J.; DROSOPOULOS, J.H.; ISLAM, N.; PINSKY, D.J.; SESTI, C.; LEVI, R. 2003. Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ecto-nucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **305(1)**: 9-16.

MARETTI-MIRA, A.C.; DE PINHO RODRIGUES, K.M.; DE OLIVEIRA-NETO, M.P.; PIRMEZ, C.; CRAFT, N. 2011. MMP-9 activity is induced by *Leishmania braziliensis* infection and correlates with mucosal leishmaniasis. **Acta Tropica**, **119**: 160–164.

MARIOTINI-MOURA, C.; BASTOS, M.S.; CASTRO, F.F.; TRINDADE, M.L.; VASCONCELLOS, R.S.; NEVES-DO-VALLE, M.A.A.; MOREIRA, B.P.; SANTOS, R.F.; OLIVEIRA, C.M.; CUNHA, L.C.S.; SOUTO, X.M.; BRESSAN, G.C.; SILVA-JÚNIOR, A.; BAQUI, M.M.A.; BAHIA, M.T.; ALMEIDA, M.R.; MEYER-FERNANDES, J.R.; FIETTO, J.L.R. 2014. *Trypanosoma cruzi* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1(TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion. **Acta Tropica** **130**: 140–147.

MARQUES, M.J.; VOLPINI, A.C.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; MACHADO-PINTO, J.; DA COSTA, C.A.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; ROMANHA A.J. 2006. Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis diagnosis of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, **54**: 37-43.

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

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

MATOS, D.C.S.; FACCIOLI, L.A.P.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; DE LUCA, P.M.; CORTE-REAL, S.; ARMÔA, G.R.G.; LEMES, B.E.M.; DECOTE-RICARDO, D.; MENDONÇA, S.C.F. 2010. Kinetoplastid membrane protein-11 is present in promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis* and its surface expression increases during metacyclogenesis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **105 (3)**: 341-347.

MAYRINK, W.; BOTELHO, A. C. C.; MAGALHÃES, P. A.; BATISTA, S. M.; LIMA, A. O.; GENARO, O.; COSTA, C. A.; MELO, M. N.; MICHALIKC, M. S. M.; WILLIAMS, P.; DIAS, M.; CAIAFFA, W. T.; NASCIMENTO, E. AND MACHADO-COELHO, L. L. 2006. Immunotherapy, immunochemotherapy, and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **39**: 14-21.

MENDES, R.G.P.R.; GUSMÃO, M.A.N.; MAIA, A.C.R.G.; DETONI, M.L.; PORCINO, G.N.; SOARES, T.V.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L.; FARIA-PINTO, P.; VASCONCELOS, E.G . 2011. Immunostimulatory property of a synthetic peptide belonging to the soluble ATP diphosphohydrolase isoform (SmATPDase 2) of *Schistosoma mansoni* and immunolocalization of this protein in egg. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **106 (7)**: 808-13.

MENNA-BARRETO, R.F.S.; CASTRO, S.L. 2014. The Double-Edged Sword in Pathogenic Trypanosomatids: The Pivotal Role of Mitochondria in Oxidative Stress and Bioenergetics. **BioMed Research International**, **2014**: 1-14.

MEYER-FERNANDES, J.R.; COSENTINO-GOMES, D.; VIEIRA, D.P.; LOPES, A.H. 2010. Ecto- nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities in trypanosomatids: Possible roles in infection, virulence and purine recycling. **The Open Parasitology Journal** **4**: 116–119.

Ministério da Saúde. Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana 2a. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2007.

MODICA-NAPOLITANO, J.S.; APRILLE, J.R. 2001. Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells. **Advanced Drug Delivery Reviews**, **49(1-2)**: 63-70.

MOREIRA, L.S.; PILO-VELOSO, D.; DE MELLO, R.T.; COELHO, P.M.Z.; NELSON, D.L. 2007. A study of the activity of 2-(alkylamino)-1-ethanethiosulfuric acids against infection by *Schistosoma mansoni* in a murine model. **Transactions of the Royal Society of the Tropical Medicine and Hygiene**, **101**: 385-390.

MORIZOT, G.; DELGIUDICE, P.; CAUMES, E. LAFFITTE, E.; MARTY, P.; DUPUY, A. SARFATI, C.; HADJ-RABIA, S.; DARIE, H.; LE GUERN, A.S.; SALAH, A.B.; PRATLONG, F.; DEDET, J.P.; GRÖGL, M.; BUFFET, P.A. 2007. Healing of Old World cutaneous leishmaniasis in travelers treated with fluconazole: drug effect or spontaneous evolution? **The American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, **76**: 48 –52.

MOSSER, D.M.; BRITTINGHAM, A. 1997. Leishmania, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. **Parasitology** **115 Suppl**: S9–23.

MOSSMAN. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, **65**: 55- 63.

MÜLLER, C.E.; IQBAL, J.; BAQI, Y.; ZIMMERMANN, H.; RÖLLICH, A.; STEPHAN, H. 2006. Polyoxometalates--a new class of potent ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter**, **16(23)**: 5943-7.

NEWBERRY, L. B.; PAULIN, J. J. 1989. Reconstruction of the chondriome of the amastigote from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Parasitology**, **75(4)**: 649–652.

OPPERDOES, F.R.; MICHELS, P.A.M. 2008. The Metabolic Repertoire of *Leishmania* and Implications for Drug Discovery in *Leishmania*: After The Genome. Ed. Myler PJ and Fasel cap. 7. Caister Academic Press Switzerland.

OPPERDOES, F.R.; COOMBS, G.H. 2007. Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. **Trends in Parasitology**, **23 (4)**: 149-58.

OLIVEIRA M.A.; RABELLO, A.; AFONSO, L.C. 2012. Ecto-Nucleotidase Activities of Promastigotes from *Leishmania (Viannia) braziliensis* relates to parasite infectivity and disease clinical outcome. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, **6(10)**: e1850.

OSELLAME, L. D.; BLACKER, T. S.; DUCHEN, M. R. 2012. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, **26(6)**: 711–723.

PALATNIK-DE-SOUSA. 2008. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. **Vaccine**, **26**: 1709-1724.

PALETTA-SILVA, R.; MEYER-FERNANDES, J.R. 2012. Adenosine and immune imbalance in visceral leishmaniasis: the possible role of ectonucleotidases. **Journal of Tropical Medicine**, 650874.

PANIZ MONDOLFI, A.E.; DUFFEY, G.B.; HORTON, L.E.; TIRADO, M.; REYES JAIMES, O.; PEREZ-ALVAREZ, A.; ZERPA, O. 2013. Intermediate/borderline disseminated cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, **52**: 446–55.

PAULIN, J. J. 1975. The chondriome of selected trypanosomatids. A three-dimensional study based on serial thick sections and high voltage electronmicroscopy. **Journal of Cell Biology**, **66(2)**: 404–413.

PEACOCK, C.S.; SEEGER, K.; HARRIS, D.; MURPHY, L.; RUIZ, J.C.; QUAIL, M.A.; PETERS, N.; ADLEM, E.; TIVEY, A.; ASLETT, M.; KERHORNOU, A.; IVENS, A.; FRASER, A.; RAJANDREAM, M-A.; CARVER, T.; NORBERTCZAK, H.; CHILLINGWORTH, T.; HANCE, Z.; JAGELS, K.; MOULE, S.; ORMOND, D.; RUTTER, S.; SQUARES, R.; WHITEHEAD, S.; RABBINOWITSCH, E.; ARROWSMITH, C.; WHITE, B.; THURSTON, S.; BRINGAUD, F.; BALDAUF, S.L.; FAULCONBRIDGE, A.; JEFFARES, D.; DEPLEDGE, D.P.; OYOLA, S.O.; HILLEY, J.D.; BRITO, L.O.; TOSI, L.R.O.; BARRELL, B.; CRUZ, A.K.; MOTTRAM, J.C.; SMITH, D.F.; BERRIMAN, M. 2007. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**, **39**, 839-847.

PENIDO, M.L.O.; COELHO, P.M.Z.; MELLO, R.T.; PILÓ-VELOSO, D.; OLIVEIRA, M.C.; KUSEL, J.R.; NELSON, D.L. 2008. Antischistosomal activity of aminoalkanethiols, aminoalkanethiosulfuric acids and the corresponding disulfides. **Acta Tropica**, **108**: 249-255.

PENIDO, M. L.; RESENDE, D. M.; VIANELLO, M. A.; BORDIN, F. H. S.; JACINTO, A. A.; DIAS, W. D.; MONTESANO, M. A.; NELSON, D. L.; COELHO, P. M. Z.; VASCONCELOS, E.G. 2007. A new series of schistosomicide drugs, the alkylaminoalkanethiosulfuric acids, partially inhibit the activity of *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. **European Journal of Pharmacology**, **570**, 10-17.

PENIDO, M.L.O.; COELHO, P.M.Z.; NELSON, D.L. 1999. Efficacy of a new schistosomicidal agent 2-[(1-methylpropyl) amino]-1- octanethiosulphuric acid against an oxamniquine resistant *Schistosoma mansoni* isolate. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **94**: 811-813.

PENIDO, M.L.O.; NELSON, D.L.; VIEIRA, L.Q.; WATSON, D.G.; KUSEL, J.R. 1995. Metabolism by *Schistosoma mansoni* of a new schistosomicide: 2-[(1-methylpropyl) amino]-1-octanethiosulphuric acid. **Parasitology**, **111**: 177-185.

PENIDO, M.L.O.; NELSON, D.L.; VIEIRA, L.Q.; COELHO, P.M.Z. 1994. Schistosomicidal activity of alkylamino-octanethiosulfuric acids. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **89(4)**: 595-602.

PENIDO, M.L.O.; PILO-VELOSO, D.; NELSON, D.L. 1990. Synthesis of potential schistosomicides: new 2-(alkylamino)-1-octanethiosulphuric acids. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, **1**: 35-39.

PINHEIRO, C.M.; MARTINS-DUARTE, E.S.; FERRARO, R.B.; FONSECA DE SOUZA, A.L.; GOMES, M.T.; LOPES, A.H.; VANNIER-SANTOS, M.A.; SANTOS, A.L.; MEYER-FERNANDES, J.R. 2006. *Leishmania amazonensis*: Biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. **Experimental Parasitology**, **114 (1)**: 16-25.

PIRMEZ, C. 1992. Immunopathology of American cutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **87** Suppl 5: 105–109.

PORCINO, G.N. 2012. **Localização ultraestrutural da nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1 (NTPDase) antigênica de *Leishmania (Viannia) braziliensis***. Dissertação Acadêmica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais

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

RAMASAWMY, R.; MENEZES, E.; MAGALHAES, A.; OLIVEIRA, J.; CASTELLUCCI, L.; ALMEIDA, R.; ROSE, M.E.; GUIMARÃES, L.H.; LESSA, M.; NORONHA, E.; WILSON, M.E.; JAMIESON, S.E.; KALIL, J.; BLACKWELL, J.M.; CARVALHO, E.M.; DE JESUS, A.R. 2010. The 22518 bp promoter polymorphism at CCL2/MCP1 influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, **10**: 607–613.

RANGEL, H.; DAGGER, F.; HERNANDEZ, A. LIENDO, A.; URBINA, J.A. 1996. Naturally azole-resistant *Leishmania braziliensis* promastigotes are rendered susceptible in the presence of terbinafine: comparative study with azole-susceptible *Leishmania mexicana* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **40**: 2785–91.

RANGEL, E.F.; LAINSON, R. 2009. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **104(7)**: 937-954.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. 2007. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, **7 (9)**: 581-96.

REZENDE-SOARES, F.A.; CARVALHO-CAMPOS, C.; MARQUES, M.J.; PORCINO, G.N.; GIAROLA, N.L.; COSTA, B.L.; TAUNAY-RODRIGUES, A.; FARIA-PINTO, P.; SOUZA, M.A.; DINIZ, V.A.; CORTE-REAL, S.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; VASCONCELOS, E.G. 2010. Cytochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes and identification of an antigenic and catalytically active isoform. **Parasitology**, **137 (5)**: 773-83.

ROQUELINE, A.G.M.F.; AVERSI-FERREIRA; GALVÃO, J.D.; DA SILVA, S.F.; CAVALCANTE, G.F.; DA SILVA, E.D.; BHATIA-DEY, N.; AVERSI-FERREIRA, T.A. 2014. Geographical and Environmental Variables of Leishmaniasis Transmission—Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment. Intech, chapter 5, p.105-24.

RÜCKERT, C.; STUEPP CDOS, S. GOTTARDI, B.; ROSA, J.; CISILOTTO, J.; BORGES, F.P.; ROSEMBERG, D. B.; BOGO, M.R.; TASCA, T.; DE CARLI, G.A.; BONAN, C.D. 2010. *Trichomonas vaginalis*: dehydroepiandrosterone sulfate and 17-beta-estradiol alter NTPDase activity and gene expression. **Experimental Parasitology**, **125(3)**:187-95.

SANSON, F.M. 2012. The role of the NTPDase enzyme family in parasites: what do we know, and where to from here?. **Parasitology**, **139(8)**:963-80.

SANTOS, R.F.; PÔSSA, M.A.; BASTOS, M.S.; GUEDES, P.M.; ALMEIDA, M.R.; DEMARCO, R.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; BAHIA, M.T.; FIETTO, J.L. 2009a. Influence of Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, **3 (3)**: e387

SARAIVA, E.M.; VANNIER-SANTOS, M.A.; SILVA-FILHO, F.C.; DE SOUZA, W. 1989. Anionic site behavior in *Leishmania* and its role in the parasite-macrophage interaction. **Jornal of Cell Science**, **93 (Pt 3)**: 481-9.

SCHNEDL, J.; AUER, H.; FISCHER, M.; TOMASO, H.; PUSTELNIK, T.; MOOSEDER, G. 2007. Cutaneous leishmaniasis—an import from Belize. **Wien Klin Wochenschr**, **119**: 102–5.

SCHNEIDER, A. 2001. Unique aspects of mitochondrial biogenesis in trypanosomatids. **International Journal for Parasitology**, **31(13)**: 1403–1415.

SEIFERT, K. 2011. Structures, targets and recent approaches in anti-leishmanial drug discovery and development. **Open Medicinal Chemistry Journal**, **5**:31-9.

SILVERMAN, J.M.; CLOS, J.; OLIVEIRA, C.C.; SHIRVANI, O.; FANG, Y.; WANG, C.; FOSTER, L.J.; REINER, N.E. 2010. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. **Journal Cell Sci**, **123**: 842-852.

SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. 1995. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annual Review of Microbiology**, **49**: 117–143.

SOUZA, M.C.; ASSIS, E. A.; GOMES, R.S.; MARQUES-DA-SILVA, E.A.; MELO, M.N.; FIETTO, J.L.; AFONSO, L.C. 2010. The influence of ecto-nucleotidases on *Leishmania amazonensis* infection and immune response in C57B/6 mice. **Acta Tropica**, **115(3)**:262-9.

SOUZA, V.L.; VERAS, P.S.; WELBY-BORGES, M.; SILVA, T.M.; LEITE, B.R. FERRARO, R.B.; MEYER-FERNANDES, JR.; BARRAL, A.; COSTA, J.M.; DE FREITAS, L.A. 2011. Immune and inflammatory responses to *Leishmania amazonensis* isolated from different clinical forms of human leishmaniasis in CBA mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **106**: 23–31.

TAN, F.; HU, X.; LUO, F.J.; PAN, C.W.; CHEN, X.G. 2011. Induction of protective Th1 immune responses in mice by vaccination with recombinant *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase-II. **Vaccine**, **29**: 2742–2748.

TAN, T.G.; MUI, E.; CONG, H.; WITOLA, W.H.; MONTPETIT, A.; MUENCH, S.P.; SIDNEY, J.; ALEXANDER, J.; SETTE, A.; GRIGG, M.E.; MAEWAL, A.; MCLEOD, R. 2010. Identification of *T. gondii* epitopes, adjuvants, and host genetic factors that influence protection of mice and humans. **Vaccine**, **28 (23)**: 3977-89.

TAUSSKY, H.M.; SHORR, E. 1953. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. **Journal Biology Chemistry**, **202**: 675–685.

TOLEDO, J.S.; JUNIOR, P.E.S.; MANFRIM, V.; PINZAN, C.F.; ARAÚJO, A.S.; CRUZ, A.K.; EMERY, F.S. 2013. Synthesis, Cytotoxicity and In Vitro Antileishmanial Activity of Naphthothiazoles. **Chemical Biology & Drug Design**, **81(6)**: 749–756.

TUON, F.F.; AMATO, V.S.; GRAF, M.E.; SIQUEIRA, M.A.; NICODEMO, A.C.; AMATO NETO, V. 2008. Treatment of new world cutaneous leishmaniasis – a systematic review with a meta-analysis. **International Journal of Dermatology**, **47**: 109-124.

VASCONCELOS, E.G.; FARIA-PINTO, P.; REZENDE-SOARES, F.A.; PENIDO, M.L.O.; COSTA, S.C.G.; COELHO, P.M.Z. 2009. Potato Apyrase: A New Tool for Parasitic Disease Research Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology 3 (Special Issue 1), **Global Science Books**.

VASCONCELOS, E.G.; TORRES, C.R.; MARTINS, S.M.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; FERREIRA, S.T. 1997. The ATP diphosphohydrolase of *Schistosoma mansoni*: ecto-localization and possible roles in host-parasite. In: PLESNER, L.; KIRLEY, T.L.; KNOWLES, A.F. (Org.). Ecto-ATPases- Recent Progress on Structure and Function- pág. 221-226. 1 ed. New York: **Plenum Publishing Corporation**, **1**: 221-226.

VASCONCELOS, E.G.; FERREIRA, S.T.; CARVALHO, T.M.; SOUZA, W.; KETTLUN, A.M.; MANCILLA, M.; VALENZUELA, M.A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. 1996. Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. Immunological cross-reactivities with potato apyrase and *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. **Journal Biology Chemistry**, **271 (36)**: 22139-22145.

VASCONCELOS, E.G.; NASCIMENTO, P.S.; MEIRELLES, M.N.L.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; FERREIRA, S.T. 1993. Characterization and localization of an ATP-diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **58**: 205-214.

VENDRAME, C.M.; SOUZA, L.D.; CARVALHO, M.D.; SALGADO, K.; CARVALHO, E.M. GOTO, H. 2010. Insulin-like growth factor-I induced and constitutive arginase activity differs among isolates of *Leishmania* derived from patients with diverse clinical forms of *Leishmania braziliensis* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **104**: 566– 568.

WESTERMEIER R, NAVEN T. Proteomics in Practice. WILEY-VCH, Weinheim (2002).

WHO – World Health Organization. Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010 (WHO Technical Report Series, n° 949). Geneva: WHO Press; 2010.

YE, J.H.; RAJENDRAN, V.M. 2009. Adenosine: an immune modulator of inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastroenterology**, **15**: 4491–4498.

ZAULI-NASCIMENTO, R.C.; MIGUEL, D.C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J.K.; PEREIRA, L.I.; PELLI DE OLIVEIRA, M.A.; RIBEIRO-DIAS, F.; DORTA, M.L.; ULIANA, S.R. 2010. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. **Tropical Medicine and International Health**, **15(1)**:68-76

ZHOU, F.; HAMER, D.H.; HENDRICKSON, W.A.; SATTENTAU, Q.J.; KWONG, P.D. 2005. Interfacial metal and antibody recognition. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, **102**: 14575-14580.