

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

Ana Carolina Ribeiro Gomes Maia

**ESTUDO DA NUCLEOSÍDEO TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASE
(NTPDase 1) DE *Leishmania infantum* E EXPRESSÃO DE UMA NOVA
PROTEÍNA RECOMBINANTE VISANDO O CONTROLE DE
PARASITÓSES DE INTERESSE VETERINÁRIO**

Juiz de Fora

2015

Ana Carolina Ribeiro Gomes Maia

**ESTUDO DA NUCLEOSÍDEO TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASE
(NTPDase 1) DE *Leishmania infantum* E EXPRESSÃO DE UMA NOVA
PROTEÍNA RECOMBINANTE VISANDO O CONTROLE DE
PARASITOSSES DE INTERESSE VETERINÁRIO**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de
Doutora em Ciências Biológicas na área de
concentração Genética e Biotecnologia.

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

Juiz de Fora

2015

**ESTUDO DA NUCLEOSÍDEO TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASE (NTPDase 1) DE
Leishmania infantum E EXPRESSÃO DE UMA NOVA PROTEÍNA RECOMBINANTE
VISANDO O CONTROLE DE PARASITOSSES DE INTERESSE VETERINÁRIO**

ANA CAROLINA RIBEIRO GOMES MAIA

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

Aprovada em: ____/____/____.

Banca examinadora:

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

Prof^o. Dr^o. Marcos José Marques - UNIFAL
(Membro Externo)

Prof^o. Dr^o. Otacílio da Cruz Moreira – FIOCRUZ/RJ
(Membro Externo)

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

Prof^o. Dr^o. Adolfo Firmino da Silva Neto - UFJF
(Membro interno)

Dedico esta conquista a Deus acima de tudo, pela minha saúde, paciência, perseverança, por me conduzir nesse caminho e me dá forças todos os dias. Por me dar essa conquista e colocar na minha vida pessoas que favoreceram essa vitória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a:

Minha mãe pela dedicação, por suportar momentos difíceis na vida a fim de lutar para me dar um futuro melhor e por me ensinar que devemos conquistar as coisas em nossa vida de forma honesta e por merecimento.

Meu marido Walfrido pelo apoio e meu filho Samuel que apesar de pequeno já ajudou muito nessa conquista. Mamãe te ama muito e essa conquista é para te dar um futuro melhor.

Meu pai e minha irmã que, apesar de já terem deixado essa vida, fizeram muito para eu estar aqui.

A Eveline por sua amizade, carinho, atenção, pelo tempo dedicado, pelos ensinamentos científicos e pessoais que levarei por minha vida toda. Pelo apoio acima de preconceitos, burocracias e tentativas de impedir nosso progresso. Pela confiança em mim e por ser sempre verdadeira e sincera. Por ficar feliz, apoiar e torcer pelo meu sucesso.

A Gabriane, uma amiga e companheira do laboratório em todos os momentos de alegrias e dificuldades.

Ao Dr. Marcos José Marques (UNIFAL-MG) e ao Dr. Alexandre Barbosa Reis (UNIFOP-MG), que gentilmente doaram amostras do parasito e soros de cães com leishmaniose.

À Dra. Melissa R. Fessel (LNBio Campinas/SP), que foi fundamental na obtenção da molécula recombinante r-GST-LiDomínio B apresentada na Tese.

À Dra. Elaine Soares Coimbra (UFJF-MG) e sua aluna Luciana Maria Ribeiro Antinarelli pelo apoio em muitos experimentos.

Aos técnicos do Departamento de Bioquímica ICB/UFJF, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta tese.

A todos os colaboradores externos Ms. Hugo V. Fajardo (GH LabsDiagnósticos Veterinários), Dr. Luiz Juliano (UNIFESP), Dra. Suzana Corte Real (FIOCRUZ-RJ).

Às fomentadoras FAPEMIG e CNPQ e ao programa de bolsas de incentivo a qualificação dos técnicos administrativos da UFJF (PROQUALI).

Agradeço a todos os amigos, companheiros e colaboradores que participaram desta importante etapa da minha vida!

RESUMO

A NTPDase 1 (50 kDa) de promastigotas de *Leishmania infantum* foi purificada por eletroforese em gel não-desnaturante. A identidade desta proteína ou de seu domínio B conservado (r83-122) foi confirmada por "Western blots" utilizando soros imunes produzidos contra a apirase de batata (SA), r-potDomínioB (SB), um polipeptídeo recombinante derivado do domínio B desta proteína vegetal, e LbB1LJ (SC; r82-103) e LbB2LJ (SD; r102-121), peptídeos sintéticos derivados do domínio B da NTPDase 1 de *L. braziliensis*. Sua antigenicidade foi evidenciada em "Western blots" pela reatividade com soros de cães com leishmaniose visceral. Os soros imunes SC ou SD inibiram sua atividade (87-99%) em preparação de promastigotas, sugerindo um efeito direto sobre o domínio B. Por ELISA, 45-50% de 38 cães infectados foram soropositivos para LbB1LJ e LbB2LJ confirmando a antigenicidade deste domínio.

Palavras Chave: *Leishmania infantum*; ATP difosfohidrolase; NTPDase; domínio B conservado; leishmaniose visceral; vacina.

ABSTRACT

The NTPDase 1 (50 kDa) of *Leishmania infantum* promastigotes was purified by non-denaturing gel electrophoresis. The identity of this protein or of its conserved domain B (r83-122) was confirmed by Western blots using immune sera raised against potato apyrase (SA); r-potDomainB (SB), a recombinant polypeptide derived from the B domain of this vegetable protein, and LbB1LJ (SC; r82-103) and LbB2LJ (SD; r102-121), synthetic peptides derived from the B domain of the *L. braziliensis* NTPDase 1. Its antigenicity was evidenced in Western blots by the reactivity with serum samples from dogs with visceral leishmaniasis. The immune sera SC and SD inhibited its activity (87-99%) in promastigotes preparation, suggesting a direct effect on the B domain. By ELISA, 45-50% of 38 infected dogs were seropositive for LbB1LJ and LbB2LJ confirming the antigenicity of this domain.

Key words: *Leishmania infantum*; ATP diphosphohydrolase; NTPDase; conserved B domain; visceral leishmaniasis; vaccine.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	
1.1	Doenças infecciosas parasitárias e sua importância	20
1.2	Antigenicidade das NTPDases de parasitos, do Domínio B e de seus peptídeos derivados	22
1.2.1	Modelo <i>Leishmania</i>	30
1.3	Glutathiona-S-transferases uma ferramenta biotecnológica	36
2	OBJETIVOS	
2.1	Objetivos gerais	42
2.2	Objetivos específicos	42
3	MATERIAL E MÉTODOS	
3.1	Purificação de NTPDase 1 de <i>Leishmania infantum</i> e determinação de sua antigenicidade e susceptibilidade a anticorpos inibidores	44
3.1.1	Obtenção da preparação de promastigotas de <i>L. infantum</i> , apirase de batata, r-pot-Domínio B, peptídeos sintéticos e soros imunes	44
3.1.2	Seleção de soros de cães	45
3.1.3	Purificação da NTPDase 1 de <i>L. infantum</i> por eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante e identificação por "Western blots"	46
3.1.4	Determinação da atividade fosfohidrolítica da NTPDase 1 pura de <i>L. infantum</i>	47
3.1.5	Quantificação de anticorpos por ELISA	47
3.1.6	Efeitos de soros imune policlonais sobre a atividade fosfohidrolítica de preparação de promastigotas de <i>L. infantum</i>	48
3.1.7	Análise bioinformática	49
4	RESULTADOS	
4.1	Purificação de NTPDase 1 de <i>Leishmania infantum</i> e determinação de sua antigenicidade e susceptibilidade a anticorpos inibidores	67
4.1.1	Análise de bioinformática	67
4.1.2	Purificação da NTPDase 1 de <i>L. infantum</i> por eletroforese em gel não-desnaturante	68
4.1.3	Determinação da antigenicidade da NTPDase 1 de <i>L. infantum</i> por "Western blots"	74
4.1.4	Determinação da antigenicidade do Domínio B da NTPDase 1 de <i>L. infantum</i> por ELISA, usando a reatividade de anticorpos IgG de soros de cães com leishmaniose visceral e os peptídeos sintéticos LbB1LJ e LbB2LJ	75
4.1.5	Inibição da atividade NTPDásica na preparação de promastigotas de <i>L. infantum</i> pelos soros policlonais anti-peptídeos	77
5	DISCUSSÃO	

- 5.1 Purificação de NTPDase 1 de *L. infantum*, determinação de sua antigenicidade e susceptibilidade a anticorpos inibidores
- 5.2 Imunolocalização da NTPDase 1 de promastigotas de *Leishmania infantum* e a possível função imunomoduladora de seu domínio B antigênico

6 CONCLUSÕES

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FIGURAS SUPLEMENTARES

ANEXOS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estruturas tridimensionais dos peptídeos sintéticos LbB1LJ e LbB2LJ ..	68
Figura 2	Purificação da NTPDase 1 de <i>L. infantum</i> por gel não-desnaturante	70
Figura 3	Identificação da NTPDase 1 de <i>L. infantum</i> extraída de banda ativa de gel não-desnaturante	71
Figura 4	Atividade ATPásica e ADPásica da NTPDase 1 de <i>L. infantum</i> incluída em pedaço de gel analisada por teste em tubos	73
Figura 5	Western blots de NTPdase pura com soro de cão com leishmaniose visceral	74
Figura 6	Reatividade de IgG de cães com os peptídeos LbB1LJ e LbB2LJ	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Inibição da atividade NTPDásica de preparações de promastigotas homogeneizadas em C12E9 por soros anti-peptídeos	76
----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

®	Marca registrada
°C	Grau Celsius
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mA	Miliampere
m/v	massa/volume
nm	Nanômetro
µg	Micrograma
µl	Microlitro
AAATs	Ácidos alquilaminoalcanotiosulfúricos
ACRs	Apyrase Conserved Regions
ADP	Adenosina Difosfato
AMP	Adenosina Monofosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
CC ₅₀	Concentração do composto que reduziu 50% da viabilidade dos macrófagos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Ótica
DP	Desvio Padrão
ELISA	“enzyme-linked immunosorbent assay” (teste imunoenzimático)
GST	Glutathione S-Transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IC ₅₀	Concentração do composto que inibiu 50% do crescimento parasitário
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgG1	Imunoglobulina da subclasse G1
IgG2a	Imunoglobulina da subclasse G2a

IgG2	Imunoglobulina da subclasse G2
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
kDa	Kilodalton
LPG	Lipofosfoglicano
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 for Biotechnology Information”
NDPase	Nucleosídeo difosfato hidrolase
NTPase	Nucleosídeo trifosfato hidrolase
NTPDase	Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	dihidrocloreto de o-fenilenodiamina
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
Pi	Fosfato inorgânico
Rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS- PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
TDR1	Redutase dependente de tiol
Th	“T helper”(célula T auxiliar)
Th1	“T helper” 1 (célula T auxiliar do tipo 1)
Th2	“T helper” 2 (célula T auxiliar do tipo 2)
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano

FIGURAS SUPLEMENTARES

S1 - TABELA DE CLASSIFICAÇÃO DE ORGANISMOS PATOGÊNICOS DE IMPORTÂNCIA EM MEDICINA VETERINÁRIA.

S2 - TABELA DE VACINAS E POTENCIAIS ANTÍGENOS VACINAIS CONTRA PATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA EM MEDICINA VETERINÁRIA.

LISTA DE ANEXOS

A- Carta da Comissão de Ética autorizando o trabalho com soro de cães com leishmaniose visceral.

B. Mendes, R.G.P.R.; Gusmão, M.A.N.G.; **Maia, A.C.R.G.**; Detoni, M.L.; Porcino, G.N.; Soares, T.V.; Juliano, M.A.; Juliano, L.J.; Coelho, P.M.; 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) and immunolocalization of this protein in the *Schistosoma mansoni* egg. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **106**:808-813.

C. 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**:293-299.

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.J.; Diniz, V.A.; Corte-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**:2773-2782.

E. Maia, A.C.R.G.; Porcino, G.N.; Detoni, M.L.; Emidio, N.B.; Marconato, D.G.; Faria-Pinto, P.; Fessel, M.R.; Reis, A.B.; Juliano, L.J.; 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**:44-52.

F. Azarias, C.N.; **Maia, A. C. R. G.** 2014. Importância das zoonoses em Juiz de Fora e o papel do enfermeiro. Revista Acadêmica FACSUM, Juiz de Fora-MG, p.19.

G. Vasconcelos, E.G.; **Maia, A.C.R.G.**; Fessel, M.R.; Marques, M.J.; Faria-Pinto, P.; Detoni, M.L.; Porcino, G.N.; Quellis, L.R. UFJF. Antígeno vacinal para uso em medicina veterinária. BR n. PI 1020140320156, 2014 Dez 19.

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS INFECCIOSAS PARASITÁRIAS E SUA IMPORTÂNCIA

Cerca de 75% das novas doenças infecciosas humanas emergentes são zoonóticas, sendo favorecidas pelo aumento da interdependência entre o homem e o animal. O aumento da incidência de zoonoses tem sido registrado em todo o mundo e desde 1984 foi adotado um conceito oficial por organizações internacionais denominado “One Health” (“Uma saúde”), o qual relaciona a interação entre o homem, o animal e o meio ambiente, visando enfrentar os desafios globais de saúde que envolvem a prevenção e o controle. Desde então, numerosos estudos foram realizados e novas propostas têm sido implementadas (BIDAISEE e MACPHERSON, 2014). Entre as parasitoses emergentes no Brasil é de relevância a malária, uma doença infecciosa causada por protozoário do gênero *Plasmodium* e transmitida por mosquito do gênero *Anopheles*; a dengue, uma infecção viral transmitida pelo *Aedes aegypti*; a leishmaniose visceral, causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e transmitida pelo inseto do gênero *Lutzomyia*, e a febre maculosa causada por uma bactéria do gênero *Rickettsia* e transmitida pelo carrapato do gênero *Amblyomma* (CARVALHO et al., 2009). Algumas dessas doenças estão entre as negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde, sendo necessárias mais pesquisas para o desenvolvimento de vacinas e formas eficazes de tratamento.

Além da *L. infantum* que será abordada nesta Tese, os cães estão envolvidos na transmissão de outros parasitos, bactérias, fungos e vírus. As parasitoses em cães estão entre as principais causas de transtornos, os quais podem ser acometidos por cerca de 17 espécies de trematódeos, 17 cestódeos, 20 nematódeos e numerosos protozoários. Entre as principais espécies de parasitos de cães responsáveis por zoonoses no Brasil, cujos registros mostram alta prevalência, estão os nematódeos *Ancylostoma* spp. e *Toxocara canis*; entre os cestódeos destacam-se o *Dipylidium caninum*, e diferentes espécies de *Taenia* e *Echinococcus*. Entre os protozoários, destacam-se flagelados como *Giardia duodenalis*, e coccídeos, como *Isospora*, *Hammondia*, *Cryptosporidium*,

Sarcocystis e *Neospora* (EGUIA-AGUILAR et al., 2005; KATAGIRI e OLIVEIRA-SERQUEIRA, 2007; FUNADA et al., 2007). É também de relevância os carrapatos, responsáveis por anemia e severa dermatite nos animais, além de serem vetores de múltiplos patógenos (CARDOSO et al., 2011; CUNHA et al., 2013; MERINO et al., 2013; DOMINGOS et al., 2013).

Em Juiz de Fora, atenção especial tem sido dada aos cães como possíveis hospedeiros de inúmeros patógenos. Foram realizados levantamentos de agentes patogênicos e ectoparasitos em amostras de cães de rua, área rural e doméstica na cidade, e os autores reportaram elevada incidência do protozoário *Babesia canis* e da bactéria *Ehrlichia canis*, causadores de babesiose e erlichiose em humanos e, entre os ectoparasitos, do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, um transmissor dessas doenças (RODRIGUES et al., 2002; 2008; SOARES et al., 2006). Estudos em carrapatos de cães e cavalos na cidade evidenciaram significativa incidência de *Rickettsia rickettsii*, advertindo para o risco de febre maculosa causada por esta bactéria (PACHECO et al., 2011). O primeiro inventário sobre a fauna de flebotomíneos em área urbana de Juiz de Fora foi recentemente divulgado, e nenhuma das espécies do gênero *Lutzomyia* identificadas é considerada de importância epidemiológica na transmissão de leishmaniose (PINHEIRO et al., 2014). Estes trabalhos retratam a presença de zoonoses na cidade de Juiz de Fora e a necessidade crescente de novos levantamentos e pesquisas que contribuam para o controle de doenças. Numerosos outros organismos patogênicos afetam o homem e os animais no Brasil e no mundo, e suas características individuais e epidemiológicas e/ou as doenças causadas por eles, bem como os trabalhos visando a identificação de moléculas vacinais foram revisados e são mostrados nas Figuras Suplementares (S1-S2).

Várias estratégias têm sido traçadas para obtenção de componentes imunogênicos que induzam uma resposta imune profilática e/ou terapêutica, sendo freqüente a seleção de antígenos protéicos de microrganismos para inclusão em vacinas recombinantes, direcionando com maior precisão a resposta imune desejada. Os organismos patogênicos de diferentes gêneros e espécies têm co-evoluído com os respectivos hospedeiros por centenas de anos usando moléculas de mesma via metabólica como mecanismos de defesa, virulência e patogenicidade por meio de

mimetização molecular e/ou manipulação do sistema imune. É de relevância encontrar aquelas que são antigênicas e compartilhadas, conhecidas como “comunidade antigênica”, responsáveis por imunoreatividades cruzadas e que são alvos em potencial para o desenvolvimento de drogas, formulação imunoterapêutica ou vacinas de amplo espectro para uso em saúde humana e veterinária (REQUENA, ALONSO e SOTO, 2000; LOSADA et al., 2005; DUNNE e COOKE, 2005; HALDAR et al., 2006; McMANUS e DALTON, 2006; BURNSTOCK e VERKHRATSKY, 2009; BOUKLI et al., 2011; HIGON et al., 2011).

Em Maia (2010), foi realizado um amplo estudo sobre as nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases) de organismos patogênicos distintos, entre eles, bactérias, protozoários, fungos, parasitos e artrópodes, incluindo o alinhamento de sequências de aminoácidos, análise filogenética e predição de peptídeos antigênicos. Naquele trabalho foi demonstrada uma relação evolucionária e estreita analogia estrutural entre um domínio particular da apirase de batata, denominado B, e outras NTPDases pertencentes a essa família, particularmente aquelas do trematódeo *Schistosoma mansoni* e dos tripanosomatídeos *Leishmania*, usados como modelos em nosso laboratório, justificando a ampliação e os avanços mostrados nesta Tese.

1.2 ANTIGENICIDADE DAS NTPDases DE PARASITOS, DO DOMÍNIO B E DE SEUS PEPTÍDEOS DERIVADOS

As nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases; EC 3.6.1.5) são enzimas que hidrolisam nucleosídeos di- e trifosfatados aos seus correspondentes mononucleotídeos quando ativadas por cátions bivalentes, especialmente cálcio e magnésio, sendo insensíveis aos inibidores clássicos de ATPases dos tipos P, V e F. As NTPDases estão amplamente distribuídas entre diversos organismos, tais como plantas, insetos, mamíferos e fungos, e foram recentemente reunidas na superfamília de proteínas GDA-1_CD39 (ZIMMERMANN, 2000; KNOWLES, 2011). A primeira descrição desta família é recente, e surgiu do isolamento do cDNA de uma isoforma de apirase de *Solanum tuberosum* de fonte comercial (HANDA e GUIDOTTI, 1996) e do sequenciamento de aminoácidos da região N-terminal da apirase de batata *S. tuberosum*

var. *Desirée* (VASCONCELOS et al., 1996), seguidos do alinhamento com outras seis sequências de proteínas já depositadas no banco de dados do NCBI. Deste alinhamento, foram evidenciados cinco domínios, os quais foram nomeadas "regiões conservadas das apirases" ou ACRs, caracterizando uma nova família de proteínas (HANDA e GUIDOTTI, 1996; VASCONCELOS et al., 1996).

Nestes últimos anos, um progresso significativo foi obtido em estudos estruturais e catalíticos destas enzimas, sendo que a nomenclatura ainda hoje apresenta variação: (A) apirase, em plantas; (B) ATP difosfohidrolase (ATPDase), nucleosídeo trifosfatase (NTPase) ou NTPDase em parasitos e (C) NTPDase em mamíferos (KNOWLES, 2011; SANSOM, 2012). Sansom, em revisão recente, reforçou o uso de NTPDase seguido de número arábico conforme a ordem de descoberta, uma proposta previamente realizada por Zimmermann em 2000, para designar e padronizar a nomenclatura das proteínas desta família (ZIMMERMANN, 2000; SANSOM, 2012).

Em parasitos, as NTPDases já foram descritas em *Toxoplasma gondii* (ASAI et al., 1992), *Schistosoma mansoni* (VASCONCELOS et al., 1993), *Trichomonas vaginalis* (DE AGUIAR MATOS et al., 2001; DE JESUS et al., 2002; TASCA et al., 2004), *Entamoeba histolytica* (BARROS et al., 2000), *Leishmania amazonensis* (COIMBRA et al., 2002), *Trypanosoma cruzi* (FIETTO et al., 2004; SANTOS et al., 2009; MARIOTINI-MOURA et al., 2014), *Taenia crassiceps cysticerci* (GUEVARA-FLORES et al., 2008) e *L. braziliensis* (REZENDE-SOARES et al., 2010), e a função tem sido associada à virulência, recuperação de purinas e/ou evasão ao sistema imune do hospedeiro. Essas proteínas têm sido também anotadas nos genomas de outros parasitos e atribuído a elas várias funções.

A recuperação de purinas em tripanossomatídeos é caracterizada pela ação combinada entre as NTPDases que hidrolisam nucleosídeos di- e trifosfatados em monofosfatados, e as 5'-nucleotidases que hidrolisam nucleosídeos monofosfatados em nucleosídeos correspondentes, sendo esses transportados para dentro dos parasitos através de receptores específicos, e é essencial para a síntese de nucleotídeos dos parasitos (LEITE et al., 2012).

Essas enzimas apresentam um papel importante no estabelecimento das infecções, sendo responsáveis pela desativação de resposta imune pró-inflamatória

protetora ao hospedeiro causada pela presença de nucleotídeos extracelulares di- e trifosfatados. As respostas podem ser de agregação plaquetária (ADP) ou produção de citocinas e quimiocinas (ATP) ou efeitos diretos citolíticos sobre os invasores, sendo sua atividade catalítica responsável pelo mecanismo de evasão do parasito ao sistema imune do hospedeiro (KNOWLES, 2011).

A atividade catalítica ecto-ATPásica dessas enzimas tem sido explorada, e observou-se que é distinta em diferentes espécies de *Leishmania*, sendo maior em cepas consideradas virulentas e, quando inibida, relacionada a uma menor adesão celular. Esses resultados estão sendo associados a virulência e infectividade do parasito, a progressão da doença e a modulação da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro. Em diferentes cepas de *T. cruzi* os níveis de mRNA expressos nas formas epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas e as atividades ecto-ATPásica e ADPásica são maiores nas cepas consideradas mais virulentas (MARQUES-DA-SILVA et al., 2008; SOUZA et al., 2010; LEITE et al., 2012; VASCONCELLOS et al., 2014; SILVA-GOMES et al., 2014).

Numerosos pesquisadores têm focado sua atenção na atividade NTPDásica, enquanto as propriedades antigênicas de NTPDases de parasitos têm sido somente relatadas em *T. gondii* (ASAI et al., 1992; NAKAJIMA-NAKANO et al., 2000; KIKUCHI et al. 2001; TAN et al., 2010; 2011), *S. mansoni* (FARIA-PINTO et al., 2004; 2008; 2010a; 2010b; MAIA et al., 2011), *L. amazonensis* (COIMBRA et al., 2008; DETONI et al., 2013) e *L. braziliensis* (FARIA-PINTO et al., 2008; REZENDE-SOARES et al., 2010; MAIA et al., 2011).

As isoformas mais extensivamente estudadas são aquelas de *T. gondii*, cuja antigenicidade e propostas de uso em métodos diagnósticos foram primeiramente descritas em 1992 (ASAI et al., 1992). Desde então, numerosos estudos relacionados a estas proteínas já foram efetuados e as mesmas foram exploradas como vacinas contra a toxoplasmose. Como demonstrado, a pré-imunização de camundongos BALB/c com uma forma recombinante da NTPase II induz resposta imune celular, com produção de $IFN\gamma$, e humoral, com produção de IgG2a, protegendo parcialmente contra cepas virulentas do parasito, indicando que essa proteína é um candidato efetivo para o desenvolvimento de uma vacina contra a toxoplasmose (TAN et al., 2010; 2011).

Em *S. mansoni*, causador da esquistossomose mansoni, foram identificadas duas isoformas, chamadas ATPDase 1 e ATPDase 2, sendo a primeira ligada à membrana, e a segunda, solúvel e ativamente secretada pelo parasito como demonstrado em cercária, esquistossômulo, verme adulto e ovo do parasito (VASCONCELOS et al., 1993; 1996; 1997; TORRES et al., 1998; DE MARCO et al., 2003; FARIA-PINTO et al., 2004; PENIDO et al., 2007; LEVANO-GARCIA et al., 2007). Evidências da antigenicidade das isoformas nativas de NTPDases isoladas de ovos de *S. mansoni* foram obtidas pela imunoreatividade destas proteínas com os soros de camundongos experimentalmente infectados (FARIA-PINTO et al., 2004).

No gênero *Leishmania*, a primeira demonstração de uma isoforma de NTPDase ativa foi realizada por Coimbra et al. (2002). Esta isoforma foi localizada por citoquímica ultraestrutural na superfície externa da membrana de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, um dos agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar no Brasil, e sua atividade catalítica foi associada aos processos de aquisição de purinas (COIMBRA et al., 2002). A ecto-localização em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foi posteriormente confirmada por imunocitoquímica e, adicionalmente, os autores demonstraram sua atividade catalítica aumentada nas formas amastigotas deste parasito (PINHEIRO et al., 2006). Uma isoforma de NTPDase antigênica foi também identificada em *L. (V.) braziliensis*, outro agente etiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil, e localizada por microscopia ultraestrutural citoquímica na membrana externa, flagelo e cinetoplasto desse parasito (REZENDE-SOARES et al., 2010).

Foi também demonstrado que as isoformas de NTPDases isoladas do tegumento de vermes adultos de *S. mansoni* ou do homogeneizado total de ovos (VASCONCELOS et al., 1996; FARIA-PINTO et al., 2004) e aquelas isoladas de *L. (L.) amazonensis* (COIMBRA et al., 2008) ou de *L. (V.) braziliensis* (REZENDE-SOARES et al., 2010) possuem imunoreatividade cruzada com anticorpos policlonais anti-apirase de batata, produzidos em coelhos ou camundongos. Em ensaios de ELISA usando a apirase de batata como antígeno e os soros de pacientes com esquistossomose ou de camundongos infectados com *S. mansoni* (FARIA-PINTO et al., 2004; 2008; 2010a,b), camundongos infectados com *L. amazonensis* (COIMBRA et al., 2008) ou de pacientes com leishmaniose tegumentar (REZENDE-SOARES et al., 2010) foi encontrada

significativa imunoreatividade cruzada, confirmando a presença de epitopos antigênicos compartilhados entre estas proteínas.

Análises de bioinformática foram realizadas a fim de estabelecer uma relação filogenética entre as NTPDases cujas sequências primárias já estavam anotadas nos bancos de dados do NCBI. Alta identidade foi encontrada entre as sequências de apirase de batata, SmATPDase 2 de *S. mansoni* e de proteínas hipotéticas encontradas nos genomas de *S. japonicum*, *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*, um estudo que permitiu a identificação de outros domínios compartilhados entre estas proteínas além daqueles já descritos como característicos (ACRs) da família das NTPDases. As estruturas tridimensionais das isoformas de *S. mansoni* e *L. braziliensis* foram também preditas, revelando alta similaridade e regiões expostas e disponíveis para a ligação com anticorpos (FARIA-PINTO et al., 2008). Em contrapartida, tecidos granulomatosos de fígado de camundongos infectados com *S. mansoni*, um sítio rico em células inflamatórias, ou parênquima hepático e epitélio vascular, todos eles ricos em NTPDases (ROBSON et al., 2006) não apresentam imunoreatividade cruzada com os anticorpos anti-apirase de batata (FARIA-PINTO et al., 2006), o que reforçou a alta identidade e similaridade entre as NTPDases de plantas e parasitos, maiores do que aquelas encontradas com as isoformas de mamíferos (FARIA-PINTO et al., 2008).

Estes estudos experimentais e *in silico* corroboraram a imunoreatividade cruzada entre a apirase de batata e as NTPDases de *S. mansoni* e *L. amazonensis* que já havia sido previamente descrita (VASCONCELOS et al., 1996; FARIA-PINTO et al., 2004; 2006; COIMBRA et al., 2008), e deram suporte à caracterização da NTPDase 1 de *L. braziliensis*, trabalho no qual os anticorpos anti-apirase de batata foram usados como estratégia para o isolamento desta proteína do parasito (REZENDE-SOARES et al., 2010). A apirase de batata e os anticorpos produzidos contra ela foram apresentados como ferramentas biológicas auxiliares na identificação de epitopos antigênicos conservados e da interação dos mesmos com o sistema imune do hospedeiro (VASCONCELOS et al., 2009).

Um domínio em particular, de 40 aminoácidos e denominado “B”, foi identificado nas isoformas de apirase de batata e de outras plantas e caracterizado como conservado

e compartilhado com isoformas de NTPDases de vários organismos patogênicos distintos, entre eles parasitos, fungos e insetos hematófagos (MAIA et al., 2011). O alinhamento do domínio B da apirase de batata com a sua contraparte nas NTPDases de *S. mansoni*, *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis* revelou alta identidade (55-50%) e similaridade (57-60%) entre eles, motivando o início dos estudos relacionados ao seu potencial antigênico em esquistossomose e leishmanioses (MAIA et al., 2011).

Um polipeptídeo recombinante – r-potDomínio B - derivado da associação entre o domínio B da apirase de batata (r78-117; número de acesso NCBI U58597.1) e uma cauda de hexa-histidina ligada ao seu N-terminal foi obtido por expressão heteróloga em *Escherichia coli* (MAIA, 2010; MAIA et al., 2011). Como demonstrado, o polipeptídeo r-potDomínio B tem propriedade imunoestimulatória ativando resposta imune humoral em camundongos BALB/c saudáveis, aumentando a produção dos subtipos IgG1 e IgG2a, e sugerindo o potencial desse domínio de induzir um perfil de secreção de citocinas dos tipos Th1 e Th2 associadas a resistência e/ou imunomodulação, respectivamente, em modelos experimentais de doenças parasitárias (MAIA et al., 2011). Os anticorpos policlonais anti-potDomínio B foram capazes de inibir as atividades fosfolíticas (22-72%) e imunoprecipitar os complexos proteína A-anticorpo-antígeno (42-91%) de preparações de verme adulto de *S. mansoni* e de promastigotas de *L. braziliensis*. “Western blots” dos complexos imunoprecipitados utilizando os anticorpos anti-potDomínio B identificaram bandas de peso molecular similar àqueles preditos para essas proteínas (MAIA et al., 2011).

O r-potDomínio B também foi utilizado como antígeno em ensaios de ELISA e os anticorpos de soros de pacientes com esquistossomose ou leishmaniose tiveram reatividade significativa (40% de soropositividade) com este recombinante, sugerindo fortemente que para o sistema imune humano o domínio B conservado da SmATPDase 2 (r156-195; NCBI DQ868522) ou NTPDase 1 de *L. braziliensis* (r83-122; NCBI CAM42020), de alta identidade com o domínio B da apirase de batata, é rico em epitopos para células B (MAIA, 2010; MAIA et al., 2011). Estes resultados, associados a novas análises *in silico*, permitiram sugerir que os domínios B da ATPDase 2 de *S. mansoni* e da NTPDase 1 de *L. braziliensis*, e possivelmente de outros organismos patogênicos, foram conservados durante a co-evolução do parasito e hospedeiro e estão

potencialmente envolvidas na imunomodulação de resposta imune. Além disso, o r-potDomínio B mostrou-se uma ferramenta em potencial para estudo do mesmo domínio de NTPDases de diversos organismos (MAIA et al., 2011).

Peptídeos específicos derivados do domínio B das NTPDases de *S. mansoni* e *L. braziliensis* foram sintetizados e seu potencial imunológico foi avaliado. O peptídeo SmB2LJ (r175-194) obtido do domínio B conservado da ATPDase 2 de *S. mansoni* foi inoculado em camundongos BALB/c e induziu a produção de altos níveis de IgG1 e IgG2a, confirmando o potencial imunoestimulatório. Em “Western blots” de preparações do verme adulto e do ovo de *S. mansoni* os anticorpos anti-SmB2LJ revelaram 2 bandas de 63 e 55 kDa, aparentemente as formas integral e proteolizada da ATPDase 2, respectivamente. Por microscopia confocal de imunofluorescência o soro anti-SmB2LJ foi capaz de reconhecer a ATPDase2 na superfície externa do miracídio, no envelope de Lichtenberg e na superfície externa do ovo, confirmando a expressão da ATPDase 2, que é solúvel e secretada, em vermes adultos e ovos de *S. mansoni* (MENDES et al., 2011). Adicionalmente, foi observado que estes anticorpos não reconhecem as NTPDases de mamíferos (MENDES et al., 2011), confirmando os dados obtidos previamente quando foram usados anticorpos anti-apirase de batata (FARIA-PINTO et al., 2006), o que é também corroborado pela menor identidade encontrada entre os domínios B de proteínas de parasitos e mamíferos (FARIA-PINTO et al., 2008; MAIA et al., 2011).

Anticorpos policlonais produzidos contra os peptídeos sintéticos LbB1LJ (r82–103) e LbB2LJ (r102–121) derivados do domínio B da NTPDase 1 de *L. braziliensis* foram utilizados em ensaios de imunoprecipitação, e eles foram capazes de depletar cerca de 40% da atividade fosfolitolítica da preparação do parasito, revelando por “Western blots” do imunoprecipitado uma banda de 48 kDa. Em ensaios de inibição, as atividades ATPásica e ADPásica foram efetivamente reduzidas pelos anticorpos anti-LbB1LJ (43-79%) e anti-LbB2LJ (18-47%). A NTPDase 1 de promastigotas de *L. braziliensis* foi identificada por imunocitoquímica ultraestrutural na superfície do parasito, em vesículas citoplasmáticas, cinetoplasto, núcleo, bolsa flagelar e flagelo, demonstrando que esta proteína tem ampla distribuição em promastigotas. Os anticorpos anti-LbB1LJ (67%) e anti-LbB2LJ (33%) foram citotóxicos e reduziram significativamente o crescimento de

promastigotas *in vitro*. O conjunto de resultados obtidos apontam que a NTPDase 1 de *L. braziliensis* pode ser um importante alvo para o desenho de inibidores, e que os peptídeos sintéticos poderiam ser testados em protocolos de proteção (PORCINO et al., 2012).

As biomoléculas r-potDomínio B, LbB1LJ e LbB2LJ foram também utilizadas como ferramentas moleculares para estudos da NTPDase 1 de *L. amazonensis*. Os anticorpos anti-r-potDomínio B, anti-LbB1LJ e anti-LbB2LJ foram capazes de reconhecer uma banda de 63 kDa em frações subcelulares de promastigotas desse parasito, revelando possíveis modificações pós-traducionais na forma nativa de 48 kDa, também reconhecida por estes anticorpos. Por imunocitoquímica e microscopia eletrônica, esses anticorpos identificaram a NTPDase 1 na membrana plasmática, cinetoplasto, núcleo e bolsa flagelar. Adicionalmente, uma significativa reatividade de IgG2a foi encontrada nos estágios iniciais da infecção de camundongos com *L. amazonensis* (40 dias), enquanto os níveis de IgG1 alcançaram os maiores níveis no estágio mais grave da doença, aos 120 dias. Estes resultados confirmaram a antigenicidade do domínio B da NTPDase 1 de *L. amazonensis*, e sugeriram seu potencial imunomodulatório durante a progressão da doença, apontando ainda estas biomoléculas para a composição de protocolos experimentais de imunoterapia e vacinação em leishmanioses (DETONI et al., 2013).

Recentemente, utilizando protocolo de infecção experimental de camundongos Suíços com *L. amazonensis*, a pré-imunização com r-potDomínio B promoveu proteção parcial contra a progressão da leishmaniose como observado aos 60 e 90 dias de infecção por meio da redução do edema de patas e, também, análises histopatológicas que evidenciaram resposta imune celular, com a elevação concomitante dos níveis de IgG2a e IFN- γ (DETONI, 2015).

O domínio B das NTPDases, altamente conservado, possivelmente desempenha uma função reguladora de atividade enzimática e, também, imunomoduladora durante a progressão das doenças. Os resultados obtidos por Detoni (2015) corroboram as hipóteses previamente publicadas (COIMBRA et al., 2002; 2008; FARIA-PINTO et al., 2004; 2006, 2008; VASCONCELOS et al., 2009; REZENDE-SOARES et al., 2010; MAIA, 2010; MENDES et al., 2011; MAIA et al., 2011; 2013; PORCINO et al., 2012; DETONI et al., 2013) e estimulam o aproveitamento biotecnológico do r-potDomínio B ou derivados

desta biomolécula, em formulações e em protocolos experimentais de imunoterapia e/ou vacinação contra leishmanioses, ou outras parasitoses que apresentem esse domínio conservado.

1.2.1 Modelo *Leishmania*

Leishmania spp. (Kinetoplastida: *Trypanosomatidae*) são protozoários parasitos causadores da leishmaniose, uma doença tropical mundial negligenciada. Ao menos 20 espécies de *Leishmania* são conhecidas por causarem diferentes formas clínicas de leishmaniose, sendo as espécies *L. donovani* e *L. infantum* (sinonímia *L. chagasi*) pertencentes ao complexo *Leishmania donovani* as responsáveis pela leishmaniose visceral (LV), uma protozoonose que representa um grande risco a saúde pública (MORENO e ALVAR, 2002; KEDZIERSKI et al., 2006; McCALL et al., 2013).

Leishmania spp. são transmitidos a hospedeiros mamíferos por hospedeiros invertebrados infectados apresentando um ciclo de vida dimórfico em que os parasitos habitam como formas promastigotas extracelulares o vetor invertebrado e como formas amastigotas intracelulares os macrófagos de mamíferos. Esses parasitos são transmitidos por insetos fêmeas do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo (Europa, Ásia e África) e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Américas). No Brasil, a espécie mais conhecida como vetor é a *Lutzomyia longipalpis*, um inseto da família dos flebotomíneos, conhecido popularmente como mosquito-palha, birigui ou tatuquiras, sendo muito pequeno (1,8 mm) e com hábitos crepusculares e noturnos se reproduzindo em locais ricos de matéria orgânica em decomposição (BARBIÉRI, 2006; SMITH et al., 2007; SARIDOMICHELAKIS, 2009; SCHIMMING e PINTO e SILVA, 2012).

Durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, o flebotomíneo ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania* sp., as quais sofrem diferenciação em formas paramastigotas que colonizam o esôfago e a faringe do vetor onde permanecem aderidas. Diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas, as formas infectantes, as quais são inoculadas na corrente sanguínea de um novo hospedeiro vertebrado. As formas metacíclicas na epiderme do hospedeiro são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos

diferenciam-se em formas amastigotas que replicam-se por divisão binária. Os macrófagos rompem-se liberando essas formas que são fagocitadas por novos macrófagos em um processo contínuo. Ocorre uma disseminação hematogênica e linfática para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, baço, fígado e medula óssea (SCHIMMING, PINTO e SILVA, 2012; McCALL et al., 2013).

A LV é endêmica em 98 países com aproximadamente 400.000 casos a cada ano na Europa, América do Sul, África e Ásia. Mais de 60% de casos humanos ocorrem no subcontinente indiano (Bangladesh, Índia e Nepal) principalmente em áreas rurais. Entre os países do continente americano, o Brasil apresenta o maior número de casos humanos, e atualmente apresenta uma expansão em grandes centros urbanos, atingindo 21 estados em todas as regiões do país. A média anual de casos é de cerca de 3.000, com incidência de 1,9 casos a cada 100.000 habitantes (OMS, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

A leishmaniose visceral humana apresenta um quadro clínico sintomático caracterizado por febre, anemia, hepatoesplenomegalia, tosse seca, leucopenia e hipergamaglobulinemia. Com a progressão da doença, outras manifestações clínicas se desenvolvem em especial mal-estar, caquexia, diarreia, icterícia, vômito, edema periférico e uma supressão progressiva da resposta imune celular. Além disso, com o diagnóstico tardio da doença e as complicações dos sintomas, infecções bacterianas, virais e hemorragias podem aumentar a letalidade para pacientes com leishmaniose visceral (OLIVEIRA et al., 2010; PALATNIK-DE-SOUSA e DAY, 2011).

Uma grande variedade de mamíferos silvestres atua como reservatório de espécies de *Leishmania*, como raposa-do-mato, cachorro do mato, gambás, equídeos e roedores, mas os cães domésticos são considerados os principais reservatórios desses parasitos no Mediterrâneo, Ásia, Norte da África e América do Sul, e possuem uma grande importância na manutenção do ciclo da doença. O cão apresenta maior quantidade de parasitos na pele do que o homem favorecendo a propagação por vetores e, normalmente, os casos humanos são precedidos por casos caninos (BARBIÉRI, 2006; SMITH et al., 2007; SARIDOMICHELAKIS, 2009; SCHIMMING, PINTO e SILVA, 2012).

A relação direta entre a epidemiologia da leishmaniose visceral humana e a canina ampliou de forma relevante e significativa o estudo da doença zoonótica, sendo esta considerada seguramente importante para a saúde pública. A leishmaniose visceral canina é prevalente em 50 países, sendo que têm sido registrados casos em regiões anteriormente consideradas não-endêmicas, como em algumas áreas do norte da Itália, Reino Unido, Alemanha, no sul do Brasil, norte da Argentina e no Uruguai. O crescimento emergente da leishmaniose canina no Brasil tem sido associado a modificações na distribuição e ecologia do principal vetor, *Lutzomia longipalpis*, e a ineficácia dos programas de controle (PALATNIK-DE-SOUSA e DAY, 2011; DANTAS-TORRES et al., 2012).

A leishmaniose visceral canina é uma doença crônica, com sinais clínicos aparentes em 3 meses a 7 anos de infecção. Os sintomas mais frequentemente encontrados incluem dificuldade locomotora, perda de peso, polidipsia, apatia, anorexia, vômito, diarreia, polifagia, epistaxe e melena. Além destes, a doença transcorre com linfadenomegalia, esplenomegalia, hiperglobulinemia, uveíte, conjuntivite, alterações dermatológicas, onicogribose e hipertermia (SARIDOMICHELAKIS, 2009; SCHIMMING, PINTO e SILVA, 2012).

O diagnóstico da leishmaniose visceral canina é realizado por meio de análises histológicas (coloração por Giemsa e Hematoxilina-eosina), teste imunofluorescência com anticorpo (IFAT), ensaio imunoenzimático (ELISA), teste de aglutinação direta (DAT) e reação em cadeia da polimerase (PCR). O Ministério da Saúde do Brasil atualmente recomenda o uso de kits rápidos de diagnóstico da Biomanguinhos Fiocruz/Rio de Janeiro baseados nas técnicas de imunocromatografia e ELISA (ROMERO e BOELAERT, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; DANTAS-TORRES et al., 2012; SCHIMMING, PINTO e SILVA, 2012).

No Brasil, o tratamento da leishmaniose é somente indicado em casos humanos, sendo que sua realização é difícil, cara e geralmente não resulta em cura total. O tratamento do animal é permitido em outros países, enquanto em nosso país a prática da eutanásia canina é recomendada a todos os animais com sorologia ou parasitológico positivo. Essa prática é amplamente discutida já que o sacrifício desses animais não

reduz a incidência da doença em humanos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; 2006; DANTAS-TORRES et al., 2012).

Alguns tipos de medicamentos são recomendados no tratamento da doença em humanos tais como os antimoniais pentavalentes, sendo os mais comuns o Pentostan® (estibogluconato de sódio) e Glucantime® (antimoniato de meglumina); as amidinas, como a pentamidina; antibióticos, em especial a anfotericina B com as seguintes variações, AmBisome® (anfotericina B lipossômica), Amphotec® (colesterol sulfato de anfotericina B) e Abeltec® (complexo lipídico de anfotericina B); a miltefosina (hexadecilfosfocolina) e, ainda, fármacos sintéticos como o alopurinol. Muitos protocolos apresentam a capacidade de reduzir os sinais clínicos, mas poucos levam à eliminação da doença (SOARES-BEZERRA et al., 2004; SCHIMMING, PINTO e SILVA, 2012; SINGH et al., 2012).

Como método de controle da doença destaca-se o combate ao vetor por meio do uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas em áreas de risco e a própria utilização de inseticidas em coleiras ou sprays em cães. Os mais comumente usados são inseticidas da classe dos piretróides, como alfacipermetrina, cipermetrina e a deltametrina (SOARES-BEZERRA et al., 2004; SCHIMMING, PINTO e SILVA, 2012; SINGH et al., 2012).

Diferentes candidatos a vacina com potencial para promover mecanismos de imunoproteção contra a leishmaniose visceral canina têm sido propostos como importantes ferramentas do controle dessa doença zoonótica (REQUENA et al., 2004; REIS et al., 2010). O tipo de resposta imune humoral e celular em cães com leishmaniose visceral, e a relação existente entre a secreção de citocinas dos tipos Th1 ou Th2 e os anticorpos das subclasses IgG são controversos (REIS et al., 2009). Porém, em alguns estudos de cães infectados com *L. infantum*, ou com outras parasitoses, os autores correlacionam a produção de anticorpos IgG1 com a secreção de TNF- α , IFN- γ e IL-2, citocinas de resposta imune celular do tipo Th1 envolvidas com a resistência do hospedeiro ao parasito, enquanto a produção de anticorpos IgG2 estaria relacionada à secreção de IL-4 e IL-10, citocinas de resposta imune celular do tipo Th2 e/ou Treg, envolvidas nos mecanismos de susceptibilidade do hospedeiro e/ou imunomodulação da

doença (DEPLAZES et al., 1995; NIETO et al., 1999; BELKAID et al. 2006; BARBIERI, 2006; REIS et al., 2006; 2009).

Contra a leishmaniose visceral canina, o uso de antígenos imunogênicos da superfície do parasito passou a ser estudado como possíveis candidatos vacinais, entre eles o FML (ligante de fucose e manose) que compõe a vacina Leishmune®, com efeito protetor em modelos experimentais de camundongos, hamsters e cães. A Leishmune® (Fort Dodge Animal Health), a primeira vacina contra leishmaniose visceral canina licenciada e disponível comercialmente, apresenta em torno de 80% de eficácia. A Leish-Tec® (HertapeCalier Saúde Animal), também licenciada, consiste em um adenovírus capaz de expressar um antígeno de *L. donovani* (A2). Recentemente, a Leish-Tec foi testada em um grupo de cães heterogêneos apresentando cerca de 80-90% de eficácia até 14 meses após a vacinação. Proteínas de secreção isoladas a partir de sobrenadantes de cultura de *L. infantum* juntamente com diferentes adjuvantes como muramildipeptídeo (MDP) ou o extrato purificado de *Quillaja saponaria* (QA-21) também foram testadas originando as vacinas LiESAp-MDP e LiESAp-QA-21 (CaniLeish®/Europa) que induzem proteção significativa e de longa duração em cães (DANTAS-TORRES, 2009; PALATNIK-DE-SOUSA e DAY, 2011; SCHIMMING, PINTO e SILVA, 2012; MUTISO et al., 2013; KUMAR e ENGWERDA, 2014; TESTASICCA et al., 2014; MORENO et al., 2014).

Atualmente muitas proteínas recombinantes têm sido testadas isoladas ou em combinação com adjuvantes ou bactérias e vírus usados como carreadores, destacando-se KMP-11 (proteína 11 de membrana), esterol-24-c-metiltransferase, A2 (proteína específica de amastigotas), CPB (cisteína proteinase B), LACK (quinase c ativada), PSA-2 (antígeno 2 de superfície de promastigotas), NH36 (nucleosídeo hidrolase), K26 (proteína de superfície de *L. donovani*) e gp63 (glicoproteína de superfície). Esses antígenos recombinantes já foram testados em modelos animais com eficácia na proteção, mas poucos evoluíram para ensaios clínicos em primatas não-humanos, cães ou humanos. É importante destacar que existe resistência quanto ao uso dessas vacinas em seres humanos, devido às normas de fabricação, variação genética e polimorfismos do parasito. Mesmo não sendo eficaz contra a leishmaniose canina a Leish-111f (homólogo de um antioxidante tiol específico eucariótico de *L. major*) é o primeiro

candidato a ensaios de fase clínica I e II em pacientes com leishmaniose cutânea ou mucosa no Brasil e Peru e visceral na Índia (KUMAR e ENGWERDA, 2014).

As vacinas de DNA estão sendo desenvolvidas e testes apresentam vantagens como custo baixo de produção, estabilidade e resposta imunológica eficiente. Os antígenos citados acima estão sendo testados como vacinas de DNA, além da TRYP (tioredoxina peroxidase) de *L. infantum* e HbR (receptor alvo de hemoglobina na superfície do hospedeiro) essencial para a endocitose da hemoglobina. O parasito não apresenta via endógena de síntese de heme e, portanto, depende do hospedeiro para a obtenção de hemoglobina e aquisição desse radical que participa de várias atividades metabólicas. A HbR-DNA foi testada sem adjuvantes em camundongos e hamsters infectados com *L. donovani*, apresentando resultados promissores. As vacinas de DNA têm demonstrado ser uma promessa em modelos animais, mas ainda não provam sua utilidade, segurança e eficácia em humanos (KUMAR e ENGWERDA, 2014).

Existe uma busca contínua por componentes imunogênicos que possam induzir uma resposta imune profilática ou terapêutica contra a leishmaniose visceral. Recentemente, a expressão de NTPDase em *L. infantum* foi confirmada por meio de estudos de sua atividade catalítica em preparação de promastigotas, e os primeiros indícios da antigenicidade de seu domínio B foram obtidos pela reatividade entre os soros de cães com leishmaniose visceral e o recombinante r-potDomínio B (MAIA, 2010). Motivados por estes resultados prévios, a antigenicidade da NTPDase 1 nativa de *L. infantum* e de seu domínio B, sua localização em promastigotas e amastigotas, e o seu potencial como um novo alvo terapêutico foram explorados e estão demonstrados neste trabalho. Além disso, novos estudos *in silico* foram efetuados ampliando ainda mais o número de organismos patogênicos de interesse em veterinária que contém NTPDase com o domínio B conservado. Estudos adicionais sobre outras moléculas com potencial para elevar a imunogenicidade do domínio B quando a ele fusionada levaram a escolha da glutathione S-transferase de *S. japonicum*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o potencial da nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase 1) de *Leishmania infantum* como um novo alvo antigênico e terapêutico e adicionalmente, obter uma nova biomolécula para o uso em controle de parasitoses animais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Avaliar a identidade e similaridade de peptídeos sintéticos derivados da NTPDase 1 de *L. braziliensis* ou da apirase de batata com as suas respectivas contrapartes na NTPDase 1 de *L. infantum*;

2.2.2 Purificar a NTPDase 1 de *L. infantum* por eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante, e confirmar a sua identidade (a) por visualização de sua atividade catalítica *in situ* e medidas colorimétricas, (b) “Western blots” e (c) espectrometria de massas;

2.2.3 Determinar a antigenicidade da NTPDase 1 pura de *L. infantum* por “Western blots” e reatividade com os soros de cães com leishmaniose visceral e, particularmente, de seu domínio B por ELISA, utilizando os mesmos soros e os peptídeos sintéticos;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Purificação de NTPDase 1 de *Leishmania infantum* e determinação de sua antigenicidade e susceptibilidade a anticorpos inibidores

3.1.1 Obtenção da preparação de promastigotas de *L. infantum*, apirase de batata, r-potDomínio B, peptídeos sintéticos e soros imunes

Formas promastigotas de *L. infantum* (cepa MHOM/BR/1972/BH46) foram cultivadas no meio LIT por sete dias (fase estacionária de crescimento), coletadas, lavadas 3 vezes em tampão Tris-HCl 5 mM, pH 7,4, a 4°C, e centrifugadas a 3000 x *g* por 10 min. Os parasitos foram homogeneizados 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 proteínas foram obtidos por 3 ciclos de congelamento e descongelamento e 4 ciclos de sonicação por 10 min. A preparação foi centrifugada a 10000 x *g* a 4 °C por 15 min, e a concentração de proteínas do sobrenadante foi determinada (MAIA, 2010). O sobrenadante foi armazenado a -80 °C até o uso.

A apirase de batata (~50 kDa) foi purificada de uma linhagem de *Solanum tuberosum* adquirida no comércio local, por meio de precipitação em sulfato de amônio, colunas de gel filtração Sephadex G-25, Sephadex G-100 e coluna de troca iônica (FARIA-PINTO et al., 2004).

O recombinante r-potDomínio B (5,493 Da), derivado do domínio B conservado (r78-117) da apirase de batata (número de acesso NCBI U58597.1) foi expresso como um polipeptídeo com cauda de hexahistidina (MAIA et al., 2011).

Os peptídeos LbB1LJ (r82-103) e LbB2LJ (r102-121) derivados do domínio B da NTPDase 1 de *L. braziliensis* (ATPDase; CAM42020.1), e potB1LJ (r77-98) e potB2LJ (r97-117) derivados do domínio B de apirase de batata (NCBI U58597.1), foram obtidos por síntese em fase sólida, e a massa molecular e a pureza foram confirmadas por

análise de aminoácidos e por MALDI-TOF usando um espectrômetro de massa Microflex - LT (Bruker – Daltonics, Billerica, MA, USA) (KORKMAZ et al., 2008; MENDES, 2010; REZENDE-SOARES et al., 2010).

Soros imunes contra a apirase de batata (FARIA-PINTO et al., 2004), r-potDomínio B (MAIA et al., 2011) e peptídeos sintéticos (MENDES, 2010; MENDES et al., 2011; CARVALHO-CAMPOS, 2011) foram obtidos como previamente descrito.

3.1.2 Seleção de soros de cães

Soros de cães adultos de 2 a 6 anos de idade, de ambos os sexos, não infectados (SAE; n=17) ou infectados naturalmente com leishmaniose visceral (INF; n=38), residentes em área endêmica para *L. infantum* (REIS et al., 2006), foram obtidos de uma soroteca gentilmente cedida pelo Dr. Alexandre Barbosa Reis, do Laboratório de Imunopatologia da Universidade Federal de Ouro Preto/UFOP/MG e Dr. Marcos José Marques do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL/MG. O diagnóstico de leishmaniose visceral canina foi feito por imunofluorescência indireta (IFAT) usando antígenos de formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/1960/BH6) e *L. infantum* (MHOM/BR/1972/BH46). Nos cães positivos por IFAT, a infecção com *L. infantum* foi confirmada por exame parasitológico e ensaios sorológicos, usando extrato do parasito *L. infantum* ou r-K39 em ELISA (REIS et al., 2006).

Os 17 cães não-infectados, incluídos nesse trabalho como cães saudáveis de área endêmica (SAE), foram classificados por exames clínicos e laboratoriais negativos (REIS et al., 2006). Para a determinação do ponto de corte, 10 soros de cães saudáveis (ambos os sexos, com idade entre 2 e 8 anos) domiciliados em área não endêmica para *Leishmania* spp. foram examinados usando os mesmos parâmetros. Esses soros de cães saudáveis foram obtidos em colaboração com o veterinário Dr. Túlio Vieira Mendes, sendo coletados em clínicas veterinárias de Juiz de Fora/MG. Os protocolos foram cumpridos de acordo com o Conselho Brasileiro Nacional de Pesquisa em Animais e foram aprovados pelo Comitê de Ética de Pesquisa Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob o processo nº 141/2006.

3.1.3 Purificação da NTPDase 1 de *L. infantum* por eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante e identificação por “Western blots”

Uma alíquota de preparação de promastigotas de *L. infantum* foi homogeneizada 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 submetidas à eletroforese a 130V usando equipamento Mini-Protean III Cell (BioRad) por 4 h a 4°C usando tampão de corrida contendo estas mesmas concentrações de detergentes. Após a corrida, o gel foi lavado por 40 min em Tampão MOPS 50 mM, pH 7,4. Os poços foram cortados e incubados separados em tampão MOPS 50 mM, pH 7,4, suplementado com ortovanadato de sódio 100 µM, CaCl₂ 10 mM e 5 mM do substrato ATP, GTP ou CTP a 37°C. O poço incubado com o substrato ADP ou UDP foi suplementado com 1 mg/mL de éter dodecilnonaetilenoglicol (C12E9), um detergente não iônico. 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 e eletroeluída.

A preparação de promastigotas (100 µg de proteína total) e as bandas ativas (cada uma delas originada de 100 µg de proteínas totais de promastigotas) 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 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 h à temperatura ambiente com o soro policlonal de coelho anti-apirase de batata (diluído a 1:1000), ou soro policlonal de camundongo anti-r-potDomínioB (1:400), anti-LbB1LJ (1:200) ou anti-LbB2LJ (1:200) usando procedimentos padrão (MAIA et al., 2011).

“Western blots” de preparação de promastigotas (100 μ g de proteína) e de bandas ativas eletroeluídas foram também realizados usando soros diluídos 1:100 de cães saudáveis ou com leishmaniose visceral.

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.

3.1.4 Determinação da atividade fosfohidrolítica da NTPDase 1 pura de *L. infantum*

Outro gel não-desnaturante foi desenvolvido nas mesmas condições experimentais, e a mobilidade da NTPDase 1 foi revelada em um poço pelo substrato ATP como já descrito. O gel adjacente foi lavado rapidamente e incubado durante 12 h em tampão MOPS 50 mM, pH 7,4, para a completa remoção dos detergentes Triton X-100 e DOC. A região do gel adjacente correspondente ao centro da banda ativa foi cortada e usada em tubo teste para medida de atividade fosfohidrolítica por colorimetria. O meio de reação foi composto de MOPS 50 mM, pH 7,4, contendo 10 mM de CaCl_2 e 5 mM de ATP ou ADP, ou 1 mM de CaCl_2 e 3 mM de ATP ou ADP, na presença ou ausência de 1mg/mL de C12E9. Recortes de outra região do gel foram usados como brancos. Para cada condição experimental, dois pedaços de gel foram testados em tubos, e a quantidade de fosfato inorgânico livre (Pi) foi determinado espectrofotometricamente (TAUSSKY e SHORR, 1953). O resultado representa a média e o desvio padrão.

3.1.5 Quantificação de anticorpos por ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assays)

Alíquotas (10 μ g/poço) dos peptídeos sintéticos LbB1LJ e LbB2LJ foram solubilizadas em tampão NaHCO_3 0,1 M, pH 9,6, e incubadas por 12 h em microplacas Costar 3590 (“flat-bottomed microtiter plates”; Corning Inc., Corning, NY, USA). Após 1

h de bloqueio em tampão fosfato 0,15 M, pH 7,2, suplementado com Tween-20 0,3% e caseína 2%, os soros de cães diluídos 1:50 na mesma solução de bloqueio foram incubados por 4 h à temperatura ambiente. Os anticorpos ligados ao antígeno na placa foram detectados usando anticorpos secundários anti-IgG de cão produzidos em carneiro e conjugados à peroxidase (Bethyl, Montgomery, USA). Como substrato foi usado OPD (dihidroclorato de o-fenilenodiamina)/H₂O₂, e a reação colorimétrica foi lida a 492 nm em leitor de placas (Molecular Devices Corp., Menlo Park, CA, USA). Os valores considerados foram as médias de 4 determinações com uma variação menor do que 15% entre elas. O menor limite de positividade (ponto de corte) foi definido como sendo a média da densidade óptica das amostras de soros de cães saudáveis mais 2 vezes o desvio padrão. O Software GraphPadPrism (versão 4) foi usado para as análises estatísticas. A mediana e o intervalo de confiança de 95% foram calculados, e os dados analisados usando o teste de Mann-Whitney. Valores de P < 0,05 foram considerados significativos.

3.1.6 Efeitos de soros imunes policlonais sobre a atividade fosfohidrolítica de preparação de promastigotas de *L. infantum*

Uma alíquota da preparação de promastigotas de *L. infantum* foi ressuspensa em meio contendo tampão MOPS, pH 7,4, CaCl₂ 1mM, suplementado com C12E9 1mg/mL, um detergente não iônico que mantém tanto a atividade enzimática da preparação quanto o meio de reação claro para as medidas colorimétricas (COIMBRA et al., 2008; REZENDE-SOARES et al., 2010; MAIA et al., 2011). Após centrifugação a 10000 x **g** por 10 min a 4°C, o soro imune anti-LbB1LJ ou anti-LbB2LJ (diluição 1:400) foi adicionado ao sobrenadante (2,5 mg de proteína/mL) e incubado por 3h à temperatura ambiente. Ensaio usando soros controle de camundongo foram realizados em paralelo. A atividade fosfohidrolítica foi medida em meio de reação padrão contendo tampão MOPS 50 mM, pH 7,4, ortovanadato de sódio 100 µM, CaCl₂ 1 mM, 0,01mg de proteína/mL e 3 mM de ATP ou ADP. A quantidade de fosfato inorgânico livre (Pi) foi determinada espectrofotometricamente (TAUSSKY e SHORR, 1953). Todos os ensaios foram

realizados em triplicata. Os experimentos foram repetidos duas vezes com resultados similares.

3.1.7 Análise bioinformática

Os números de identificação para o acesso das proteínas no NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) estão nas Figuras. A predição da conformação tridimensional dos peptídeos foi feita no servidor PSIPRED (Protein Structure Prediction Server; <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) e visualizada pelo programa Deepview/Swiss-PdB-viewer.

4 RESULTADOS

4.1 Purificação de NTPDase 1 de *Leishmania infantum* e determinação de sua antigenicidade e susceptibilidade a anticorpos inibidores

4.1.1 Análises de bioinformática

Peptídeos sintéticos derivados dos domínios B conservados da apirase de batata *Solanum tuberosum* (potB1LJ, r77-98; potB2LJ, r97-117) e da NTPDase 1 de *L. braziliensis* (LbB1LJ, r82-103; LbB2LJ, r-102-121) e os anticorpos produzidos contra eles foram usados como ferramentas para o estudo da NTPDase 1 de *L. infantum*.

Os modelos tridimensionais do peptídeo LbB1LJ, predito como uma estrutura com dobras aleatórias, e LbB2LJ, uma estrutura em hélice, estão ilustrados na Figura 1. A sequência de aminoácidos de LbB1LJ (86% de identidade e 95% de similaridade em 22 aminoácidos) ou LbB2LJ (80% de identidade e 90% de similaridade em 20 aminoácidos) tem alta homologia com a respectiva contraparte da NTPDase 1 de *L. infantum* (r82-121), a qual foi anotada como ATPDase putativa no GenBank do NCBI (Fig. 1).

O alinhamento das seqüências de aminoácidos mostrou 55% (12/22) de identidade e 64% (14/22) de similaridade entre o peptídeo potB1LJ e a porção N-terminal (domínio r82-103) do domínio B conservado da NTPDase 1 de *L. infantum*, enquanto o potB2LJ tem 50% (10/20) de identidade e 60% (12/20) de similaridade com a sua porção C-terminal (Fig. 1; domínio r102-121).

Nenhuma similaridade significativa foi encontrada quando a sequência de aminoácidos de LbB1LJ ou LbB2LJ, ou do domínio r82-103 da NTPDase de *L. infantum* foi alinhada com a contraparte da hipotética GDPase de *L. braziliensis* (r250-289) ou de *L. infantum* (r235-275), as quais são isoformas anotadas como putativas nos genomas destes parasitos e que pertencem à família das NTPDases (Fig. 1).

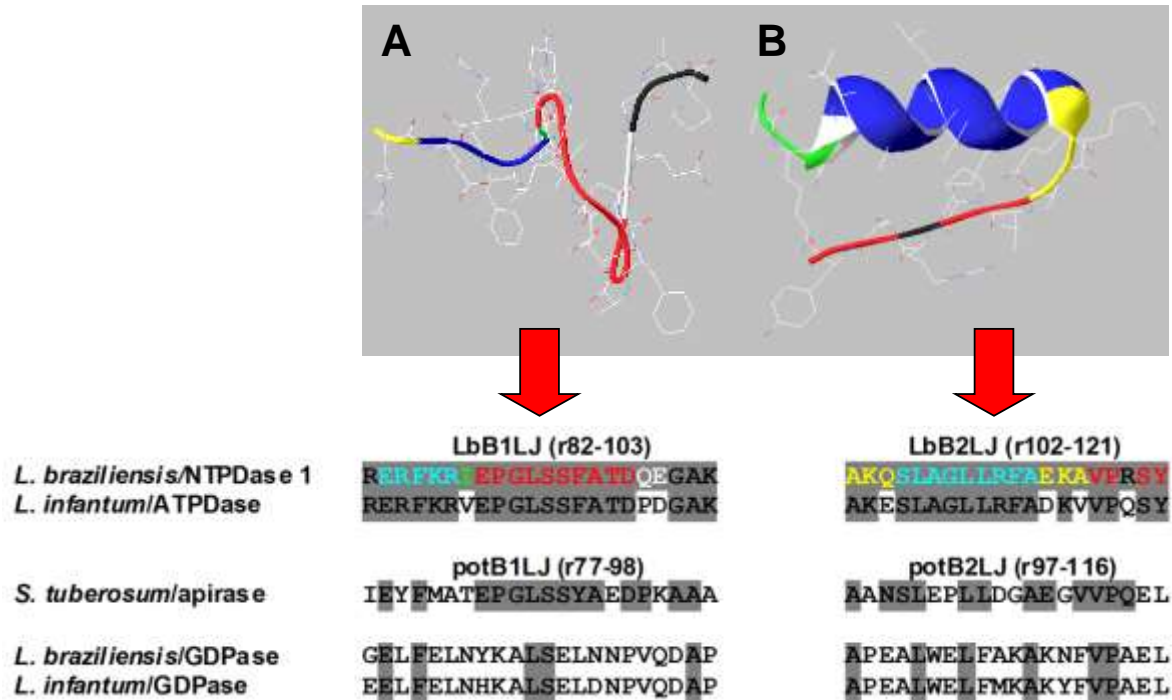


Figura 1. Estruturas tridimensionais dos peptídeos sintéticos LbB1LJ (A) e LbB2LJ (B) derivados do domínio B conservado da NTPDase 1 de *L. braziliensis*. Os modelos foram calculados pelo software PSIPRED e visualizados pelo Deepview/Swiss-PdB-viewer (Fonte: arquivos do laboratório; Emídio NB). Os aminoácidos de LbB1LJ (A) e LbB2LJ (B) são mostrados em cores, como também indicados dentro de suas sequências primárias mostradas abaixo. Número de acesso das sequências no GenBank do NCBI são: NTPDase 1 de *L. braziliensis*, CAM42020.1; ATPDase de *L. infantum*, CAM66723.1; apirase de *Solanum tuberosum*, P80595; GDPase de *L. braziliensis*, XP_001562788.1; GDPase de *L. infantum*, CAM66031.1.

4.1.2 Purificação da NTPDase 1 de *L. infantum* por eletroforese em gel não-desnaturante

Com o objetivo de homogeneizar a preparação de promastigotas de *L. infantum*, inicialmente foram realizados vários testes com os detergentes Triton X-100, deoxicolato de sódio e C12E9, variando a concentração de cada um deles, isolados ou em misturas. A efetividade destes experimentos foi monitorada por dosagem de proteínas e medidas de atividade enzimática. A melhor condição experimental encontrada foi a mistura Triton X-100 0,2% e deoxicolato de sódio 0,2%, a qual foi usada para a homogeneização da

preparação do parasito seguida de fracionamento de proteínas por eletroforese em gel não-desnaturante, no qual foram adicionados os mesmos detergentes.

Como mostrado na Figura 2, uma isoforma de NTPDase foi efetivamente isolada da preparação de homogeneizado de promastigotas (100 µg de proteína total) aplicada em gel não-desnaturante e submetida a eletroforese. A enzima foi capaz de catalisar a hidrólise dos substratos ATP, GTP e CTP como observado pela formação de depósito branco de fosfato de cálcio em uma única banda ativa após a incubação do gel com tampão MOPS 50 mM, pH 7,4, ortovanadato de sódio 100 µM, CaCl₂ 10 mM e 5 mM do substrato (Fig. 2, poços ATP, GTP e CTP). Sob essas condições experimentais, nenhum precipitado de fosfato de cálcio foi detectado quando o gel foi incubado com ADP ou UDP (dados não mostrados).

Após a lavagem do gel e a adição de detergente não-iônico C12E9 no meio de reação padrão foi possível visualizar a banda ativa resultante da hidrólise de ADP e UDP exibindo idêntica mobilidade eletroforética (Fig. 2A, ADP e UDP), sugerindo que a hidrólise de nucleosídeos difosfatados foi afetada pela mistura de Triton X-100 0,2% e DOC 0,2%.

Após a eletroforese da banda ativa em SDS-PAGE 10% (originada de 100 µg de proteína total) seguida pela coloração por Coomassie blue, nenhum polipeptídeo foi detectado (dados não mostrados), demonstrando um baixo rendimento do processo. No entanto, a coloração deste mesmo gel pela prata mostrou um único polipeptídeo de aproximadamente 50 kDa (Fig. 3; P, poço B), confirmando sua pureza e que essa não é uma proteína predominante quando comparada aos polipeptídeos resultantes do fracionamento das proteínas totais (100 µg) da preparação de promastigotas (Fig. 3; P, poço A). Portanto, a hidrólise de nucleosídeos di- e trifosfatados (Fig. 2) por este polipeptídeo de 50 kDa (Fig. 3; P, poço B) confirmou a presença de uma isoforma de NTPDase em promastigotas de *L. infantum*.

Por “Western blots” da preparação de promastigotas de *L. infantum* (100 µg de proteína total) o polipeptídeo de aproximadamente 50 kDa foi reconhecido pelo soro imune policlonal anti-apirase de batata (Fig. 3; Wb-R, poço 1).

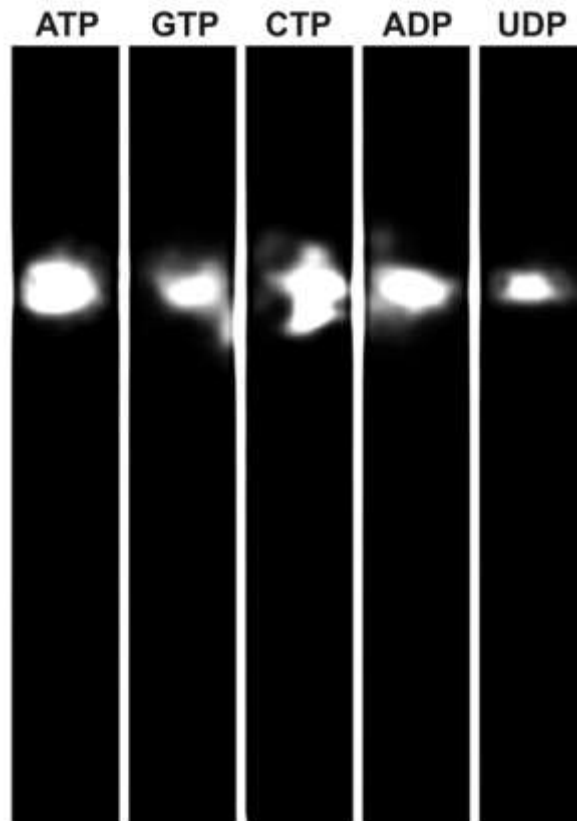


Figura 2. Purificação de NTPDase de *L. infantum* por gel não-desnaturante. Alíquotas (100 µg de proteínas totais) de uma preparação de homogeneizado de promastigotas em detergente foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante. O gel foi lavado em tampão MOPS 50 mM, pH 7,4, e os poços cortados foram imersos em tampão novo contendo 5 mM de substrato, ortovanadato de sódio 100 µM e CaCl₂ 10 mM, suplementado (ADP e UDP) ou não (ATP, GTP e CTP) com detergente não-iônico C12E9. 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. O gel foi fotografado contra um fundo escuro.

Adicionalmente, foi também identificado como NTPDase pelo soro imune policlonal anti-apirase de batata (Wb-R, poço 2) e pelo soro imune anti-r-potDomínio B (Fig. 3, Wb-R, poço 3), confirmando a presença de epitopos compartilhados com a apirase de batata e a presença do Domínio B conservado na sequência primária da isoforma do parasito.

Corroborando esses resultados, foi detectada reatividade com o soro imune anti-LbB1LJ (Wb-R, poço 4) ou anti-LbB2LJ (Wb-R, poço 5), os quais com mais afinidade e

sensibilidade reconheceram a banda de aproximadamente 50 kDa e, adicionalmente, uma banda de 47 kDa (Fig. 3), sendo estes polipeptídeos identificados como a isoforma NTPDase 1 de *L. infantum*.

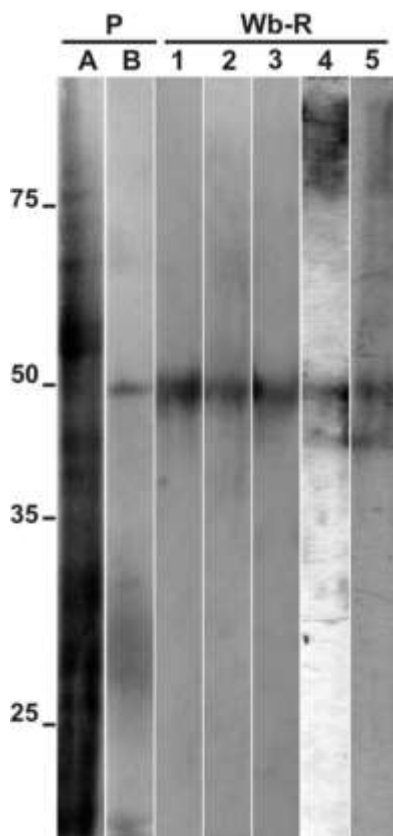


Figura 3. Identificação da NTPDase 1 de *L. infantum* extraída de banda ativa de gel não-desnaturante. As proteínas de uma alíquota da preparação de promastigotas (P, poço A; Wb-R, poço 1; 100 µg) ou de pedaços de gel não-desnaturante correspondente a banda ativa (P, poço B; Wb-R, poços 2, 3, 4 e 5) foram separadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% e submetidas a coloração por Comassie blue e prata (P, poços A e B) ou eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. Os “Western blots” foram desenvolvidos com soro imune anti-apirase de batata (Wb-R, poços 1 e 2; diluição 1:1000), anti-r-potDomínio B (Wb-R, poço 3; diluição 1:400), anti-LbB1LJ (Wb-R, poço 4; diluição 1:200) ou anti-LbB2LJ (Wb-R, poço 5; diluição 1:200). As membranas foram reveladas por quimioluminescência.

A hidrólise de ATP e ADP pela NTPDase pura foi testada em ensaios colorimétricos (Fig. 4). Como descrito em Materiais e Métodos, recorte de gel contendo a NTPDase 1 ativa foi obtido de um gel não-desnaturante, que foi previamente lavado durante 12 h para a remoção completa de Triton X-100 e DOC. A NTPDase contida no recorte de gel

foi incubada em tampão MOPS 50 mM, pH 7,4, contendo CaCl_2 10 mM e 5 mM de ATP (Fig. 4A) ou ADP (Fig. 4B) na presença ou ausência de detergente C12E9. O fosfato inorgânico livre produzido foi determinado espectrofotometricamente nos tempos indicados. Na completa ausência de detergentes (quadrados e círculos brancos), uma hidrólise insignificante de ATP ($0,14 \pm 0,08 \text{ nmolPi} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) ou ADP ($0,13 \pm 0,06 \text{ nmolPi} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) foi detectada (Fig. 4; A e B). Por outro lado, na presença de C12E9 (quadrados e círculos pretos), as atividades ATPásica e ADPásica aumentaram para $5,95 \pm 2,04$ e $3,91 \pm 1,09 \text{ nmolPi} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$, respectivamente, sugerindo que na presença deste detergente não iônico a razão de atividade ATPásica/ADPásica é de aproximadamente 1,5 (Fig. 4, A e B).

O meio de reação composto de MOPS 50 mM, pH 7,4, CaCl_2 1 mM e 3 mM de substrato, o qual é usado em ensaios de inibição de atividade enzimática por anticorpos ou drogas, foi também testado em recortes de gel contendo o polipeptídeo ativo usando colorimetria, na ausência (quadrados ou círculos brancos) ou presença (quadrados ou círculos pretos) de C12E9 (Fig. 4; A e B). Na ausência de C12E9, as atividades ATPásica e ADPásica da NTPDase 1 também foram baixas, aproximadamente $0,16 \pm 0,04$ e $0,24 \pm 0,12 \text{ nmolPi} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$, respectivamente (Fig. 4, A e B). Na presença do detergente não-iônico, as atividades ATPásica e ADPásica foram de aproximadamente $3,46 \pm 0,08$ e $3,04 \pm 0,83 \text{ nmolPi} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$, respectivamente (Fig. 4, A e B). Quando comparada à atividade hidrolítica obtida usando 10 mM de CaCl_2 e 5 mM de substrato (Fig. 4, A e B), é possível observar que a hidrólise de ATP decresceu aproximadamente 42% e a atividade ADPásica não diferiu significativamente, mantendo uma razão de atividade ATPásica/ADPásica de aproximadamente 1,1 (Fig. 4, A e B), sugerindo que 1 mM de CaCl_2 é suficiente para a ativação da enzima e, também, que o C12E9 é efetivo para o dobramento da NTPDase 1 nativa.

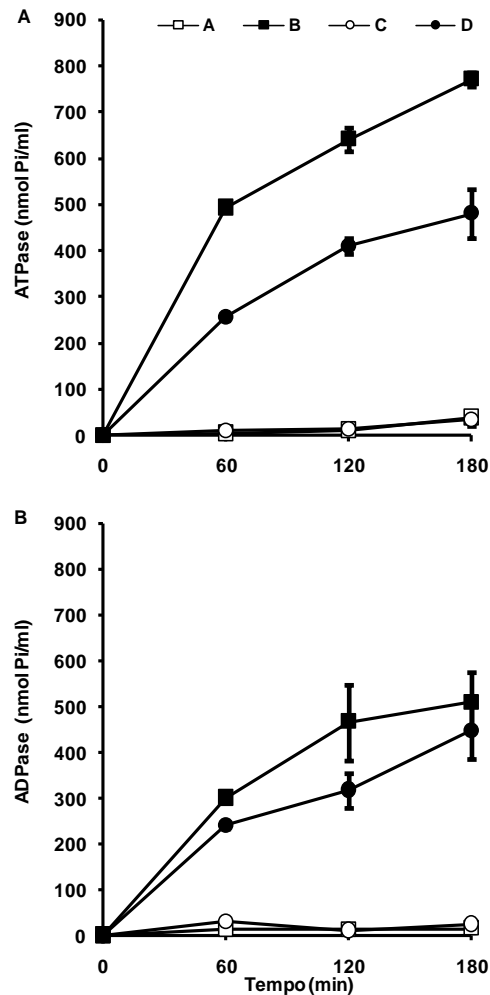


Figura 4. Atividade ATPásica ou ADPásica da NTPDase 1 de *L. infantum* incluída em pedaço de gel analisada por testes em tubos usando meios de reação distintos. Um poço de um gel não-desnaturante similar ao mostrado na Fig. 2 foi revelado com ATP. O gel adjacente foi lavado e incubado 12 h com MOPS 50 mM, pH 7,4, para a remoção completa de Triton X-100 e DOC. A região do gel correspondente a banda ativa foi cortada e cada pedaço de gel foi testado para a hidrólise de ATP (A) ou ADP (B). O meio de reação continha MOPS 50 mM, pH 7,4, CaCl_2 10 mM e 5 mM de substrato (A, quadrado branco), adicionado com C12E9 (B, quadrado preto) ou, alternativamente, MOPS 50 mM, pH 7,4, CaCl_2 1mM e 3 mM de substrato (C, círculo branco), adicionado com C12E9 (D, círculo preto). Pedaço de gel de outra região foi usado como branco. O fosfato inorgânico livre produzido foi determinado espectrofotometricamente nos tempos indicados. Para cada condição experimental, dois pedaços de gel foram testados em tubos, e o resultado representa a média \pm desvio padrão.

4.1.3 Determinação da antigenicidade da NTPDase 1 de *L. infantum* por “Western blots”

Os polipeptídeos de 50 e 47 kDa isolados por gel não-desnaturante como já descrito, e identificados como NTPDase 1 de promastigotas de *L. infantum*, foram reativos com os soros de cães naturalmente infectados, os quais apresentavam a leishmaniose visceral sintomática. Um resultado representativo é mostrado na Figura 5 (Wb-A, poço B). Esses soros também reagiram com proteínas antigênicas de preparação de promastigotas (Fig. 5; Wb-A, poço A), ao passo que nenhuma reatividade foi encontrada quando a NTPDase 1 foi testada com soros de cães saudáveis (Fig. 5; Wb-A, poço C). Estes resultados indicaram a antigenicidade da NTPDase 1 de *L. infantum*.

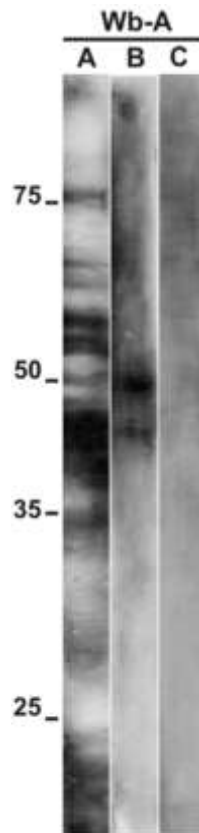


Figura 5. “Western blots” de NTPDase pura usando soro de cão com leishmaniose visceral. Uma alíquota da preparação de promastigotas (Wb-A, poço A; 100 µg de proteína) e de banda ativa (Wb-A, poços B e C) cortada de gel não-desnaturante como aquele mostrado na Fig. 2, foram testadas com amostra de soro (diluição 1:100) de cão com leishmaniose visceral (Wb-A, poços A e B) ou de cão saudável (Wb-A, poço C). As membranas foram reveladas por quimioluminescência.

4.1.4 Determinação da antigenicidade do domínio B da NTPDase 1 de *L. infantum* por ELISA, usando a reatividade de anticorpos IgG de soros de cães com leishmaniose visceral e os peptídeos sintéticos LbB1LJ e LbB2LJ

O nível de anticorpos IgG foi quantificado em amostras de soro de cães usando os peptídeos sintéticos LbB1LJ e LbB2LJ como antígenos de cobertura em ELISA (Fig. 6). Usando como ponto de corte a reatividade de IgG de cães saudáveis domiciliados em área não endêmica, 17 (45%) ou 19 (50%) dos 38 cães naturalmente infectados (INF) foram soropositivos para LbB1LJ ($0,366 \pm 0,173$; $P < 0,01$) e LbB2LJ ($0,337 \pm 0,215$; $P < 0,05$), respectivamente, com valores significativamente maiores que aqueles encontrados para o grupo SAE (Fig. 6; LbB1LJ, $0,244 \pm 0,071$; LbB2LJ, $0,161 \pm 0,041$). Somente 2 (12%) dos 17 cães saudáveis também domiciliados em área endêmica foram soropositivos para LbB1LJ, enquanto para LbB2LJ nenhuma soropositividade foi detectada (Fig. 6). A reatividade entre IgG total de soros de cães e r-potDomínio B, o recombinante derivado do domínio B da apirase de batata (MAIA, 2010), foi novamente mostrada para comparação. Quatorze (37%) dos 38 cães do grupo INF ($0,398 \pm 0,107$; $P < 0,001$) e apenas 2 (12%) dos 17 cães do grupo SAE ($0,298 \pm 0,067$) foram soropositivos para este recombinante (Fig. 6). Estes resultados confirmaram a antigenicidade da NTPDase 1 de *L. infantum*, e identificaram seu domínio B (r82-121) conservado como rico em epitopos para células B.

4.1.5 Inibição da atividade NTPDásica na preparação de promastigotas de *L. infantum* pelos soros policlonais anti-peptídeos

Os efeitos de anticorpos anti-LbB1LJ e anti-LbB2LJ foram testados quanto a capacidade de inibir a atividade NTPDásica de preparações de homogeneizado do parasito em detergente C12E9. Os anticorpos anti-LbB1LJ e anti-LbB2LJ inibiram quase totalmente a atividade ATPásica (92-99%) e ADPásica (87-92%) da NTPDase de *L. infantum*.

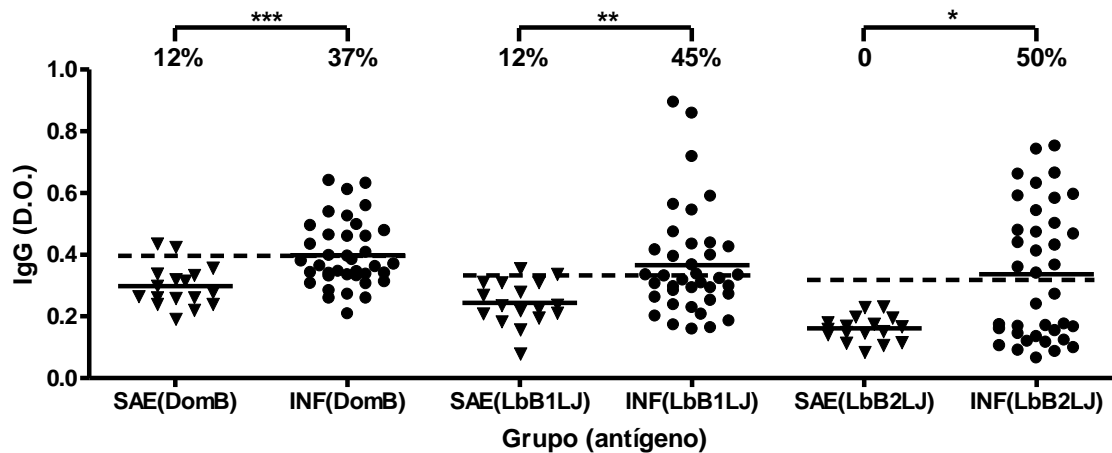


Figura 6. Reatividade de IgG de cães com os peptídeos LbB1LJ e LbB2LJ. Níveis de anticorpos IgG foram quantificados em amostras de soros diluídas 1:50 de cães infectados domiciliados em área endêmica (INF; n= 38), usando LbB1LJ ou LbB2LJ como antígeno de cobertura em ELISA, e comparados aos cães saudáveis (SAE; n= 17) domiciliados na mesma área endêmica. Como controle, os dados obtidos usando como antígeno o recombinante r-potDomínioB (DomB) são também mostrados (MAIA, 2010). Os resultados são expressos em densidade ótica, e a linha horizontal representa a média. A linha horizontal pontilhada representa a média da densidade ótica de amostra de soro de cães saudáveis (n= 10) domiciliados em área não endêmica mais duas vezes o desvio padrão. Valores maiores que o ponto de corte para r-potDomínioB ($0,339 \pm 0,032$; $0,404$), LbB1LJ ($0,274 \pm 0,030$; $0,334$) ou LbB2LJ ($0,212 \pm 0,054$; $0,320$) foram considerados soropositivos. A análise estatística dos grupos foi determinada usando o teste de Mann-Whitney. O valor de P é $< 0,05^*$, $0,01^{**}$ ou $0,001^{***}$.

Tabela 1. Inibição da atividade NTPDásica de preparações de promastigotas homogeneizadas em C12E9 por soros anti-peptídeos

Condições experimentais ^a	Atividade ATPásica ^b	Atividade ADPásica ^b
	(nmol Pi x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	
Soro controle	64 ± 14	38 ± 6
Soro imune anti-LbB1LJ	0,6 ± 0,8 (1)	3 ± 3 (8)
Soro imune anti-LbB2LJ	5 ± 7 (8)	5 ± 4 (13)

^aSoro de camundongo diluído 1:400.

^bOs resultados são a média ± DP de experimentos em triplicatas que foram repetidos duas vezes com resultados similares. Entre parênteses, a porcentagem de atividade hidrolítica comparada ao controle.

5 DISCUSSÃO

5.1 Purificação de NTPDase 1 de *Leishmania infantum* e determinação de sua antigenicidade e susceptibilidade a anticorpos inibidores

Neste trabalho, a NTPDase 1 de *L. Infantum* foi purificada usando como estratégia a localização de sua atividade enzimática após fracionamento de proteínas por meio de gel não-desnaturante seguida de extração da banda ativa, o que resultou em uma proteína com alto grau de pureza e atividade hidrolítica até 200 vezes maior quando comparada àquela previamente caracterizada em preparação de proteína total de promastigotas (MAIA, 2010).

Para o sucesso deste procedimento foram necessários estudos e padronização prévia, nos quais foram usadas diferentes concentrações de detergentes, isolados ou combinados, para a solubilização da preparação de parasitos, pois a NTPDase é sensível à grande parte dos detergentes (VASCONCELOS et al., 1993; 1996; FARIA-PINTO et al., 2004; GUEVARA-FLORES et al., 2008; COIMBRA et al., 2008; KNOWLES, 2011).

Desta análise, foi observado que o detergente C12E9 não é apropriado para o isolamento de isoformas de NTPDase de parasitos por géis não-desnaturantes, mas tem a vantagem de manter o meio de reação claro para ensaios colorimétricos, e mantém a atividade enzimática dessa proteína (COIMBRA et al., 2008; REZENDE-SOARES et al., 2010; MAIA et al., 2011). Com relação aos detergentes iônicos Triton X-100 e deoxicolato de sódio, quando usados na concentração 0,2% e combinados, solubilizaram a preparação de promastigotas de *L. infantum* e, mantidos no gel não-desnaturante, permitiram o fracionamento efetivo das proteínas com preservação de atividade catalítica sobre os substratos ATP, GTP e CTP. A atividade NTPDásica foi identificada pela formação de precipitados de fosfato de cálcio depositados sobre uma única banda no gel. Por outro lado, para a visualização das atividades ADPásica e UDPásica foi necessário retirar o Triton X-100 e o deoxicolato de sódio, e substituí-lo pelo C12E9,

sugerindo que este último contribui para o dobramento adequado da proteína e manutenção de sua conformação nativa.

Esta banda ativa foi identificada por SDS-PAGE e coloração pela prata como um polipeptídeo de aproximadamente 50 kDa, confirmando a expressão de uma isoforma de NTPDase em promastigotas de *L. infantum*, apta a hidrolisar nucleosídeos di- e trifosfatados sob a dependência de íon bivalente.

Por “Western blots”, esta banda de 50 kDa foi identificada por anticorpos anti-apirase de batata e anti-r-potDomínio B. Em trabalhos prévios, por análises *in silico* foi mostrado que a NTPDase hipotética anotada no genoma de *L. infantum* (ATPDase; CAM66723.1; Gene ID 5067729; PEACOCK et al., 2007), de massa molecular predita de 47 kDa e sítio de glicosilação, tem alta homologia (31% de identidade e 45% similaridade em 404 aminoácidos) com a apirase de batata (MAIA, 2010; MAIA et al., 2011). Alta homologia (55% de identidade e 60% de similaridade em 40 aminoácidos) foi também encontrada entre o domínio B conservado da apirase de batata (U58597.1; r78-117) e a sua contraparte (r83-122) nesta ATPDase de *L. infantum* (MAIA, 2010; MAIA et al., 2011).

Prova definitiva da identidade desta NTPDase pura foi obtida pela reatividade com anticorpos anti-LbB1LJ e anti-LbB2LJ, produzidos contra peptídeos derivados do domínio B da NTPDase 1 de *L. braziliensis* (CAM42020.1) e que apresentam alto nível de identidade (> 80%) com o domínio B da ATPDase de *L. infantum* (Gene ID 5067729). A reatividade de anticorpos anti-LbB1LJ e anti-LbB2LJ, de sensibilidade e especificidade elevadas, com uma banda adicional de 47 kDa não detectada pela coloração por prata, sugeriu que esta proteína do parasito está sujeita a um mecanismo pós-traducional, como glicosilação, e essa banda de menor peso molecular representa a sua forma deglicosilada. Além disso, a reatividade destes anticorpos confirmou a presença do domínio B conservado na sequência primária da isoforma do parasito.

No genoma de *L. infantum* foi também anotada outra proteína hipotética, a guanosina difosfatase (GDPase; Gene ID 5067146; PEACOCK et al., 2007), também da família das NTPDases, mas pertencente a clado de filogenia diferente da ATPDase (Gene ID 5067729; MAIA, 2010; MAIA et al., 2011; SANSOM, 2012). Esta proteína tem

massa molecular predita de 74 kDa e somente 33% de identidade e 47% de similaridade em 228 aminoácidos com a apirase de batata, as quais foram restritas às regiões conservadas da família das NTPDases, sendo por isso descartada. Além disso, nenhuma similaridade significativa foi encontrada entre o domínio B de apirase de batata ou da ATPDase de *L. infantum* e a contraparte (r236-275) da GDPase (MAIA, 2010; MAIA et al., 2011).

Assim, este conjunto de dados permitiu a identificação da proteína como aquela hipotética anotada no genoma do parasito, a ATPDase (CAM66723.1) e, como sugerido por Sansom (2012), ela foi denominada NTPDase 1.

É de relevância apontar que a mesma estratégia foi usada para isolar a NTPDase 1 nativa de *L. amazonensis*, e o perfil de mobilidade desta proteína em gel não-desnaturante, o qual é determinado por massa e carga líquida, foi diferente (DETONI, 2015), sugerindo que as NTPDases 1 de distintas espécies de *Leishmania*, embora altamente conservadas, estão sujeitas a diferentes modificações pós-traducionais, estudos que já foram também iniciados em nosso laboratório por Detoni e colaboradores (2015).

A atividade fosfohidrolítica da NTPDase 1 purificada de promastigotas de *L. infantum* foi testada por colorimetria usando o recorte de gel contendo a proteína. O meio de reação usado para a identificação da banda ativa em gel não-desnaturante contém alta concentração de cálcio (10 mM) e substrato (5 mM), o que favorece a visualização de depósitos de fosfato de cálcio a medida que ocorre a hidrólise de nucleotídeos. Este meio de reação foi também usado para os testes colorimétricos, e foi verificado que a hidrólise de ATP ou ADP foi significativamente aumentada com o acréscimo do C12E9, resultando em uma razão de atividade ATPásica/ADPásica de 1,5. Estes resultados confirmaram a potencialidade do C12E9 para a manutenção da NTPDase 1 deste parasito em sua conformação nativa. Alguns membros da família das NTPDases são regulados por diferentes estágios de oligomerização que afetam os níveis de atividade catalítica e a preferência por nucleosídeos di- ou trifosfatados, e entre as alterações promovidas por detergentes esta pode ser uma delas (KIKUCHI et al., 2001; GUEVARA-FLORES et al., 2008; MUNKONDA et al., 2009; KNOWLES, 2011).

Em pH 7,4, as concentrações 10 mM de cálcio e 5 mM de ATP (ou ADP) favorecem a formação de aproximadamente 4,8 mM de complexo íon-nucleotídeo (Ca-ATP) estável, um possível substrato de isoformas de NTPDases de parasitos (GUEVARA-FLORES et al., 2008), deixando 5,2 mM de Ca^{2+} e 0,2 mM de ATP livres, o que foi calculado por um programa de computador apropriado para a quantificação preditiva de íons e nucleotídeos livres em condições fisiológicas (SCHOENMAKERS et al., 1992).

Tem sido demonstrado que a ligação antígeno-anticorpo é dependente de pH e força iônica (KAMATA et al., 1996). Estudos bioquímicos e estruturais revelaram que anticorpos podem ter um sítio de ligação para metal, e requerem Ca^{2+} para o reconhecimento do antígeno (ZHOU et al., 2005), mas em alta concentração molar (1 a 10 mM) pode ter um efeito inibitório nesta ligação antígeno-anticorpo (BECK et al., 2007).

Essas referências nos alertaram quanto a uma possível variação dos resultados em nossos ensaios que associam as propriedades imunológicas e a atividade NTPDásica. Para descartar possíveis interferências na ligação antígeno-anticorpo, em nosso laboratório é usado um meio de reação padrão contendo 1 mM de CaCl_2 e 3 mM de ATP ou ADP para ensaios de imunoprecipitação ou inibição de atividade enzimática por anticorpos (COIMBRA et al., 2002; REZENDE-SOARES et al., 2010; MAIA et al., 2011; PORCINO et al., 2012). Para determinar o quanto este meio de reação pode afetar a atividade enzimática, ele foi também usado para as medidas de atividade da proteína pura, na presença ou ausência de C12E9. Novamente, a presença de C12E9 favoreceu significativamente a atividade catalítica da enzima. Comparado ao meio de reação contendo 10 mM de CaCl_2 e 5 mM de ATP ou ADP, a atividade ADPásica foi similar, enquanto a atividade ATPásica teve uma redução de aproximadamente 40%, sem afetar, no entanto, a razão da atividade ATPásica/ADPásica, que foi de 1,1. O meio de reação contendo 1 mM de CaCl_2 e 3 mM de ATP ou ADP contém aproximadamente 900 μM de Ca-ATP e 100 μM de Ca^{2+} e 2,1 mM de ATP livres. Essa condição aparentemente contém o complexo íon-nucleotídeo em uma concentração micromolar maior do que a proteína pura é capaz de hidrolisar e, adicionalmente, uma menor concentração de Ca^{2+} livre que nos permite acessar a atividade da NTPDase 1 em ensaios bioquímicos e imunológicos. A razão da atividade ATPásica/ADPásica de 1,1 encontrada nessa condição é

possivelmente resultante da NTPDase 1 de *L. infantum* na sua forma nativa, e mais próxima das condições *in vivo*, uma vez que razão similar foi encontrada previamente em ensaios usando homogeneizado total de promastigotas (MAIA, 2010). Esses resultados nos permitiram estabelecer o meio de reação padrão para os ensaios subsequentes.

Recentemente, Vasconcellos e colaboradores (2014) obtiveram um recombinante ativo derivado do ectodomínio de uma isoforma de NTPDase (rLic-NTPDase-2; r41-425) de *L. infantum* cepa M2682, com 99,7% de identidade com a ATPDase anotada no genoma de *L. infantum* cepa JPCM5 (Gene ID 5067729; 47 kDa; PEACOCK et al., 2007), a mesma proteína que usamos neste trabalho como referência. Este recombinante, na presença de Ca^{+2} , apresentou atividade ATPásica ($10 \text{ nmol Pi} \times \mu\text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) e ADPásica ($24 \text{ nmol Pi} \times \mu\text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) com valores de mesma ordem de grandeza da atividade estimada para a NTPDase nativa pura (ATP, $12 \text{ nmol Pi} \times \mu\text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$; ADP, $10 \text{ nmol Pi} \times \mu\text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) quando o meio de reação contendo 1 mM de CaCl_2 e 3 mM de substrato foi usado. Portanto, por meio de estratégias diferentes, a obtenção de NTPDase 1 nativa aqui mostrada, ou em sua forma recombinante (VASCONCELLOS et al., 2014) confirmou a expressão desta proteína no parasito.

A antigenicidade da NTPDase 1 pura foi avaliada por “Western blots” usando soros de cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral, os quais foram capazes de reagir com as bandas de 50 e 47 kDa. A soropositividade (~43%) de IgG destes animais para os peptídeos LbB1LJ e LbB2LJ em ELISA, um resultado similar àquele encontrado quando r-potDomínio B foi usado como antígeno (MAIA, 2010), confirmaram a antigenicidade do domínio B conservado da NTPDase de *L. infantum*.

Adicionalmente, os anticorpos anti-LbB1LJ e anti-LbB2LJ, de alta sensibilidade e afinidade, inibiram quase totalmente (93%) as atividade ATPásica (92-99%) e ADPásica (87-92%) da NTPDase 1 de *L. infantum*, sugerindo que esta região é essencial à manutenção de estrutura organizacional, e que o seu bloqueio por anticorpos reduz a capacidade catalítica da proteína.

Inibidores específicos não têm sido encontrados para as isoformas de NTPDase (KNOWLES, 2011), e anticorpos contra cada uma delas têm sido aplicados em estudos

da função dos membros dessa família de proteínas. Como já relatado na literatura, anticorpos monoclonais foram capazes de inibir quase totalmente as atividades ATPásica e ADPásica de isoformas de NTPDase (NTPase) de *T. gondii*, e ainda distinguir cepas virulentas e avirulentas deste parasito (KIKUCHI et al., 2001). Além disso, a atividade enzimática da isoforma NTPase 2 e a replicação de taquizoítos em células hospedeiras infectadas foram significativamente inibidas por anticorpos monoclonais, sugerindo que anticorpos contra essa enzima poderiam ter um efeito de proteção contra a infecção por *T. gondii* (TAN et al., 2010). Anticorpos policlonais contra um recombinante da NTPDase 1 de *T. cruzi* inibiram significativamente (50%) a infectividade de tripomastigotas *in vitro* (SANTOS et al., 2009; MARIOTINI-MOURA et al., 2014). O bloqueio de NTPDases de *L. infantum* com anticorpos anti-NTPDases reduziu o nível de adesão de parasitos e a taxa de infecção de macrófagos (VASCONCELLOS et al., 2014). Em mamíferos, anticorpos monoclonais produzidos contra a NTPDase 3 de células das ilhotas de Langerhans de pâncreas humano foram capazes de inibir de 60 a 90% da atividade enzimática dependendo das condições experimentais usadas, e os resultados sugeriram a relevância desses anticorpos para o estudo de secreção de insulina (MUNKONDA et al., 2009).

Em nosso laboratório, o uso dos peptídeos sintéticos derivados dos domínios B da apirase de batata e de parasitos, e os anticorpos produzidos contra eles, deram suporte à demonstração da conservação e funcionalidade do domínio B antigênico de isoformas de NTPDases de *S. mansoni*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (REZENDE-SOARES et al., 2010; MENDES et al., 2011; MAIA et al., 2011; PORCINO et al., 2012; DETONI et al., 2013). A antigenicidade do domínio B e o potencial poder inibitório dos anticorpos também apontam para a utilidade destas novas biomoléculas em imunização contra a leishmaniose visceral e/ou como componentes de imunoterápicos.

Recentemente, este conjunto de dados foi publicado (MAIA et al., 2013), sendo este o primeiro trabalho na literatura relatando a expressão da NTPDase 1 de *L. infantum*.

6 CONCLUSÕES

1. Análises *in silico* permitiram observar altas porcentagens de identidade e similaridade entre as sequências primárias de domínio B da apirase de batata e de NTPDases de diferentes espécies de *Leishmania*, confirmando o compartilhamento de epitopos e o uso de anticorpos produzidos contra r-potDomínio B ou peptídeos sintéticos em estudos da NTPDase 1 de *L. infantum*;
2. A NTPDase 1 de promastigotas de *L. infantum* foi purificada por eletroforese em gel não desnaturante, o que resultou em banda única com atividade hidrolítica para nucleosídeos di- e trifosfatados sob ativação de íons bivalentes, como observado *in situ* e por método colorimétrico. Sua identidade foi confirmada pela reatividade com anticorpos policlonais anti-apirase de batata, anti-Lb1LJ, anti-LbB2LJ ou anti-r-potDomínio B, e por espectrometria de massas. A reatividade da NTPDase 1 pura com soros de cães infectados com *L. infantum* demonstrou a sua antigenicidade;
3. O domínio B da NTPDase 1 de *L. infantum* é antigênico, como observado pela alta soropositividade de soros de cães com leishmaniose visceral para os peptídeos sintéticos LbB1LJ e LbB2LJ, representantes das porções N- e C-terminal deste domínio;
4. A NTPDase 1 foi localizada em membrana plasmática, flagelo, núcleo e cinetoplasto de promastigotas e, também, em amastigotas intracelulares;
5. Anticorpos produzidos contra o domínio B foram aptos a inibir a atividade enzimática da NTPDase 1 e, também, a proliferação de promastigotas *in vitro*. Além disso, anticorpos IgG1 e/ou IgG2 de soros de cães saudáveis ou com leishmaniose visceral classificados em assintomáticos, oligossintomáticos e/ou sintomáticos foram reativos com os peptídeos sintéticos potB1LJ, potB2LJ,

LbB1LJ e LbB2LJ. Estes resultados, em conjunto, geraram indícios de que o domínio B tem propriedades imunomodulatórias, e que a indução de anticorpos inibitórios contra esta porção da proteína pode ser útil na formulação de vacinas ou imunoterápicos;

6. A susceptibilidade da NTPDase 1 a compostos sintéticos foi evidenciada pela inibição parcial de sua atividade hidrolítica em preparação de promastigotas por pentamidina e, também, pelos ácidos alquilaminoalcanotiosulfúricos (IBSS, NPSO, SIPA), sendo estes últimos de baixa citotoxicidade para células de mamíferos e mostrados pela primeira vez como leishmanicidas. A inibição da NTPDase 1 pura por pentamidina ou NPSO confirmou ser esta proteína um novo alvo a ser explorado visando novas terapias contra a leishmaniose visceral;

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBEELE, J.V.D.; CALJON, G.; RIDDER, K.D.; BAETSELIER, P.D.; COOSEMANS, M. 2010. *Trypanosoma brucei* modifies the tsetse salivary composition, altering the fly feeding behavior that favors parasite transmission. **PLoS Pathogens**, **6**: 1-9.

AGALLOU M.; SMIRLIS D.; SOTERIADOU K.P.; KARAGOUNI E. 2012. Vaccination with *Leishmania* histone H1-pulsed dendritic cells confers protection in murine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, **30**: 5086-5093.

ANDERSEN, J.F; HINNEBUSCH, B.J.; LUCAS, D.A; CONRADS, T.P.; VEENSTRA, T.D.; PHAM, V.M; RIBEIRO, J.M.C. 2007. An insight into the sialome of the oriental rat flea, *Xenopsylla cheopis* (Rots). **BMC Genomics**, **8**: 102-119.

ANDREOTTI, R.; GOMES, A.; MALAVAZI-PIZA, K.C.; TANAKA, A.S. 2002. Controle do carrapato por meio de vacina - situação atual e perspectivas. Publicação da Embrapa Gado de Corte, 58 p. ISSN 1517-3747.

ARAÚJO, M.S.; DE ANDRADE, R.A.; SATHLER-AVELAR, R.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ANDRADE, M.C.; VIANNA, L.R.; MAYRINK, W.; REIS, A.B.; MALAQUIAS, L.C.; MELLO, M.N.; MARTINS-FILHO, O.A. 2009. T-cell-derived cytokines, nitric oxide production by peripheral blood monocytes and seric anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG subclass patterns following immunization against canine visceral leishmaniasis using Leishvaccine and Leishmune. **Vaccine**, **27(7)**: 1008-17.

ARNOLD, K.; BORDOLI, L.; KOPP, J.; SCHWEDE, T. 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, **22(2)**: 195-201.

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.

ASL, A.S.; SHARIF, M.; MOHEBALI, M.; ZAREI, Z.; BABALOO, Z.; AKHOUNDI, B. 2013. Evaluation of canine anti-*Leishmania* IgG subclasses and their relation with skin

signs in naturally infected dogs in the northwest of Iran. **Turk J Vet Anim Sci**, **37**: 512-515.

BARBIÉRI, C.L. 2006. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, **28(7)**: 329-337.

BARROS, F.S.; DE MENEZES, L.F.; PINHEIRO, A. A.; SILVA, E.F.; LOPES, A.H.; DE SOUZA, W.; MEYER-FERNANDES, J.R. 2000. Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in *Entamoeba histolytica*. **Archives Biochemistry and Biophysics**, **375**: 304-314.

BELKAID, Y.; BALNK, R.B.; SUFFIA, I. 2006. Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. **Immunol Rev.**, **212**: 287-300.

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.

BENTLEY, A.A.; MERKULOV, S.M.; PENG, Y.; ROZMARYNOWYCZ, R.; QI, X.; PUSZTAI-CAREY, M.; MERRICK, W.C.; YEE, V.C.; MCCRAE, K.R.; KOMAR, A.A. 2012. Chimeric glutathione S-transferases containing inserts of kininogen peptides. Potential novel protein therapeutics. **The Journal of Biological Chemistry**, **287**: 22142–22150.

BIDAISEE, S.; MACPHERSON, N.L.C. 2014. Zoonoses and One Health: A Review of the Literature. **Journal of Parasitology Research**, Article ID 874345, 8 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/874345>

BOUKLI, N.M.; DELGADO, B.; RICAURTE, M.; ESPINO, S.M. 2011. *Fasciola hepatica* and *Schistosoma mansoni*: identification of common proteins by comparative proteomic analysis. **Journal of Parasitology**, **97**: 852–861.

BOULANGER, D.; WARTER, A.; SELLIN, B.; LINDNER, V.; PIERCE, R.J.; CHIPPAUX, J.P.; CAPRON, A. 1999. Vaccine potential of a recombinant glutathione S-transferase cloned from *Schistosoma haematobium* in primates experimentally infected with a homologous challenge. **Vaccine**, **17**: 319–326.

BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, **72**: 248-254.

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

CARDOSO, M.J.L.; MACHADO, L.H.A.; MELUSSI, M.; ZAMARIAN, T.P., CARNIELLI, C.M.; FERREIRA Jr., J.M.C. 2011. Dermatopatias em cães: revisão de 257 casos. **Archives of Veterinary Science**, **16**: 66-74.

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.

CARVALHO, J.A.; TEIXEIRA, S.R.F.; CARVALHO, M.P.; VIEIRA, V.; ALVES, F.A. 2009. Doenças Emergentes: uma Análise Sobre a Relação do Homem com o seu Ambiente. **Revista Práxis**, **I(1)**: 19-23.

CHAVÉZ-FUMAGALLI, M.A.; MARTINS, V.T.; TETASICCA, M.C.S.; LAGE, D.P.; COSTA, L.E.; LAGE, P.S.; DUARTE, M.C.; KER, H.G.; RIBEIRO, T.G.; CARVALHO, F.A.A.; RÉGIS, W.C.B.; REIS, A.B.; TAVARES, C.A.P.; SOTO, M.; FERNANDES, A.P.; COELHO, E.A.F. 2013. Sensitive and Specific Serodiagnosis of *Leishmania infantum* Infection in Dogs by Using Peptides Selected from Hypothetical Proteins Identified by an Immunoproteomic Approach. **Clinical and Vaccine Immunology**, **20(6)**: 835–841.

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)**: 327-335.

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 (2)**: 137-143.

CUNHA, R.C.; ANDREOTTI, R.; GARCIA, M.V.; AGUIRRE, A.A.R.; LEITÃO, A. 2013. Calculation of the efficacy of vaccines against tick infestations on cattle. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, **22**: 571-578.

DA COSTA, A.V.; GAUBERT, S.; LAFITTE, S.; FONTAINE, J.; CAPRON, A.; GRZYCH, J.M. 1999. Egg-hatching inhibition in mice immunized with recombinant *Schistosoma bovis* 28kDa glutathione S-transferase. **Parasite Immunology**, **21**: 341–350.

DANTAS-TORRES, F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BANETH, G.; RIBEIRO, V.M.; DE PAIVA-CVALCANTI, M.; OTRANTO, D. 2012. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends Parasitol.** **28(12)**:531-8.

DANTAS-TORRES, F. 2009. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites & Vectors**, **2(1)**: S1-9.

DE AGUIAR MATOS, J. A.; BORGES, F.P.; TASCA, T.; BOGO, M.R.; DE CARLI, G.A.; DA GRACA FAUTH, M.; DIAS, R.D.; BONAN, C.D. 2001. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. **International Journal for Parasitology**, **31**: 770–775.

DE JESUS, J. B.; DE SA PINHEIRO, A.A.; LOPES, A.H.; MEYER-FERNANDES, J.R. 2002. An ectonucleotide ATP-diphosphohydrolase activity in *Trichomonas vaginalis* stimulated by galactose and its possible role in virulence. **Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences**, **57**: 890–896.

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 SOUZA, R.F.; DOS SANTOS, Y.L.; DE SOUZA VASCONCELLOS, R.; BORGES-PEREIRA, L.; CALDAS, I.S.; DE ALMEIDA, M.R.; BAHIA, M.T.; FIETTO, J.L. 2013. Recombinant *Leishmania (Leishmania) infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase NTPDase-2 as a new antigen in canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Acta Trop.**, **125(1)**: 60-6.

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. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **106**: 23–31.

DENTON, H.; MCGREGOR, J.C.; COOMBS, G.H. 2004. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. **Biochem J.**, **381(Pt 2)**: 405-12.

DEPLAZES, P.; SMITH, N.C; ARNOLD, P.; LUTZ, H.; ECKERT, J. 1995. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite Immunol.**, **17(9)**:451-8.

DETONI, M.L. 2015. **Caracterização molecular e imunológica da nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase 1) de *Leishmania amazonensis* e de seu Domínio B**. Tese de Doutorado Acadêmica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

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 Res.**, **112(8)**: 2773-82.

DOMINGOS, A.; ANTUNES, S.; BORGES, L.; ROSÁRIO, V.E. 2013. Approaches towards tick and tick-borne diseases control. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **46**: 265-269.

DUNNE, D.W.; COOKE, A. 2005. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. **Nature Reviews Immunology**, **5**: 420-426.

EGUÍA-AGUILAR, P.; CRUZ-REYES, A.; MARTÍNEZ-MAYA, J.J. 2005. Ecological analysis and description of the intestinal helminthes present in dogs in Mexico City. **Veterinary Parasitology**, **127**: 139-146.

FARIA-PINTO P.; MENDES, R.G.P.R.; CARVALHO-CAMPOS, C.; MAIA, A.C.R.G.; OLIVEIRA, A.A.; COELHO, P. M. Z.; VASCONCELOS, E. G. 2010b. Detection of IgG1 and IgG4 subtypes reactive against potato apyrase in schistosomiasis patients. 2010b. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, *in press*, **105 (4)**.

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 whit *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase isoforms, in acute and chronically infected mice, after chemotherapy and reinfection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, *in press*, **105 (4)**.

FARIA-PINTO, P.; REZENDE-SOARES, F.A.; MOLICA, A.M.; MONTESANO, M.A.; MARQUES, M.J.; ROCHA, M.O.; GOMES, J.Á.; 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)**: 943-953.

FARIA-PINTO, P.; MEIRELLES, M.N.; LENZI, H.L.; MOTA, E.M.; PENIDO, M.L.; COELHO, P.M.; 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 (1)**: 359-363.

FARIA-PINTO, P.; MEIRELLES, M.N.; LENZI, H.L.; MOTA, E.M.; PENIDO, M.L.; COELHO, P.M.; VASCONCELOS, E.G. 2004. ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni* egg: characterization and immunocytochemical localization of a new antigen. **Parasitology**, **129 (1)**: 51-57.

FIETTO, J.L.; DEMARCO, R.; NASCIMENTO, I.P.; CASTRO, I.M.; CARVALHO, T.M.; DE SOUZA, W.; BAHIA, M.T.; ALVES, M.J.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. 2004. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemistry Biophysical Research Communications**, **316 (2)**: 454-60.

FINNEY, D.J. Statistical method in Biological Assay. Academic Press, London, 508p., 1978.

FOLGUEIRA, C.; MARTÍNEZ-BONET, M.; REQUENA, J.M. 2010. The Leishmania infantum PUF proteins are targets of the humoral response during visceral leishmaniasis. **BMC Res Notes**, **3**:13.

FONSECA, R.R.; JOHNSON, W.E.; O'BRIEN, S.J.; VASCONCELOS, V.; ANTUNES, A. 2010. Molecular evolution and the role of oxidative stress in the expansion and

functional diversification of cytosolic glutathione transferases. **BMC Evolutionary Biology** **10**: 281 <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/10/281>

FREITAS, J.C.C.; LOPES-NETO, B.E.; ABREU, C.R.A.; COURA-VITAL, W.; BRAGA, S.L.; REIS, A.B.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S. 2012. Profile of anti-Leishmania antibodies related to clinical picture in canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, **93**: 705–709.

FUJIWARA, R.T.; VALE, A.M.; FRANÇA DA SILVA, J.C.; DA COSTA, R.T.; QUETZ, J. DA S.; MARTINS FILHO, O.A.; REIS, A.B.; CORRÊA OLIVEIRA, R.; MACHADO-COELHO, G.L.; BUENO, L.L.; BETHONY, J.M.; FRANK, G.; NASCIMENTO, E.; GENARO, O.; MAYRINK, W.; REED, S.; CAMPOS-NETO, A. 2005. Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmSTI1) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. **Vet Res.**, **36(5-6)**: 827-38.

FUNADA, M.R.; PENA, H.F.J.; SOARES, R.M.; AMAKU, M.; GENNARI, S.M. 2007. Freqüência de parasitos gastrintestinais em cães e gatos atendidos em hospital-escola veterinário da cidade de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, **59**: 1338-1340.

FURLONG, J.; SALES, R.O. 2007. Controle estratégico de carrapatos no bovino de leite: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, **1**: 44–72.

FYFE, P.K.; WESTROP, G.D.; SILVA, A.M.; COOMBS, G.H.; HUNTER, W.N. 2012. Leishmania TDR1 structure, a unique trimeric glutathione transferase capable of deglutathionylation and antimonial prodrug activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **109**: 11693-11698.

GAUCI, C.; MERLI, M.; MULLER, V.; CHOW, C.; YAGI, K.; MACKENSTEDT, U.; LIGHTOWLERS, M.W. 2002. Molecular cloning of a vaccine antigen against infection with the larval stage of *Echinococcus multilocularis*. **Infection and Immunity**, **70**: 3969–3972.

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**:229-45.

GERRERO, F.D.; MILLER, R.J.; LEON, A.A.P. 2012. Cattle tick vaccines: Many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge? **International Journal for Parasitology**, **42**: 421-427.

GIAROLA, N.L.L.; SILVEIRA, T.S.; INACIO, J.D.F.; VIEIRA, L.P.; ALMEIDA-AMARAL, E.E.; MEYER-FERNANDES, J.R. 2014. *Leishmania amazonensis*: Increase in ecto-ATPase activity and parasite burden of vinblastine-resistant protozoa. **Experimental Parasitology**, **146**: 25-33.

GRUBHOFER, N.A. 2008. Vaccine adjuvants revisited. **The Open Veterinary Science Journal**, **2**: 63-67.

GUEVARA-FLORES, A.; OLVERA-SÁNCHEZ, S.; GÓMEZ-CONCHA, C.; JUÁREZ, 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*. **Mol Biochem Parasitol.**, **162(2)**:123-33.

HALDAR, K.; KAMOUN, S.; HILLER, N.L.; BHATTACHARJE, S.; VAN, O.O.I.J. C. 2006. Common infection strategies of pathogenic eukaryotes. **Nature Reviews Microbiology**, **4**: 922-931.

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)**: 916-923.

HAYES, J.D.; FLANAGAN, J.U.; JOWSEY, I.R. 2005. Glutathione transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, **45**: 51–88.

HIGÓN, M.; COWAN, G.; NAUSCH, N.; CAVANAGH, D.; OLEAGA, A.; TOLEDO, R.; STOTHARD, J.R.; ANTÚNEZ, O.; MARCILLA, A.; BURCHMORE R.; MUTAPI, F. 2011. Screening trematodes for novel intervention targets: a proteomic and immunological comparison of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma bovis* and *Echinostoma caproni*. **Parasitology**, **138**: 1607–1619.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P. 2008. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, **31**: 1170-1179.

INIESTA, L.; GÁLLEGO, M.; PORTÚS, M. 2007. Idiotypic expression of IgG1 and IgG2 in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Vet Immunol Immunopathol.**, **119(3-4)**:189-97.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, **96**: 23-28.

KAMATA, N.; ENOMOTO, A.; ISHIDA, S.; NAKAMURA, K.; KURISAKI, J.I.; KAMINOGAWA, S. 1996. Comparison of pH and ionic strength dependence of interactions between monoclonal antibodies and bovine β -lactoglobulin. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, **60**:25-9.

KAMHAWI, S.; BELKAID, Y.; MODI, G.; ROWTON, E.; SACKS, D. 2001. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. **Science**, **290**: 1351-1354.

KAPLAN, W.; HUSLER, P.; KLUMP, H.; ERHARDT, J.; SLUIS-CREMER, N.; DIRR, H. 1997. Conformational stability of pGEX-expressed *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase: a detoxification enzyme and fusion-protein affinity tag. **Protein Science**, **6**: 399–406.

KATAGIRI, S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G. 2007. Zoonoses causadas por parasitas intestinais de cães e o problema do diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico**, **74**: 175-184.

KEDZIERSKI, L.; ZHU, Y.; HANDMAN, E. 2006. *Leishmania* vaccines: progress and problems. **Parasitology**, **133 Suppl**: S87-112.

KIEFER, F.; ARNOLD, K.; KÜNZLI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. 2009. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. **Nucleic Acids Research.**, **37**: D387-D392.

KIKUCHI, T.; NAGATA, T.; FURUTA, T. 2001. Production and characterization of a monoclonal antibody against nucleoside triphosphate hydrolase from *Toxoplasma gondii*. **J Eukaryot Microbiol.**, **Suppl**:195S-196S.

KNOWLES, A.F.; 2011. The GDA1_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. **Purinergic Signal.**, **7(1)**: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.

KUMAR, R.; ENGWERDA, C. 2014. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clinical & Translational Immunology**, **3**: e13.

KYNGDON, C.T.; GAUCI, C.G.; GONZALEZ, A.E.; FLISSER, A.; ZOLI, A.; READ, A.J.; MARTÍNEZ-OCANA, J.; STRUGNELL, R.A.; LIGHTOWLERS, M.W. 2006. Antibody responses and epitope specificities to the *Taenia solium* cysticercosis vaccines TSOL18 and TSOL45-1A. **Parasite Immunology**, **28**: 191–199.

LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophages T4. **Nature**, **227**: 680-685.

LAVAZEC, C.; BOURGOUIN, C. 2008. Mosquito-based transmission blocking vaccines for interrupting Plasmodium development. **Microbes and Infection**, **10**: 845-849

LEITE, P.M.; GOMES, R.S.; FIGUEIREDO, A.B.; SERAFOM, T.D.; TAFURI, W.L.; SOUZA, C.C.; MOURE, S.A.L.; FIETTO, J.L.R.; MELO, M.N., RIBEIRO-DIAS, F.; OLIVEIRA, M.A.P.; 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.

LIU J.L., FONTAINE, J., CAPRON, A., GRZYCH, J.M. 1997. Ultrastructural localization of Sm28 GST protective antigen in *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitology**, **113**: 377-391.

LÓPEZ-MONTEON, A.; RAMOS-LIGONIO, A.; PÉREZ-CASTILLO, L.; TALAMÁS-ROHANA, P.; ROSALES-ENCINA, J. L. 2003. Specific antibody immune response against the parasitic portion of a glutathione-S-transferase fusion protein. **FASEB Journal**, **17**: 621–627.

LOSADA, S.; CHACON, N.; COLMENARES, C.; BERMUDEZ, H.; LORENZO A.; POINTIER, J.P.; THERON, A.; ALARCON, D.E.; NOYA, B.; NOYA, O. 2005.

Schistosoma: Cross-reactivity and antigenic community among different species. **Experimental Parasitology**, **111**: 182–190.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological 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. **J Med Chem**. **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. **Parasitol Int.**, **62(1)**: 44-52.

MAIA, A.C.; 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.; ESTANISLAU, J.A.; 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. **Dev Comp Immunol.**, **35(10)**: 1059-67.

MAIA, A.C.R.G. 2010. **Identificação de um domínio conservado e antigênico de ATP difosfohidrolases de parasitos, também presente em uma isoforma ativa de *Leishmania (L.) chagasi***. Dissertação Acadêmica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

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. **J Pharmacol Exp Ther.**, **305(1)**: 9-16.

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-DA-SILVA, E.A.; DE OLIVEIRA, J.C.; FIGUEIREDO, A.B.; DE SOUZA LIMA, J.D.; CARNEIRO, C.M.; 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.

MARTINS, J.C.; CAMPOS, A.; OSÓRIO, H.; FONSECA, R.; VASCONCELOS, V. 2014. Proteomic profiling of cytosolic glutathione transferases from three bivalve species: *Corbicula fluminea*, *Mytilus galloprovincialis* and *Anodonta cygnea*. **International Journal of Molecular Sciences**, **15**: 1887-1900.

MASER, P.; WITTLIN, S.; ROTTMANN, M.; WENZLER, T.; KAISER, M.; BRUN, R. 2012. Antiparasitic agents: new drugs on the horizon. **Current Opinion in Pharmacology**, **12**:562–566.

MASINA, S.; GICHERU, M.M.; DEMOTZ, S.O.; FASEL, N.J. 2003. Protection against cutaneous leishmaniasis in outbred Vervet Monkeys, using a recombinant Histone-1 antigen. **Journal of Infections Diseases**, **188**: 1250-1257.

McCALL, L.I.; ZHANG, W.W.; MATLASHEWSKI, G. 2013. Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. **PLoS**, **9(1)**: e1003053.

MCMANUS, D.P.; DALTON, J.P. 2006. Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. **Parasitology**, **133**: S43–S61.

McTIGUE, M.A.; WILLIAMS, D.R.; TAINER, J.A. 1995. Crystal structure of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. **Journal of Molecular Biology**, **246**: 21–27.

MENDES, R.G.; 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.; 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) and immunolocalisation of this protein in the *Schistosoma mansoni* egg. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **106(7)**: 808-13.

MENDES, R.G.P.R.; GUSMÃO, M.A.N.G.; MAIA, A.C.R.G.; DETONI, M.L.; PORCINO, G.N.; SOARES, T.V.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.J.; COELHO, P.M.; 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) and immunolocalization of this protein in the *Schistosoma mansoni* egg. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **106**: 808-813.

MENDES, R.G.P. 2010. **Identificação de alvos antigênicos na ATP difosfohidrolase solúvel de *Schistosoma mansoni* e possível aplicação funcional de peptídeos sintéticos**. Dissertação acadêmica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, 155p.

MEYER FERNANDES, J.R; CONSENTINO-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.

MERINO, O.; ALBERDI, P.; LASTRA, J.M.P.; FUENTE, J. 2013. Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Vol. 3; artigo 30, doi: 10.3389/fcimb.2013.00030.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral**, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Manual de Leishmaniose Visceral Recomendações clínicas para redução da letalidade**, 2011.

MODICA-NAPOLITANO, J.S.; APRILLE, J.R. 2001. Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells. **Adv Drug Deliv Rev.**; **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. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **101**: 385-390.

MORENO, J.; VOULDOUKIS, I.; SCHREIBER, P.; MARTIN, V.; MCGAHIE, D.; GUEGUEN, S.; CUISINIER, A.M. 2014. Primary vaccination with the LiESP/QA-21

vaccine (CaniLeish) produces a cell-mediated immune response which is still present 1 year later. **Vet Immunol Immunopathol.**,**158(3-4)**: 199-207.

MORENO, J.; ALVAR, J. 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitology**, **18 (9)**: 399-405.

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

MOTA, E.F.; LIMA, M.G.S.; MELO, D.F. 2006. Adjuvantes imunológicos: avanços e perspectivas. **CIÊNCIA ANIMAL**, **16(2)**: 79-88.

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. **Bioorg Med Chem Lett.**, **16(23)**: 5943-7.

MUNKONDA, M.N.; PELLETIER, J.; IVANENKOV, V.V.; FAUSTHER, M.; TREMBLAY, A.; KUNZLI, B.; KIRLEY, T.L.; SEVIGNY, J. 2009. Characterization of a monoclonal antibody as the first specific inhibitor of human NTP diphosphohydrolase-3 Partial characterization of the inhibitory epitope and potential applications. **FEBS Journal**, **276**:479–496.

MUTISO, J.M.; MACHARIA, J.C.; KIIO, M.N.; ICHAGICHU, J.M.; RIKOI, H.; GICHERU, M.M. 2013. Development of Leishmania vaccines: predicting the future from past and present experience. **The Journal of Biomedical Research**, **27(2)**: 85-102.

NAKAJIMA-NAKANO, K.; MAKIOKA, A.; YMASHITA, N.; MATSUO, N.; ASAI, T. 2000. Evaluation of serodiagnosis of toxoplasmosis by using the recombinant nucleoside triphosphate hydrolase isoforms expressed in *Escherichia coli*. **Parasitol. Int.**, **48(3)**: 215-22.

NETO, R.G.T.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; VITOR, R.W.A.; COURA-VITAL, W.; QUARESMA, P.F.; KER, H.G.; MELO, L.A.; GONTIJO, C.M.F.; REIS, A.B. 2010. Relationship of Leishmania-specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, **3-4(169)**: 248-257.

NIETO, C.G; GÁRCIA-ALONSO, M.; REQUENA, J.M.; MIRÓN, C.; SOTO, M.; ALONSO, C.; NAVARRETE, I. 1999. Analysis of the humoral immune response against

total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, **67(2)**:117-30.

OLIVEIRA, J.M.; FERNANDES, A.C.; DORVAL, M.E.C.; ALVES, T.P.; FERNANDES, T.D.; OSHIRO, E.T.; OLIVEIRA, A.L.L. 2010. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Rev. Soc. Bras. Med. Tropical**, **43(2)**: 188-193.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (World Health Organization/WHO). **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases**, Geneva, 22-26, 2010.

PACHECO, R.C.; MORAES-FILHO, J.; GUEDES, E.; SILVEIRA, I.; RICHTZENHAIN, L.J.; LEITE, R.C.; LABRUNA, M.B. 2011. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Med Vet Entomol.**, **25(2)**: 148-55.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; DAY, M.J. 2011. One Health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, **4**:197.

PARIZI, L.F.; RECK, J.Jr.; OLDIGES, D.P.; GUIZZO, M.G.; SEIXAS, A.; LOGULLO, C.; DE OLIVEIRA, P.L.; TERMIGNONI, C.; MARTINS, J.R.; DA SILVA VAZ, I.Jr. 2012b. Multi-antigenic vaccine against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: a field evaluation. **Vaccine**, **30**: 6912-6917.

PARIZI, L.F.; GITHAKA, N.W.; LOGULLO, C.; KONNAI, S.; MASUDA, A.; OHASHI, K.; DA SILVA VAZ, I.Jr. 2012a. The quest for a universal vaccine against ticks: cross-immunity insights. **Veterinary Journal**, **194**: 158-165.

PARIZI, L.F.; UTIUMI, K.U.; IMAMURA, S.; ONUMA, M.; OHASHI, K.; MASUDA, A.; DA SILVA VAZ, I.Jr. 2011. Cross immunity with *Haemaphysalis longicornis* glutathione S-transferase reduces an experimental *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. **Experimental Parasitology**, **127**: 113-118.

PARIZI, L.F.; POHL, P.C.; MASUDA, A.; DA SILVA VAZ, I.Jr. 2009. New approaches toward anti-*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick vaccine. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** **18**: 1-7.

PAZ, G.F.; LEITE, R.C.; OLIVEIRA, P.R. 2008. Controle de *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) (ACARI: IXODIDAE) no canil da escola de veterinária da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, **17**: 41-44.

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.; 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**(7): 839-847.

PEITSCH, M. C. 1995. Protein modeling by E-mail **Bio/Technology** **13**: 658-660.

PEIXOTO, H.M.; DE OLIVEIRA, M.R.; ROMERO, G.A. 2015. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Trop. Med. Int. Health**, **20**(3): 334-52.

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.O.; RESENDE, D.M.; VIANELLO, M. A.; BORDIN, F.H.S.; JACINTO, A.A.; DIAS, W. D.; MONTESANO M. Â.; 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** (1-3): 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. **Mem. Inst. 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. **Mem. Inst. 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 Braz. Chemistry Soc.** 1: 35-39.

PETTERSEN, E.F.; GODDARD, T.D.; HUANG, C.C.; COUCH, G.S.; GREENBLATT, D.M.; MENG, E.C.; FERRIN, T.E. 2004. UCSF Chimera- a visualization system for exploratory research and analysis. **J Comput Chem.**, 25:1605-12.

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.

PINHEIRO, I.O.; CASTRO, M.F.; GONÇALVES, M.; LIMA A.C.; CAMPOS, G.M.M.; MITTEROFHE, A.; GUIMARÃES, R.J.P.S.; FILHO, J.D.A.; COIMBRA, E.S. 2014. First inventory of the sandfly fauna (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in the municipality of Juiz de Fora, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 47(1): 97-100.

PORCINO, G.N. 2014. **Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase 1) de *Leishmania braziliensis* como um novo alvo terapêutico: imunolocalização em formas promastigotas e amastigotas e susceptibilidade a leishmanicidas.** Qualificação da Tese de Doutorado Acadêmica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

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. **Exp Parasitol.**, 132(2): 293-9.

POZZO, G.D.; MASCOLO, D.; PRISCO, A.; BARBA, P.; ANZISI, A., GUARDIOLA, J. 2003. Lack of patent liver autoimmunity after breakage of tolerance in a mouse model. **International Immunology**, **15**: 1173-1181.

PREYAVICHYAPUGDEE, N.; SAHAPHONG, S.; RIENGROJPITAK, S.; GRAMS, R.; VIYANANT, V.; SOBHON, P. 2008. *Fasciola gigantica* and *Schistosoma mansoni*: Vaccine potential of recombinant glutathione S-transferase (rFgGST26) against infections in mice. **Experimental Parasitology**, **119**: 229–237.

PURCELL, A.W.; MCCLUSKEY, J.; ROSSJOHN, J. 2007. More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. **Nature Reviews Drug Discovery**, **6 (5)**: 404-414.

REIS, A.B; GIUNCHETTI, R.C; CARRILLO, E.; MARTINS-FILHO, O.A.; MORENO, J. 2010. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, **26**: 341-349.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, A.O.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W.L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. 2009. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, **128 (1-3)**: 87-95.

REIS, A.B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A.M.; MARQUES, M.J.; GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GUERRA, L.L.; ANDRADE, R.A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. 2006. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology Immunopathology**, **112 (3-4)**: 102-116.

REQUENA, J.M.; IBORRA, S.; CARRIÓN, J.; ALONSO, C.; SOTO, M. 2004. Recent advances in vaccines for leishmaniasis. **Expert Opin Biol Ther.**, **4(9)**: 1505-17.

REQUENA, J.M.; ALONSO, C.; SOTO, M. 2000. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. **Parasitology Today**, **16 (6)**: 246-250.

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)**: 773-783.

ROBSON, S. C.; SEVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, **2**: 409-430.

RODRIGUES, D.f.; DAEMON, E.; RODRIGUES, A.F.S.F. 2008. Caracterização da população de ectoparasitos em cães de núcleos de expansão urbana de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, **17 (4)**: 185-188.

RODRIGUES, A. F. S. F.; D'AGOSTO, M.; DAEMON, E. 2002. *Babesia canis* (Piana & Galli-Valerio, 1895) (Apicomplexa: Babesiidae) em cães de rua do Município de Juiz de Fora, MG. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, **24(1)**: 17-21.

ROMERO, G.A.S.; BOELAERT, M. 2010 January. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A. Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, **4 (1)**: e584.

ROTHEL, J.S.; WOOD, P.R.; SEOW, H.F.; LIGHTOWLERS, M.W. 1997. Urea/DTT solubilization of a recombinant *Taenia ovis* antigen, 45W, expressed as a GST fusion protein results in enhanced protective immune response to the 45W moiety. **Vaccine**, **15**: 469–472.

SANSOM, F.M.; RALTON, J.E.; SERNEE, M.F.; COHEN, A.M.; HOOKER, D.J.; HARTLAND, E.L.; NADERER, T.; MCCONVILLE, M.J. 2014. Golgi-located NTPDase1 of *Leishmania major* is required for lipophosphoglycan elongation and normal lesion development whereas secreted NTPDase2 is dispensable for virulence. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, **8(12)**: e3402.

SANSOM, 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.S.; BASTOS, M.S.; GUEDES, P.M.M.; ALMEIDA, M.R.; DEMARCO, R.; VERJOVSKI-ALMEIDA. S.; BAHIA, M.T.; FIETTO, J.L.R. 2009. Influence of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase Activity on *Trypanosoma cruzi* Infectivity and Virulence. **PLoS**, **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. **J Cell Sci.**, **93 (Pt 3)**: 481-9.

SARIDOMICHELAKIS, M.N. 2009. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. **Veterinary Dermatology**, **(5-6)**: 471-489.

SCHIMMING, B.C; PINTO E SILVA, J.R.C. 2012. Leishmaniose visceral canina – revisão de literatura. **Rev. Cient. Eletr. de Medicina Veterinária**, **n19**.

SCHOENMAKERS, T.J.; VISSER, G.J.; FLIK, G.; THEUVENET, A.P. 1992. Chelator: an improved method for computing metal ion concentrations in physiological solutions. **BioTechniques**, **12(870-4)**: 876-9.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Anal. Chem.**, **68(5)**: 850-8.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R.K. 2012. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, **485-497**.

SEIXAS, A.; OLIVEIRA, P.; TERMIGNONI, C.; LOGULLO, C.; MASUDA, A.; DA SILVA VAZ, I.Jr. 2012. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo proteins as target for tick vaccine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, **15**: 148-156.

SEXTON, J.L.; WILCE, M.C.; COLIN, T.; WIJFFELS, G.L.; SALVATORE, L.; FEIL, S.; PARKER, M.W.; SPITHILL, T.W.; MORRISON, C.A. 1994. Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with glutathione S-transferase. Identification and mapping of antibody epitopes on a threedimensional model of the antigen. **Journal of Immunology**, **152**: 1861–1872.

SILVA, A.M.; TAVARES, J.; SILVESTRE, R.; OUAISSI, A.; COOMBS, G.H.; CORDEIRO-DA-SILVA, A. 2012. Characterization of *Leishmania infantum* thiol-dependent reductase 1 and evaluation of its potential to induce immune protection. **Parasite Immunology**, **34**: 345–350.

SILVA-GOMES NL, ENNES-VIDAL V, CAROLO JCF, BATISTA MM, SOEIRO MN,

MENNA-BARRETO R, MOREIRA OC. 2014. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase1 (TcNTPDase-1) gene expression. Is increased due to heat shock and in infective forms of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite & Vectors**, **7**:463-468.

SMITH, D.F.; PEACOCK, C.S.; CRUZ, A.K. 2007. Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. **International Journal for Parasitology**, **37(11)**: 1173-1186.

SMITH, T.F.; WATERMAN, M.S. 1981. Overlapping genes and information theory. **Journal of Theoretical Biology**, **91**: 379-380.

SOARES-BEZERRA, R.J.; LEON, L. ; GENESTRA, M. 2004. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: Moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**, **40(2)**: 139-149.

SOARES, A.O; SOUZA, A.D.; FELICIANO, E.A.; RODRIGUES, A.F.S.F.; D'AGOSTO, M.; DAEMON, E. 2006. Avaliação ectoparasitológica e hemoparasitológica em cães criados em apartamentos e casas com quintal na cidade de Juiz de Fora, MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, **(15)1**: 13-16.

SOEIRO, M.N.C.; WERBOVETZ, K.; BOYKIN, D.W.; WILSON, W.D.; WANG, M.Z.; HEMPHILL, A. 2013. Novel amidines and analogues as promising agents against intracellular parasites: a systematic review. **Parasitol.**; **140 (8)**.

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**.

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.

TASCA, T.; BONAN, C.D.; DE CARLI, G.A.; SARKIS, J.J. 2004. *Trichomonas vaginalis*: cytochemical localization of a NTPDase1 and an ecto-5'-nucleotidase and effects of adenine nucleotides on cellular viability. **Parasitology Research**, **93 (4)**: 300-303.

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

TESTASICCA, M.C.; DOS SANTOS, M.S.; MACHADO, L.M.; SERUFO, A.V.; DORO, D.; AVELAR, D.; TIBÚRCIO, A.M.; ABRANTES, C.F.; MACHADO-COELHO, G.L.; GRIMALDI, G.JR; GAZZINELLI, R.T.; FERNANDES, A.P. 2014. Antibody responses induced by Leish-Tec®, an A2-based vaccine for visceral leishmaniasis, in a heterogeneous canine population. **Vet Parasitol.**, **204(3-4)**: 169-76.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** **22**: 4673-4680.

TORRES, C.R.; VASCONCELOS, E.G.; FERREIRA, S.T.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. 1998. Divalent cation dependence and inhibition of *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase by Fluorosulfonyl benzoyl adenosine. **European Journal Biochemistry**, **251**: 516-521.

TORRES-RIVERA, A.; LANDA, A. 2008. Glutathione transferases from parasites: a biochemical view. **Acta Tropica**, **105**: 99–112.

TSAI, I.J.; ZAROWIECKI, M.; HOLROYD, N.; GARCIARRUBIO, A.; SANCHEZ-FLORES, A.; BROOKS, K.L.; TRACEY, A.; BOBES, R.J.; FRAGOSO, G.; SCIUTTO, E.; ASLETT, M.; BEASLEY, H.; BENNETT, H.M.; CAI, J.; CAMICIA, F.; CLARK, R.; CUCHER, M.; DE SILVA, N.; DAY, T.A.; DEPLAZES, P.; ESTRADA, K.; FERNÁNDEZ, C.; HOLLAND, P.W.; HOU, J.; HU, S.; HUCKVALE, T.; HUNG, S.S.; KAMENETZKY, L.; KEANE, J.A.; KISS, F.; KOZIOL, U.; LAMBERT, O.; LIU, K.; LUO, X.; LUO, Y.; MACCHIAROLI, N.; NICHOL, S.; PAPS, J.; PARKINSON, J.; POUCHKINA-STANTCHEVA, N.; RIDDIFORD, N.; ROSENZVIT, M.; SALINAS, G.; WASMUTH, J.D.; ZAMANIAN, M.; ZHENG, Y.; *Taenia solium* Genome Consortium; CAI, X.; SOBERÓN, X.; OLSON, P.D.; LACLETTE, J.P.; BREHM, K.; BERRIMAN, M. 2013. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. **Nature**, **496**: 57-63.

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.

VASCONCELLOS, R.S.; MARIOTINI-MOURA, C.; GOMES, R.S.; SERAFIM, T.D.; FIRMINO, R.C.; SILVA E BASTOS, M.; CASTRO, F.F.; OLIVEIRA, C.M.; BORGES-PEREIRA, L.; DE SOUZA, A.C.; DE SOUZA, R.F.; GÓMEZ, G.A.; PINHEIRO, A.C.; MACIEL, T.E.; SILVA-JÚNIOR, A.; BRESSAN, G.C.; ALMEIDA, M.R.; BAQUI, M.M.; AFONSO, L.C.; FIETTO, J.L. 2014. Leishmania infantum ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is an apyrase involved in macrophage infection and expressed in infected dogs. **PLoS Negl Trop Dis.**, 8(11): e3309.

VEERAPATHRAN, A.; DAKSHINAMOORTHY, G.; GNANASEKAR, M.; REDDY, M.V.; KALYANASUNDARAM, R. 2009. Evaluation of Wuchereria bancrofti GST as a vaccine candidate for lymphatic filariasis. **PLoS Negl Trop Dis.**, 3(6): e457.

WEI, F.; ZHAI, Y.; JIN, H.; SHANG, L.; MEN, J.; LIN, J.; FU, Z.; SHI, Y.; ZHU, X.Q.; GAO, H. 2010. Development and immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing Sj26GST and SjFABP from *Schistosoma japonicum*. **Vaccine**, 28: 5161-5166.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. 2002. **Proteomics in Practice: a laboratory manual of proteome analysis**. 3. ed. Wiley-VHC Verlag-GmbH: Weinheim, 293 p.

WOOLLARD, D.J.; GAUCI, C.G.; HEATH, D.D.; LIGHTOWLERS, M.W. 1998. Epitope specificities and antibody responses to the EG95 hydatid vaccine. **Parasite Immunology**, **20**: 535–540.

WU, Z.; LIU, S.; ZHANG, S.; TONG, H.; GAO, Z.; LIU, Y.; LIN, D.; LIU, Z.; GUOCHANG, W.; YI, H.; SONG, G.; XU, Y. 2004. Persistence of the protective immunity to *Schistosoma japonicum* in Chinese yellow cattle induced by recombinant 26 kDa glutathione-S-transferase (reSjc26GST). **Veterinary Parasitology**, **123**: 167–177.

YIP, Y.L.; SMITH, G.; WARD, R.L. 2001. Comparison of phage pIII, pVIII and GST as carrier proteins for peptide immunisation in Balb/c mice. **Immunology Letters**, **79**: 197-202.

ZHAN, B.; PERALLY, S.; BROPHY, P.M.; XUE, J.; GOUD, G.; LIU, S.; DEUMIC, V.; DE OLIVEIRA, L.M.; BETHONY, J.; BOTTAZZI, M.E.; JIANG, D.; GILLESPIE, P.; XIAO, S.H.; GUPTA, R.; LOUKAS, A.; RANJIT, N.; LUSTIGMAN, S.; OKSOV, Y.; HOTEZ, P. 2010. Molecular cloning, biochemical characterization, and partial protective immunity of the heme-binding glutathione S-transferases from the human hookworm *Necator americanus*. **Infection and Immunity**, **78**: 1552-1563.

ZHAN, B.; LIU, S.; PERALLY, S.; XUE, J.; FUJIWARA, R.; BROPHY, P.; XIAO, S.; LIU, Y.; FENG, J.; WILLIAMSON, A.; WANG, Y.; BUENO, L.L.; MENDEZ, S.; GOUD, G.; BETHONY, J.M.; HAWDON, J.M.; LOUKAS, A.; JONES, K.; HOTEZ, P.J. 2005. Biochemical characterization and vaccine potential of a heme-binding glutathione transferase from the adult hookworm *Ancylostoma caninum*. **Infection and Immunity**, **73**: 6903-6911.

ZHONG-DAO, W.; ZHI-YUE, L.; XIN-BING, Y. 2005. Development of a vaccine against *Schistosoma japonicum* in China: a review. **Acta Tropica**, **96**: 106–116.

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 of the United States of America**, **102**: 14575-80.

ZIMMERMANN, H. 2000. Extracellular hydrolysis of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's*. **Archives of Pharmacology**, **362**: 299-309.