

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Instituto de Ciências Biológicas

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E IMUNOLÓGICA DA  
NUCLEOSÍDEO TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASE (NTPDASE 1) DE  
*Leishmania amazonensis* E DE SEU DOMÍNIO B**

**Michelle de Lima Detoni**

Juiz de Fora  
2015

**MICHELLE DE LIMA DETONI**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E IMUNOLÓGICA DA  
NUCLEOSÍDEO TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASE (NTPDASE 1) DE  
*Leishmania amazonensis* E DE SEU DOMÍNIO B**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética e Biotecnologia) da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito à obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Eveline Gomes Vasconcelos**

Juiz de Fora

2015

### FICHA CATALOGRÁFICA

DETONI, Michelle de Lima

Caracterização molecular e imunológica da Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase (NTPDase 1) de *Leishmania amazonensis* e de seu domínio B / Michelle de Lima Detoni. - - 2015.

163 p.

Orientadora: Dra. Eveline Gomes Vasconcelos

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2015.

1. apirase. 2. domínio B. 3. leishmaniose. 4. antigenicidade. 5. proteínas SUMO. I. Vasconcelos, Eveline Gomes, orient.

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E IMUNOLÓGICA DA NUCLEOSÍDEO  
TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASE (NTPDASE 1) DE *Leishmania*  
*amazonensis* E DE SEU DOMÍNIO B**

**MICHELLE DE LIMA DETONI**

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.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Banca examinadora:

---

**Profa. Dra. Eveline Gomes Vasconcelos**  
Universidade Federal de Juiz de Fora  
(Orientadora)

---

**Dra. Suzana Côrte-Real Faria**  
Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ  
(Membro externo)

---

**Dra. Tânia Zaverucha do Valle**  
Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ  
(Membro externo)

---

**Prof. Dra. Priscila de Faria Pinto**  
Universidade Federal de Juiz de Fora  
(Membro interno)

---

**Profa. Dra. Sônia Maria Neumann Cupolilo**  
Universidade Federal de Juiz de Fora  
(Membro interno)

Agradeço, primeiramente, aos Órgãos de Fomento e Instituições de Pesquisa que propiciaram a realização deste trabalho: CAPES, CNPQ, FAPEMIG, Instituto Butantan/SP, IOC-FIOCRUZ/RJ, LNBio-CNPEM, UFJF, UNIFAL.

Agradeço especialmente à minha orientadora, Dra. Eveline Gomes Vasconcelos, e aos Pesquisadores Colaboradores, que tornaram viável a execução de técnicas tão variadas durante realização deste trabalho:

Dra. Celeste da Silva Freitas Souza (Lab. Imunomodulação, IOC- FIOCRUZ/RJ)

Dr. Daniel C. Pimenta (Lab. Espectrometria de Massas, Instituto Butantan-SP)

Dr. Marcelo de Oliveira Santos (Depto Biologia, UFJF-MG)

Dr. Marcos José Marques (Depto Biologia, UNIFAL-MG)

Dra. Melissa Regina Fessel (CNPEM, Campinas-SP)

Dra. Priscila de Faria Pinto (Depto Bioquímica, UFJF-MG)

Dra. Sônia Maria Neumman Cupolilo (Depto Patologia, UFJF-MG)

Dra. Suzana Côrte-Real (Lab. Biologia Estrutural, IOC- FIOCRUZ/RJ)

Dr. Sylvio Celso Gonçalves da Costa (Lab. Imunomodulação, IOC- FIOCRUZ/RJ)

Dra. Tânia Zaverucha do Vale (Lab. Imunomodulação, IOC-FIOCRUZ/RJ)

Adicionalmente, agradeço e dedico estes escritos a todos aqueles que me ajudaram ao longo deste estudo. Não importando a forma: material, intelectual, emocional ou espiritual.

Nem importando os nomes!

## RESUMO

Por análises *in silico*, um domínio B conservado e antigênico foi previamente identificado em nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases) de plantas e parasitos. O r-potDomB, um recombinante derivado do domínio B (r78-117) da apirase de batata, foi obtido por expressão heteróloga, e a sua reatividade com anticorpos policlonais anti-apirase de batata confirmaram a existência de epitopos indutores de resposta imune humoral em mamíferos. A clonagem do gene da NTPDase1 de *Leishmania amazonensis* (LamNTPDase1; NCBI: AFJ22627.1) e as análises *in silico* reforçaram a hipótese de conservação do domínio B de NTPDases. O r-potDomB, os peptídeos sintéticos LbB1LJ e LbB2LJ derivados do domínio B de NTPDase1 de *Leishmania*, e os anticorpos produzidos contra estas biomoléculas, foram usados como ferramentas moleculares para estudos específicos da NTPDase1 de *L. amazonensis* e da leishmaniose. Por “Western blots”, a NTPDase1 foi identificada como bandas de 48 e 63 kDa em frações de membrana, microsomal e flagelo de promastigotas. Por análise imunocitoquímica ultraestrutural, os anticorpos localizaram a NTPDase1 na superfície de membrana plasmática, núcleo, mitocôndria e cinetoplasto, bolsa flagelar e flagelo, confirmando sua ampla distribuição neste parasito. Análises *in silico* sugeriram as possíveis modificações pós-traducionais da NTPDase1, incluindo a sua conjugação com proteína SUMO. Os polipeptídeos de 48 e 63 kDa e um co-migrante de 12 kDa foram isolados de promastigotas por eletroforese em gel não-desnaturante. Por “Western blots” e espectrometria de massas, a identidade da NTPDase1 foi confirmada nos polipeptídeos de 48 e 63 kDa. Por espectrometria de massas, o polipeptídeo de 12 kDa foi identificado como pertencente à família de proteínas SUMO e, também, adicionado ao polipeptídeo de 63 kDa. Os polipeptídeos de 63 kDa e 12 kDa, mas não o de 48 kDa, foram reconhecidos em “Western blots” pelo soro imune anti-SUMO1, sugerindo a ligação entre NTPDase1 e SUMO, uma modificação descrita pela primeira vez entre os membros da família das NTPDases. Camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas, e os anticorpos destes animais reconheceram a NTPDase1 pura, mas não SUMO, confirmando sua antigenicidade. Durante a progressão da doença, alta reatividade entre r-potDomB, LbB1LJ ou LbB2LJ e anticorpos IgG2a dos camundongos infectados foi observada aos 40 dias pós-infecção, revelando a antigenicidade do domínio B e a sua habilidade de induzir a produção deste subtipo nos estágios iniciais da doença. A reatividade de IgG1 foi significativamente maior aos 90-120 dias pós-infecção, coincidindo com o estágio mais ativo da doença, sugerindo participação do domínio em eventos imunoregulatórios. O r-potDomB induziu reação de hipersensibilidade tardia em camundongos Suíços, uma resposta imune celular, com elevação concomitante dos níveis de IgG2a e IFN- $\gamma$ . O r-potDomB, na ausência de adjuvante, usado na pré-imunização de camundongos Suíços infectados com amastigotas, estimulou a produção de IgG2a e IFN- $\gamma$ , e promoveu proteção parcial contra a progressão da leishmaniose como observado por medida de edema de patas e análises histopatológicas. Os resultados estimulam o aproveitamento biotecnológico do r-potDomB, ou derivados desta biomolécula, em formulações e em protocolos experimentais de imunoterapia e/ou vacinação contra leishmanioses.

**Palavras chave:** apirase; SUMO; domínio B; leishmaniose; antigenicidade.

## ABSTRACT

By *in silico* analysis, an antigenic conserved B domain was previously identified within nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) of plants and parasites. The r-potDomB, a recombinant belonging to the conserved B domain (r78-117) from the potato apyrase, was obtained by heterologous expression, and its reactivity with polyclonal anti-potato apyrase antibodies confirmed the existence of epitopes which induce humoral immune response in mammalian. The cloning of the gene from the *Leishmania amazonensis* NTPDase 1 (*Lam*NTPDase1; NCBI AFJ22627.1) and *in silico* analysis reinforced the hypothesis of B-domain conservation within NTPDases. The r-potDomB, synthetic peptides LbB1LJ and LbB2LJ derived from the B-domain from *Leishmania* NTPDase 1, and the antibodies raised against these biomolecules, were used as molecular tools for specific studies of the *L. amazonensis* NTPDase 1 and leishmaniasis. By Western blots, the NTPDase 1 was identified as bands of 48 and 63 kDa in membrane, microsomal and flagellar fractions of promastigotes. By ultrastructural immunocytochemical, the antibodies localized the NTPDase 1 at the surface of plasma membrane, nucleus, mitochondria and kinetoplast, at flagellar pocket and flagellum, confirming its widespread distribution in this parasite. *In silico* analysis suggested possible post-translational modifications of the NTPDase 1, including its conjugation with SUMO protein. The polypeptides of 48 and 63 kDa and one co-migrant of 12 kDa were isolated of promastigotes by non-denaturing gel electrophoresis. By Western blots and mass spectrometry, the identity of NTPDase1 in the polypeptides of 48 e 63 kDa was confirmed. By mass spectrometry, the polypeptide of 12 kDa was identified belonging to the SUMO protein family and, also, added to the polypeptide of 63 kDa. The polypeptides of 63 and 12 kDa, but not 48 kDa, were recognized in Western blots by immune serum anti-SUMO1, suggesting binding between NTPDase 1 and SUMO, a modification described for the first time among members of the NTPDase family. BALB/c mice were infected with promastigotes, and the antibodies from these animals recognized the pure NTPDase, but not SUMO, confirming its antigenicity. During disease progression, high reactivity between r-potDomB, LbB1LJ or LbB2LJ and IgG2a antibodies of the promastigote-infected mice was observed at 40 days post-infection, revealing both the B-domain antigenicity and its ability for induce the production of this subtype in early disease stages. The IgG1 reactivity was significantly higher at 90-120 days post-infection, coinciding with the most active stage of the disease, suggesting participation of the domain in immunoregulatory events. The r-potDomB induced delayed type-hypersensitivity reaction in Swiss mice, a cellular immune response, with a concomitant increase in the levels of IgG2a and IFN- $\gamma$ . The r-potDomB, in the absence of adjuvant, used in pre-immunization of amastigotes-infected Swiss mice, stimulated the production of IgG2a and IFN- $\gamma$ , and promoted partial protection against leishmaniasis progression, as observed by measuring of footpad swelling and histopathological analysis. The results stimulate biotechnological use of the r-potDomB, or derivatives of this biomolecule, in formulations and experimental protocols of immunotherapy and/or vaccination against leishmaniasis.

**Keywords:** apyrase; SUMO; B-domain; leishmaniasis; antigenicity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO

<b>Figura I.</b> Epidemiologia da leishmaniose .....	<b>26</b>
<b>Figura II.</b> Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> sp. ....	<b>28</b>
<b>Figura III.</b> Espectro dos diferentes tipos clínicos de leishmaniose .....	<b>29</b>
<b>Figura IV.</b> Taxonomia do gênero <i>Leishmania</i> .....	<b>31</b>
<b>Figura V.</b> Terceira geração de vacinas contra leishmaniose .....	<b>34</b>

### MATERIAL E MÉTODOS

<b>Figura VI.</b> Plasmídeo sintético utilizado para a expressão do r-potDomB em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) .....	<b>40</b>
<b>Figura VII.</b> Vetor de clonagem (TA Cloning® Kit Dual Promoter; pCR®II) .....	<b>47</b>
<b>FIGURA VIII.</b> Reação de hipersensibilidade tardia com r-potDomB associada ao BCG .....	<b>59</b>
<b>FIGURA IX.</b> Protocolo de proteção contra <i>L. amazonensis</i> utilizando r-potDomB associado ao BCG .....	<b>61</b>

### RESULTADOS

<b>Figura 1.</b> Expressão do r-potDomB em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) em distintas condições .....	<b>65</b>
<b>Figura 2.</b> Purificação de r-potDomB por cromatografia de afinidade .....	<b>66</b>
<b>Figura 3.</b> Expressão e purificação de r-potDomB .....	<b>67</b>
<b>Figura 4.</b> Amplificação e clonagem da NTPDase 1 de <i>L. amazonensis</i> .....	<b>69</b>
<b>Figura 5.</b> Sequência gênica codificadora da NTPDase 1 de <i>L. amazonensis</i> ....	<b>70</b>
<b>Figura 6.</b> Sequências nucleotídicas de NTPDases 1 de <i>Leishmania</i> spp. ....	<b>71</b>
<b>Figura 7.</b> Alinhamento de NTPDases 1 de <i>Leishmania</i> spp. ....	<b>72</b>



<b>Figura 8.</b> Análise das regiões conservadas entre a apirase de batata e a NTPDase 1 de <i>L. amazonensis</i> .....	<b>74</b>
<b>Figura 9.</b> Estudo estrutural da NTPDase 1 de <i>L. amazonensis</i> .....	<b>75</b>
<b>Figura 10.</b> Identificação da NTPDase 1 em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .	<b>77</b>
<b>Figura 11.</b> Localização da NTPDase 1 em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> por microscopia eletrônica usando anti-r-potDomB .....	<b>78</b>
<b>Figura 12.</b> Localização da NTPDase 1 em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> por microscopia eletrônica usando soros anti-LbB1LJ e anti-LbB2LJ .....	<b>79</b>
<b>Figura 13.</b> Identificação da NTPDase 1 e proteína SUMO de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	<b>82</b>
<b>Figura 14.</b> Identificação da NTPDase 1 de <i>L. amazonensis</i> por espectrometria de massas (MS/MS) .....	<b>84</b>
<b>Figura 15.</b> Identificação da SUMO de <i>L. amazonensis</i> por espectrometria de massas (MS/MS) .....	<b>86</b>
<b>Figura 16.</b> Cinética do edema formado no coxim-plantar de camundongos BALB/c infectados com $10^6$ promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	<b>87</b>
<b>Figura 17.</b> Reatividade de anticorpos com r-potDomB, LbB1LJ ou LbB2LJ durante a progressão da doença em camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	<b>89</b>
<b>Figura 18.</b> Reação de hipersensibilidade tardia, após desafio com r-potDomB .	<b>91</b>
<b>Figura 19.</b> Reação de hipersensibilidade tardia, após desafio com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	<b>93</b>
<b>Figura 20.</b> Progressão da leishmaniose em camundongos Suíços infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> após imunização com r-potDomB, associado ou não à pré-imunização com BCG .....	<b>95</b>
<b>Figura 21.</b> Coxim plantar de camundongos Suíços infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> após imunização com r-potDomB, associado ou não à pré-imunização com BCG, após 90 dias de infecção.....	<b>99</b>
<b>Figura 22.</b> Linfonodo poplíteo de camundongos Suíços infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> após imunização com r-potDomB, associado ou não à pré-imunização com BCG, após 90 dias de infecção.....	<b>100</b>

## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO

<b>Tabela I.</b> Quimioterápicos usados para tratamento da leishmaniose .....	<b>32</b>
-------------------------------------------------------------------------------	-----------

### MATERIAL E MÉTODOS

<b>Tabela II.</b> Programas para análise <i>in silico</i> de modificações pós-traducionais.	<b>54</b>
---------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

<b>Tabela 1.</b> Avaliação de cultura de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformada com r-potDomB sob distintas condições .....	<b>64</b>
<b>Tabela 2.</b> Análises preditivas de modificação pós-traducional na NTPDase 1 de <i>L. amazonensis</i> .....	<b>81</b>

## ABREVIATURAS E SIGLAS

°C.....	graus Celsius
µg.....	micrograma
µl.....	microlitro
µm.....	micrômetro
µM.....	micromolar
ACR.....	Região Conservada da Apirase
ADP.....	difosfato de adenosina
AMP.....	monofosfato de adenosina
ATP.....	trifosfato de adenosina
BCG.....	Cepa de <i>Mycobacterium bovis</i>
CaCl <sub>2</sub> .....	cloreto de cálcio
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	cloreto de cálcio di-hidratado
D.O.....	densidade ótica
DMSO.....	dimetil sulfóxido
DNA.....	ácido desoxirribonucleico
dNTP.....	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DOC.....	deoxicolato de sódio
DP.....	desvio padrão
EDTA.....	ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM.....	erro padrão da média
ESI.....	espectro de massas
FF.....	fração de flagelo de <i>L. amazonensis</i>
Fm.....	fração microsomal de <i>L. amazonensis</i>
gDNA.....	ácido desoxirribonucleico genômico
h.....	hora
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	peróxido de hidrogênio
HCl.....	ácido clorídrico
HIV.....	vírus da imunodeficiência humana
HR.....	reação de hipersensibilidade tardia
HT.....	homogeneizado total de <i>L. amazonensis</i>

IFN $\gamma$ .....	Interferon gama
IgG.....	isotipo de anticorpo
IL.....	Interleucina
IPTG.....	isopropil-tio- $\beta$ -D-galactopiranosídeo
KCl.....	cloreto de potássio
kDNA.....	ácido desoxirribonucleico mitocondrial
M.....	molar
MF.....	fração de membrana de <i>L. amazonensis</i>
mg.....	miligrama
MgCl <sub>2</sub> .....	cloreto de magnésio
min.....	minuto
ml.....	mililitro
mM.....	milimolar
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O.....	cloreto de mangânes tetra-hidratado
NaCl.....	cloreto de sódio
NAD <sup>+</sup> .....	dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NaHCO <sub>3</sub> .....	bicarbonato de sódio
NCBI.....	Centro Nacional de Informação Biotecnológica
ng.....	nanograma
NH <sub>4</sub> Cl.....	cloreto de amônia
nm.....	nanômetro
NTP.....	nucleosídeo trifosfato
NTPDase.....	nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
OPD.....	ortofenilenodiamino
PAGE.....	eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS.....	tampão fosfato-salino
pH.....	potencial hidrogeniônico
PIPES.....	piperazina-1,4-bis (ácido 2-etanosulfônico)
PMSF.....	fluoreto de fenilmetilsulfonil
PTM.....	modificações pós-traducionais
reg.....	regulatórias
RNA.....	ácido ribonucléico
rpm.....	rotações por minuto
RPMI.....	Meio de cultura de células animais desenvolvido pelo Instituto Roswell Park Memorial
r-potDomB.....	Recombinante do domínio B da apirase de batata (r78-117; NCBI U58597.1) com cauda hexa-his
s.....	segundo

SDS.....dodecil sulfato de sódio  
SUMO.....Small ubiquitin-related modifier  
Tris.....tris-hidroximetil-aminometano  
UDP.....difosfato de uridina  
V.....Volts  
W.....Watts  
WHO.....Organização Mundial de Saúde  
X-gal.....5-bromo-4-cloro-3-indol- -D-galactopiranosídeo

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo A.</b> Carta de Aprovação pelo Comitê de ética.....	132
<b>Anexo B.</b> Depósito da sequência da NTPDase 1 de <i>L. amazonensis</i> no NCBI .....	133
<b>Anexo C.</b> Maia ACRG, Detoni ML, Porcino GN, Soares TV, Gusmão MAN, Fessel MR, Marques MJ, Souza MA, Coelho PMZ, Estanislau JASG, Rocha MOC, Santos MO, Faria-Pinto P, Vasconcelos EG. 2011. Occurrence of a conserved domain in ATP diphosphohydrolases from pathogenic organisms associated to antigenicity in human parasitic diseases. <i>Developmental &amp; Comparative Immunology</i> , 35: 1057-1065.....	134
<b>Anexo D.</b> Detoni ML, Fessel MR, Maia ACRG, Porcino GN, Quellis LR, Faria-Pinto P, Marques MJ, Juliano MA, Juliano LJ, Diniz VA, Côrte-Real S, Gonçalves-da-Costa SC, Souza CS, Vasconcelos EG. 2013. An antigenic domain of the <i>Leishmania amazonensis</i> nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is associated with disease progression in susceptible infected mice. <i>Parasitology Research</i> , 112 (8): 2773-2782.....	144
<b>Anexo E.</b> Espectros da identificação da NTPDase 1 de <i>L. amazonensis</i> .....	155
<b>Anexo F.</b> Espectros da identificação da SUMO de <i>L. amazonensis</i> .....	159
<b>Anexo G.</b> Produção bibliográfica adicional obtida durante o doutorado.....	161

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1	NTPDases .....	17
1.2	APIRASE DE BATATA E O DOMÍNIO B DAS PROTEÍNAS DESTA PLANTA E DOS PARASITOS COMO FERRAMENTA NO ESTUDO DAS NTPDases .....	21
1.3	LEISHMANIOSE .....	24
1.4	LEISHMANIOSE CAUSADA POR <i>L. amazonensis</i> .....	35
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	37
2.1	OBJETIVOS GERAIS .....	37
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	39
3.1	OBTENÇÃO DO r-potDomB .....	39
3.1.1	Vetor de Expressão .....	39
3.1.2	Transformação da <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) .....	39
3.1.3	Expressão do polipeptídeo recombinante r-potDomB .....	41
3.1.4	Purificação do polipeptídeo recombinante r-potDomB .....	42
3.2	CLONAGEM DA NTPDase 1 DE <i>L. amazonensis</i> .....	44
3.2.1	Extração do DNA genômico .....	44
3.2.2	Reação em cadeia da polimerase .....	45
3.2.3	Análises <i>in silico</i> .....	48
3.3	LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA NTPDase 1 DE <i>L. amazonensis</i> .....	48
3.3.1	Fracionamento de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	48
3.3.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS, e “Western blots” ....	49
3.3.3	Imunolocalização da NTPDase 1 de <i>L. amazonensis</i> por microscopia eletrônica .....	50
3.4	IDENTIFICAÇÃO DA NTPDase 1 DE <i>L. amazonensis</i> POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS E ESTUDO DE SUA MODIFICAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL .....	51
3.4.1	Fracionamento e identificação da NTPDase 1 .....	51
3.4.1.1	Gel de Poliacrilamida não-desnaturante .....	51
3.4.1.2	SDS-PAGE e <i>Western blots</i> .....	52
3.4.1.3	Espectrometria de massas .....	53
3.4.2	Análises <i>in silico</i> de modificação pós-traducional da NTPDase 1	54

	de <i>L. amazonensis</i> .....	
3.4.3	Sumoilação da NTPDase 1 de <i>L. amazonensis</i> .....	55
3.4.3.1	Análises <i>in silico</i> .....	55
3.4.3.2	Identificação da SUMO de <i>L. amazonensis</i> por espectrometria de massas .....	55
3.4.3.3	Identificação da SUMO de <i>L. amazonensis</i> por <i>Western blots</i> .....	55
3.5	AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE ANTICORPOS COM O DOMÍNIO B DURANTE A PROGRESSÃO DA INFECÇÃO EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM <i>L. amazonensis</i> .....	56
3.5.1	Animais e protocolos de infecção .....	56
3.5.2	Análise de anticorpos por ELISA .....	56
3.6	ANÁLISE DO POTENCIAL IMUNOGÊNICO DO r-potDomB EM TESTES DE PROTEÇÃO CONTRA <i>L. amazonensis</i> .....	57
3.6.1	Animais e Parasitos .....	57
3.6.2	Avaliação da habilidade do r-potDomB induzir reação de hipersensibilidade tardia (HR) .....	58
3.6.3	Avaliação do potencial imunológico do r-potDomB em protocolos de proteção contra <i>L. amazonensis</i> .....	60
3.6.4	Quantificação de anticorpos por ELISA .....	61
3.6.5	Cultura de linfócitos e quantificação de citocinas .....	62
3.6.6	Análise Histológica .....	63
4	<b>RESULTADOS</b> .....	64
4.1	OBTENÇÃO DO POLIPEPTÍDEO RECOMBINANTE r-potDomB .	64
4.2	CLONAGEM E ANÁLISES <i>IN SILICO</i> DA NTPDase 1 DE <i>L. amazonensis</i> .....	68
4.3	IDENTIFICAÇÃO E LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA NTPDase 1 DE <i>L. amazonensis</i> .....	76
4.4	ESTUDOS <i>IN SILICO</i> DE MODIFICAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL DA NTPDase 1 DE <i>L. amazonensis</i> E IDENTIFICAÇÃO DA CONJUGAÇÃO DESTA PROTEÍNA COM SUMO .....	80
4.4.1	Análises <i>in silico</i> de modificação pós-traducional da NTPDase 1 de <i>L. amazonensis</i> .....	80
4.4.2	Isolamento e Identificação da NTPDase 1 e SUMO de <i>L. amazonensis</i> por <i>Western blots</i> e espectrometria de massas .....	81
4.5	O DOMÍNIO B DA NTPDase 1 DE <i>L. amazonensis</i> ESTÁ ASSOCIADO A PROGRESSÃO DA LEISHMANIOSE .....	87
4.6	ANÁLISE DO POTENCIAL IMUNOLÓGICO DO r-potDomB EM TESTES DE PROTEÇÃO CONTRA <i>L. amazonensis</i>	90
4.6.1	Avaliação da habilidade do r-potDomB induzir reação de hipersensibilidade tardia (HR).....	90



4.6.2	Avaliação da habilidade do r-potDomB induzir proteção contra a progressão da leishmaniose experimental .....	94
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	101
5.1	O POLIPEPTÍDEO RECOMBINANTE r-potDomB: UMA NOVA FERRAMENTA PARA O ESTUDO DE NTPDases .....	101
5.2	A NTPDase 1 DE <i>L. amazonensis</i> É ALTAMENTE CONSERVADA ENTRE AS DIFERENTES ESPÉCIES DE LEISHMANIA, E SEU DOMÍNIO B É DE ALTA IDENTIDADE COM SUA CONTRAPARTE DA APIRASE DE BATATA .....	103
5.3	A NTPDase 1 DE <i>L. amazonensis</i> É ECTO-LOCALIZADA E TEM DISTRIBUIÇÃO CELULAR UBÍQUA .....	105
5.4	A NTPDase 1 DE <i>L. amazonensis</i> É SUMOILADA .....	107
5.5	O DOMÍNIO B DA NTPDase 1 DE <i>L. amazonensis</i> ESTÁ ASSOCIADO À PROGRESSÃO DA LEISHMANIOSE .....	110
5.6	O RECOMBINANTE r-potDomB É UMA BIOMOLÉCULA COM PROPRIEDADES VACINAIS E/OU IMUNOTERAPÊUTICAS .....	112
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	116
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	118
8	<b>ANEXOS</b> .....	132

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 NTPDases**

Os nucleotídeos, além de sua função energética, possuem importante função como sinalizadores em diversos organismos, provavelmente desde os primórdios onde sua disponibilidade como substrato regulava a síntese da primeira molécula a transmitir a informação gênica, o RNA (ALBERTS *et al.*, 2006). Seus principais representantes, os nucleotídeos de adenina, possuem distribuição ubíqua, estando presentes em todos os organismos, tecidos e tipos celulares, não havendo segregação anatômica (BURNSTOCK e VERKHRATSKY, 2009). Adicionalmente, os níveis intracelulares de ATP/UTP podem influenciar os níveis de um importante sinalizador intracelular, o cálcio (TOVELL e SANDERSON, 2008).

Nos organismos unicelulares, as taxas de nucleotídeos extracelulares podem influenciar a taxa de crescimento, diferenciação morfológica e síntese protéica, além de modular estímulos contráteis como deslocamento amebóide, batimentos ciliares e contração do vacúolo contrátil (BURNSTOCK, 1996; LI *et al.*, 2008). Em vertebrados, as concentrações desses nucleosídeos fosfatados afetam o desenvolvimento de tecidos, o fluxo sanguíneo, os processos secretórios e inflamatórios, além de atuar como co-substrato de ecto-kinases (BURNSTOCK, 1996; ZIMMERMANN, ZEBISCH e STRÄTER, 2012). Sendo moléculas sinalizadoras, os nucleosídeos (fosfatados ou não) contribuem também na interação entre diferentes organismos, podendo indicar ao parasito uma possível lise celular em sua proximidade. Os nucleosídeos podem ainda atuar como sinalizadores endógenos contribuindo em processos inflamatórios e imunológicos desencadeados pelo hospedeiro (TASCA *et al.*, 2003; BOURS *et al.*, 2006; MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2008).

Dessa maneira faz-se necessário um controle refinado da concentração de nucleotídeos/nucleosídeos modulando tanto sua liberação como degradação. A exacerbação dos níveis de nucleotídeos pode ser propiciada por excitose, canais ou transportadores transmembrana e lise celular dentre outros fatores (HENNESSEY, 2005). Por outro lado, a degradação destes nucleotídeos é regulada, principalmente, por quatro famílias de enzimas que se diferenciam por sua atividade enzimática. Essas enzimas fosfohidrolíticas são conhecidas como 5'-nucleotidases, pirofosfatases, fosfatases alcalinas e nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (ZIMMERMANN, ZEBISCH e STRÄTER, 2012).

As Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases (NTPDase; EC 3.6.1.5), também conhecidas como apirases, ATP difosfohidrolases ou nucleosídeo trifosfatases, hidrolisam nucleosídeos di- e trifosfatados aos seus mononucleotídeos correspondentes sob ativação de cátions bivalentes. A clonagem do gene da apirase de batata (HANDA e GUIDOTTI, 1996) ou o seqüenciamento de fragmentos tripsinizados desta proteína (VASCONCELOS *et al.*, 1996), associado a análises *in silico* de seis outros genes depositados previamente em bancos de dados do NCBI, permitiram a descrição de uma nova família de proteínas caracterizada estruturalmente pela presença de cinco regiões conservadas típicas denominadas *Apyrase Conserved Regions*, abreviadas por ACR1-ACR5 (HANDA e GUIDOTTI, 1996; VASCONCELOS *et al.*, 1996). A clonagem e a descrição de numerosos novos genes nos mais diversos organismos consolidaram a existência desta nova família de proteínas, as NTPDases (WANG e GUIDOTTI, 1996; KACZMAREK *et al.*, 1996; ROBSON, SÉVIGNY e ZIMMERMANN, 2006; KNOWLES, 2011).

A atividade catalítica das NTPDases tem se mostrado importante na modulação dos níveis de nucleotídeos relacionados a ativação de receptores purinérgicos. O envolvimento de NTPDases nos processos tromborregulatórios se faz por meio da degradação de ADP, um nucleotídeo que induz a agregação plaquetária (GENDRON *et al.*, 2002; ROBSON, SÉVIGNY e ZIMMERMANN, 2006; BURNSTOCK e VERKHRATSKY, 2009; KNOWLES, 2011). Inicialmente, a expressão exacerbada da enzima foi considerada um marcador tumoral do melanoma (DZHANDZHUGAZYAN *et al.*, 1998). Em outros estudos, a NTPDase foi também relacionada a proliferação celular, tendo sua hiper-expressão associada a

implantação/sobrevivência de outros tipos de células tumorais (BUFFON *et al.*, 2007).

Em plantas, as NTPDases estão possivelmente envolvidas com a regulação do crescimento, síntese de amido e/ou parede celular, além de estar relacionada à proliferação celular, ao processo de nodulação e a regulação da concentração de ATP extracelular (MCALVIN e STACEY, 2005; ROUX e STEINEIBRUNNER, 2007; WU *et al.*, 2007; RIEWE *et al.*, 2008; TANAKA *et al.*, 2010; DETONI *et al.*, 2012). Em insetos, por sua localização no retículo endoplasmático predominantemente, e com menor intensidade no complexo de Golgi, a NTPDase está possivelmente relacionada ao processo de glicosilação de proteínas, enquanto em mamíferos está envolvida em processos secretórios (KNOWLES, 2009).

NTPDases de vários organismos patogênicos têm sido caracterizadas, e segundo Knowles (2011) e Sansom (2012) merecem destaque aquelas que tiveram sua sequência gênica clonada, e a proteína recombinante expressa e estudada, dentre elas as NTPDases de *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma mansoni* e *Trypanosoma cruzi*.

Em *T. gondii*, a Nucleosídeo Trifosfatase (NTPase) é secretada no vacúolo parasitóforo após a invasão da célula hospedeira, estando envolvida na degradação de nucleotídeos para a recuperação de purinas pelo parasito (BERMUDES *et al.*, 1994; ASAI *et al.*, 1995). Observou-se que a NTPase II é também antigênica na toxoplasmose, e que a inibição de sua atividade catalítica está associada à redução da infectividade do parasito (TAN *et al.*, 2010). Estudos experimentais de proteção indicaram esta molécula como um possível candidato para o desenvolvimento de uma vacina contra a toxoplasmose (TAN *et al.*, 2011).

Em *S. mansoni*, os genes codificadores de duas isoformas de NTPDase (SmATPDase1 e SmATPDase2) foram isolados. Por microscopia confocal, a SmATPDase 1 foi associada à superfície externa do parasito em várias etapas de seu ciclo de vida, como no miracídio, cercária e verme adulto (DE MARCO *et al.*, 2003). Por outro lado, estudos experimentais e *in silico* envolvendo a SmATPDase 2 sugerem fortemente que esta isoforma seja secretada (LEVANO-GARCIA *et al.*, 2007). Estas isoformas podem estar envolvidas na degradação de nucleotídeos

presentes na corrente sanguínea servindo como um mecanismo de escape do parasito às defesas do hospedeiro, tais como inibição da agregação plaquetária e resposta imune (VASCONCELOS *et al.*, 1993, 1996; DE MARCO *et al.*, 2003; FARIA-PINTO *et al.*, 2004; LEVANO-GARCIA *et al.*, 2007).

Em tripanossomatídeos, a NTPDase 1 de *Trypanosoma cruzi* foi identificada na superfície do parasito usando anticorpos contra a NTPDase 1 recombinante, sugerindo sua participação catalítica no resgate de purinas do meio extracelular e nos mecanismos de virulência do parasito (FIETTO *et al.*, 2004). Posteriormente, Santos *et al.* (2009) observaram que a perda de infectividade por este parasito estava associada à redução da atividade ecto-NTPDásica, e Silva-Gomes *et al.* (2014) relataram o aumento da expressão gênica desta enzima em cepas infectivas.

Atualmente sabe-se que os membros desta família podem estar associados à membrana, tendo seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular, podem exibir localização intracelular ou, ainda, ser secretadas (ROBSON, SÉVIGNY e ZIMMERMANN, 2006; FARIA-PINTO *et al.*, 2004, 2006, 2008; REZENDE-SOARES *et al.*, 2010; MENDES *et al.*, 2011; PORCINO *et al.*, 2012). Alguns organismos possuem mais de uma isoforma, as quais podem apresentar preferência por diferentes substratos, distinta sensibilidade a cátions bivalentes, podendo variar ainda em relação ao produto final de hidrólise e a susceptibilidade a detergentes (ROBSON, SÉVIGNY e ZIMMERMANN, 2006). A nomenclatura dos membros desta família de proteínas, também nomeadas de apirase ou ATP difosfohidrolase (ATPDase), foi proposta ser NTPDase, sendo que as isoformas descritas em um mesmo organismo deverão estar acompanhadas de um número, de acordo com sua ordem de descoberta e caracterização (ZIMMERMANN *et al.*, 2000; ROBSON, SÉVIGNY e ZIMMERMANN, 2006).

A atividade catalítica de cada isoforma pode estar associada com a localização da enzima, bem como com as modificações estruturais por ela sofridas. Os níveis de glicosilação acrescidos a uma proteína podem determinar a sua localização (endo- ou ecto-celular), estrutura conformacional, solubilidade, adesão celular e/ou atividade catalítica (ZHONG *et al.*, 2001).

Outras modificações pós-traducionais são também importantes, podendo ser ainda citada a fosforilação, que na NTPDase 2 de mamífero, por exemplo, permite o controle refinado de sua atividade catalítica (WANG *et al.*, 2005). Em geral, as NTPDases de membrana possuem uma palmitoilação em sua porção N- e/ou C-terminal que se faz importante em sua interação com a membrana e com outras proteínas auxiliando na modulação de vias de transdução de sinais (KOZIAH *et al.*, 2000; WU *et al.*, 2006). A acilação exacerba o potencial de multimerização da NTPDase 1 de humanos por alterar as interações intermoleculares desta proteína (MELKONIAN *et al.*, 1999). De maneira geral, as modificações pós-traducionais alteram a função biológica da proteína, não acarretando grandes alterações na massa molecular de seu cerne protéico.

Adicionalmente, as isoformas de NTPDase foram também caracterizadas em macrófagos, células natural killer e em linfócitos T e B, desta maneira, a relação destas proteínas com a resposta imune tem sido amplamente explorada (DWYER *et al.*, 2007). Segundo Sansom *et al.* (2012), a atividade catalítica das NTPDases de parasitos pode estar relacionada a recuperação de purinas e a regulação da coagulação sanguínea, em processos inflamatórios e reações imunes.

## **1.2 A apirase de batata e o domínio B das proteínas desta planta e dos parasitos como ferramentas no estudo das NTPDases**

Anticorpos produzidos contra isoformas de apirase de batata (*Solanum tuberosum*), um dos primeiros membros da família das NTPDases a ser purificado e ter a sua atividade catalítica caracterizada (TRAVERSO-CORI, CHAIMOVICH e CORI, 1965) permitiram a identificação, ecto-localização e isolamento de 2 isoformas de ATP difosfohidrolase de verme adulto de *S. mansoni*, sugerindo o compartilhamento de epitopos entre estas proteínas. Usando um agregômetro, “plasma rico em plaquetas” e o ADP como o agonista de agregação plaquetária, a atividade catalítica detectada no tegumento de verme adulto foi capaz de reduzi-la,

sugerindo ser esta uma de suas funções neste parasito, além de possivelmente estar envolvida no escape ao sistema imune do hospedeiro (VASCONCELOS *et al.*, 1993, 1996). Usando como estratégia a imunoreatividade cruzada com anticorpos anti-apirase de batata, estas isoformas foram também localizadas e isoladas do ovo de *S. mansoni*, demonstrando ser uma isoforma associada à membrana superficial do miracídio e, a outra isoforma presente como uma proteína solúvel e possivelmente secretada (FARIA-PINTO *et al.*, 2004). Neste trabalho, a antigenicidade destas proteínas nativas foi demonstrada pela reatividade com soros de camundongos experimentalmente infectados com o parasito e, também, pela imunoreatividade cruzada com a apirase de batata, sugerindo que a isoforma secretada está envolvida no curso da infecção interferindo na imunopatologia da inflamação granulomatosa (FARIA-PINTO *et al.*, 2004). Esta antigenicidade e imunoreatividade cruzada com apirase de batata foram posteriormente confirmadas por estudos durante a progressão da esquistossomose murina, avaliada antes e após tratamento quimioterápico, e após reinfecção (FARIA-PINTO *et al.*, 2010a), e pela reatividade de IgG1 e IgG4 de soros de pacientes com esquistossomose, antes e após tratamento com praziquantel (FARIA-PINTO *et al.*, 2010b).

O inóculo da apirase de batata em camundongos BALB/c sadios demonstrou sua capacidade estimulatória, aumentando de maneira significativa os níveis de IgGt, IgG1 e IgG2a, sugerindo que a proteína vegetal tem epitopos capazes de induzir respostas imunes humoral e celular (FARIA-PINTO *et al.*, 2010a). Não foi possível detectar imunoreatividade cruzada entre anticorpos anti-apirase de batata e isoformas de NTPDases de mamíferos presentes em vasos sanguíneos, hepatócitos e células inflamatórias, sugerindo que os epitopos compartilhados eram exclusivos entre as proteínas do vegetal e do *S. mansoni*, descartando ainda a indução de auto-imunidade com o uso da apirase de batata em protocolos experimentais de imunização (FARIA-PINTO *et al.*, 2006).

Em trabalho paralelo, esta imunoreatividade cruzada foi também detectada em isoforma de ATP difosfohidrolase isolada de membrana plasmática de promastigotas de *Leishmania amazonensis*, bem como a sua antigenicidade, usando para tal a imunoreatividade entre a proteína nativa do parasito ou a apirase de batata e os soros de camundongos experimentalmente infectados (COIMBRA *et al.*, 2002, 2008).

A clonagem do gene da apirase de batata (HANDA e GUIDOTTI, 1996), o isolamento dos genes das isoformas SmATPDases 1 e 2 de *S. mansoni* (DE MARCO *et al.*, 2003; LEVANO-GARCIA *et al.*, 2007) e a descrição de genes hipotéticos de NTPDases anotados nos genomas de *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* (PEACOCK *et al.*, 2007), associados à análises *in silico*, deram suporte a existência de outros domínios compartilhados entre estas proteínas, além das ACRs (FARIA-PINTO *et al.*, 2008; VASCONCELOS *et al.*, 2009), justificando a reatividade cruzada com a apirase de plantas (VASCONCELOS *et al.*, 1996; FARIA-PINTO *et al.*, 2004, 2006; COIMBRA *et al.*, 2008; FARIA-PINTO *et al.*, 2010a,b).

Estas análises viabilizaram a detecção de um domínio extenso, chamado B, compartilhado entre a apirase de batata e as proteínas dos parasitos (FARIA-PINTO *et al.*, 2008; VASCONCELOS *et al.*, 2009), estimulando a síntese de peptídeos sintéticos derivados dos domínios B da SmATPDase 2 de *S. mansoni* e da NTPDase 1 de *L. braziliensis*. O inóculo destes peptídeos em camundongos Suíço ou BALB/c foi capaz de estimular a produção de IgG1 e IgG2a, sugerindo a habilidade do domínio B de NTPDases interferir nas respostas imunes humoral e celular do hospedeiro, como previamente descrito para a proteína integral (FARIA-PINTO *et al.*, 2010b).

Os anticorpos anti-peptídeos foram usados como ferramentas de estudos para a identificação específica da isoforma SmATPDase 2 em preparação de vermes adultos ou ovos do parasito, bem como para a sua localização nestes últimos (MENDES *et al.*, 2011). Nenhuma reatividade foi encontrada entre estes anticorpos e as NTPDases de mamíferos (MENDES *et al.*, 2011), corroborando a hipótese do uso destes peptídeos em protocolos de imunização.

Peptídeos sintéticos derivados do domínio B da NTPDase 1 de *L. braziliensis* foram usados como antígenos em ELISA para a quantificação da reatividade de soros de pacientes com leishmaniose cutânea, comprovando a antigenicidade deste domínio específico (REZENDE-SOARES *et al.*, 2010). Adicionalmente, os anticorpos produzidos contra estes peptídeos foram usados para a imunolocalização da NTPDase 1 de promastigotas de *L. braziliensis*, inibição de sua atividade enzimática e da proliferação de promastigotas *in vitro*, evidenciando a importância desta enzima para a sobrevivência do parasito (PORCINO *et al.*, 2012). A NTPDase 1 foi purificada de



promastigotas de *L. infantum*, e os peptídeos sintéticos foram usados para a comprovação da antigenicidade de seu domínio B para cães com leishmaniose visceral (MAIA *et al.*, 2013).

Paralelamente, foi realizado um estudo comparativo *in silico* entre as sequências de aminoácidos dos domínios B de NTPDases de plantas e de diversos organismos de linhagens filogeneticamente distintas, e foram detectados altos índices de identidade e similaridade entre eles (MAIA *et al.*, 2011).

Todos estes trabalhos sugeriram fortemente que o domínio B da apirase de plantas e das NTPDases de parasitos, membros da mesma família de proteínas, foi conservado evolutivamente, tendo como possível função a imunomodulação da resposta imune de hospedeiros contra a infecção parasitária (FARIA-PINTO *et al.*, 2008; VASCONCELOS *et al.*, 2009; MAIA *et al.*, 2011).

### 1.3 Leishmaniose

As leishmanioses, causadas por protozoários parasitos do gênero *Leishmania*, abrangem um conjunto heterogêneo de doenças com amplo espectro clínico e epidemiológico, caracterizadas pelo acometimento cutâneo, mucocutâneo e/ou visceral (LINDOSO e LINDOSO, 2009).

A leishmaniose é considerada uma doença tropical infecciosa negligenciada pela Organização Mundial de Saúde, e sua alta incidência deve-se a inexistência de políticas efetivas e aos baixos investimentos no desenvolvimento de novos métodos diagnósticos, drogas terapêuticas ou vacinas, constituindo um grande problema de saúde pública. As doenças negligenciadas são caracterizadas por sua predominância nas regiões tropicais (entre latitudes 35 °N e 35 °S) com altitude abaixo de 200 metros em áreas mais quentes (15 a 40 °C), concentradas nas comunidades rurais remotas e em favelas urbanizadas nas proximidades da linha do Equador (FEASEY *et al.*, 2010; LINDOSO e LINDOSO, 2009). Em sua maioria,

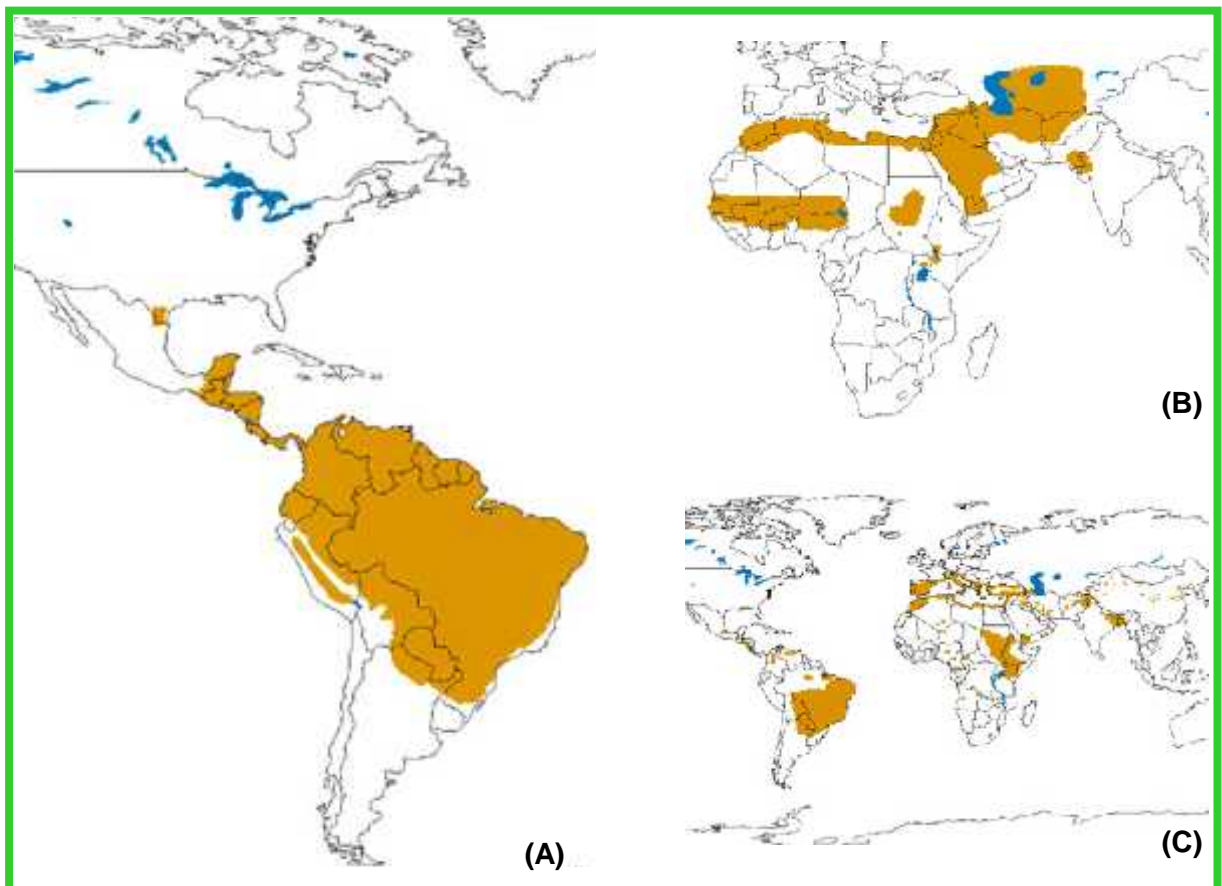
abrangem doenças crônicas debilitantes e muitas vezes estigmatizantes que acometem principalmente a população de baixíssima renda de países tropicais e subtropicais (UTZINGER *et al.*, 2012). As leishmanioses chamam atenção principalmente por suas altas taxas de mortalidade e de morbidade quando comparadas às demais doenças tropicais, sendo a segunda em mortalidade e a quarta em morbidade, índices maiores que aqueles encontrados para a malária e filariose linfática (BERN, MAGUIRE e ALVAR, 2008).

Atualmente, cerca de 350 milhões de pessoas estão em risco de contrair leishmaniose, sendo a desnutrição e a falta de condições adequadas de moradia os fatores de risco que mais contribuem para a prevalência da doença (UTZINGER *et al.*, 2012). A expansão da leishmaniose também foi associada ao desmatamento, construção de barragens, mudanças climáticas e aos movimentos populacionais em massa, onde indivíduos não responsivos imunologicamente migram para regiões endêmicas (DESJEUX, 2001). A co-infecção do vírus da imunodeficiência humana (HIV) com *Leishmania* spp. tem se mostrado um problema alarmante, visto que há uma exacerbação da progressão clínica destas doenças (ANDREANI *et al.*, 2012).

A Organização Mundial de Saúde (WHO) estima que a leishmaniose esteja entre uma das principais antropozoonoses mundiais, com ocorrência de casos em 98 países de quatro continentes (Figura I). O número de indivíduos com leishmaniose é subestimado por ser uma doença típica de países subdesenvolvidos, nos quais o diagnóstico e o registro de casos são precários. Cerca de 1,5 milhões de novos casos de leishmaniose cutânea e 500 mil de leishmaniose visceral são registrados anualmente. Destes, 90% dos casos de leishmaniose cutânea foram registrados no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria, enquanto a leishmaniose mucocutânea encontra-se predominantemente na Bolívia, Brasil e Peru. Por sua vez, a leishmaniose visceral acomete principalmente Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudan. No Brasil são registrados cerca de 30.000 casos por ano, os quais estão predominantemente nas regiões norte e nordeste do país (LINDOSO e LINDOSO, 2009).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos heteroxenos ou digenéticos, por necessitarem de dois diferentes hospedeiros para completar seu ciclo biológico. Estes parasitos intracelulares têm nos mamíferos silvestres seu

principal reservatório, ao passo que sua dispersão ocorre por meio de insetos vetores pertencentes à subfamília Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) (Figura II-A). Das mais de 500 espécies de flebotomíneos existentes, cerca de 30 espécies possuem importância médica, dentre elas os vetores transmissores da leishmaniose dos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo, e *Lutzomyia* no Novo mundo (KILLICK-KENDRICK e RIOUX, 2002). Dentre os vetores, existem aqueles que são restritos, sendo transmissores apenas de uma espécie, ou permissivos que são capazes de transmitir várias espécies de *Leishmania* (KAMHAWI, 2000; VOLF e MYSKOVA, 2007).

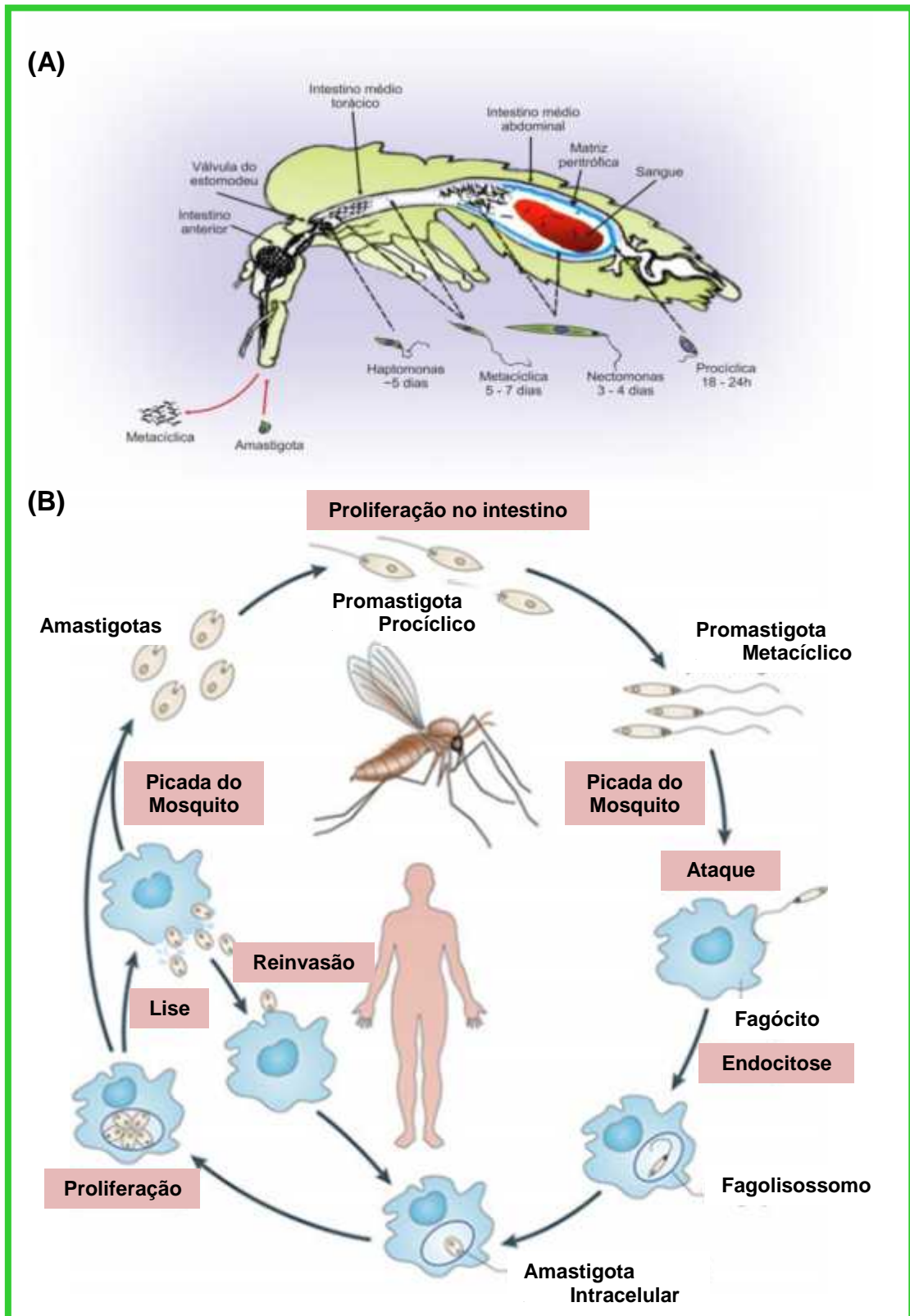


**Figura I. Epidemiologia da leishmaniose. (A)** Leishmaniose cutânea e mucocutânea no Novo Mundo; **(B)** Leishmaniose cutânea no velho mundo; **(C)** Leishmaniose visceral no Velho e no Novo Mundo. Dados obtidos da WHO ([www.who.int/leishmaniasis/](http://www.who.int/leishmaniasis/))

A transmissão destes patógenos de um hospedeiro mamífero para o outro ocorre por meio do flebotomíneo fêmea que ao se alimentar de sangue para o adequado desenvolvimento de seus ovos acaba se infectando ou transmitindo a doença. Assim, durante o repasto sanguíneo, o flebotomíneo capta juntamente com o sangue, macrófagos parasitados por formas amastigotas. As amastigotas possuem pequena dimensão, cerca de três micrômetros, aspecto esférico ou ovóide, possuindo flagelo reduzido a um segmento não exposto na bolsa flagelar. Após serem ingeridas pelo inseto vetor, as amastigotas do parasito iniciam sua transformação em formas promastigotas, as quais possuem corpo celular mais alongado (cerca de 20-25  $\mu\text{m}$ ) e flagelo proeminente livre, constituindo uma forma móvel e extracelular. As formas promastigotas proliferam por divisão binária, possuindo vários estágios morfológicamente distintos em seu desenvolvimento (BATES e ROGERS, 2004; Figura II-A). As formas infectantes, denominadas promastigotas metacíclicas, acumulam no intestino médio ou anterior do inseto vetor, dependendo da espécie do protozoário (BATES, 2007; BAÑULS, HIDE e PRUGNOLLE, 2007).

Durante o repasto sanguíneo, a fêmea de flebotomíneo infectada inocula formas promastigotas infectantes do parasito na pele do animal hospedeiro. Em defesa do hospedeiro, células do sistema fagocítico mononuclear endocitam as formas promastigotas do parasito, para a devida eliminação. Por sua vez, o parasito evade da defesa do hospedeiro, transformando-se em formas amastigotas. Os amastigotas proliferam dentro do vacúolo parasitóforo do macrófago, que se rompe liberando estas formas para infecção de outros macrófagos (Figura II-B; BATES e ROGERS, 2004; BATES, 2007). A transmissão da leishmaniose pode também ocorrer por transfusão de sangue ou órgãos, ou ainda por via transplacentária (MURRAY *et al.*, 2005).

Os macrófagos infectados podem apresentar tropismo por diferentes órgãos de acordo com a espécie do parasito, podendo permanecer localizado na pele ou disseminar-se pelo sistema fagocítico mononuclear para a mucosa ou vísceras. Dessa maneira, a leishmaniose apresenta um amplo espectro clínico relacionado a fatores intrínsecos espécie-específicos do parasito, e a maneira como o sistema imune do hospedeiro reage à infecção pelo protozoário.



Segundo a Organização Mundial de Saúde, a leishmaniose humana pode ser classificada em quatro tipos clínicos: (A) Leishmaniose cutânea, caracterizada pela presença de lesões na pele em número limitado, geralmente em áreas expostas do corpo como face, braços e pernas; (B) Leishmaniose cutâneo-difusa, abrange formas disseminadas cutâneas que se apresentam em indivíduos anérgicos; (C) Leishmaniose visceral, na qual os parasitos causadores da infecção apresentam acentuado tropismo pelo baço, fígado, medula óssea e tecidos linfóides; (D) Leishmaniose muco-cutânea, doença inicialmente marcada pela presença de úlceras cutâneas, caracterizando a fase crônica da doença com o aparecimento de lesões destrutivas nas mucosas (nariz, boca, faringe) (Figura III). Todas as formas acarretam consequências devastadoras, causando lesões extensivas e desfigurantes, sendo a forma visceral a mais severa, levando a 100% de mortalidade quando não tratada.

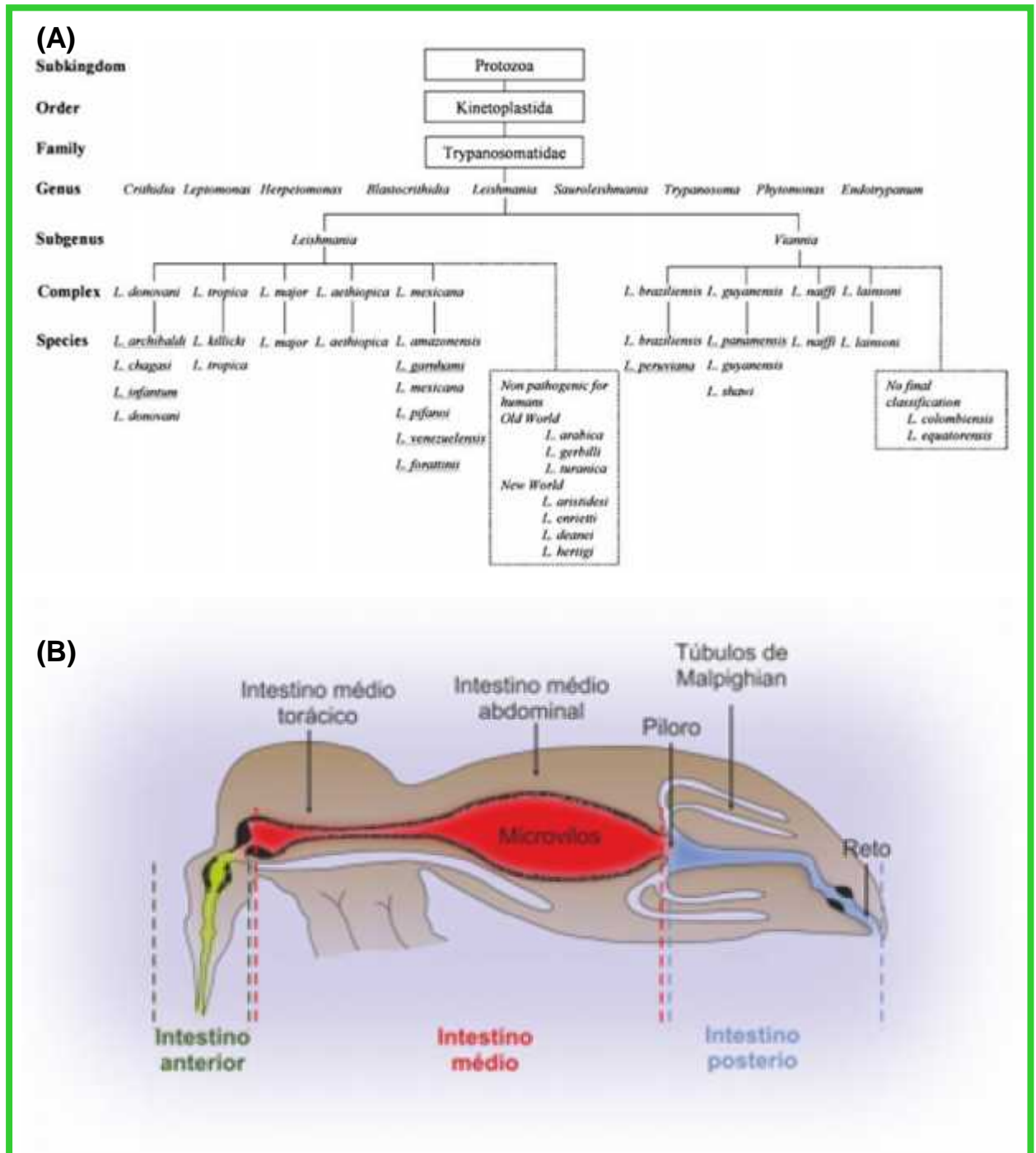


**Figura III. Espectro dos diferentes tipos de leishmaniose. (A) Leishmaniose cutânea; (B) Leishmaniose cutâneo-difusa; (C) Leishmaniose visceral; (D) Leishmaniose muco-cutânea.** Imagens obtidas da WHO ([www.who.int/leishmaniasis/](http://www.who.int/leishmaniasis/)).

Em humanos, a infecção patogênica é acidental, já que os flebotomíneos são pouco antropofílicos, sendo causada por cerca de 20 espécies de protozoários parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* (Figura IV-A). As espécies pertencentes a este gênero, até a presente data, são agrupadas de acordo com seu comportamento no intestino do parasito vetor em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (LAINSON *et al.*, 1987, Figura IV-A, B). Os estudos de filogenia têm recebido suporte de ferramentas moleculares importantes, como a eletroforese de enzimas multilocus. Este método é baseado na identificação de organismos pela mobilidade relativa em eletroforese de um grande número de enzimas intracelulares. Sabe-se que estas diferenças em mobilidade estão diretamente relacionadas a mutações no locus gênico originando substituições na cadeia primária de aminoácidos codificada por aquele gene. No gênero *Leishmania*, estes estudos corroboram a classificação realizada por Lainson *et al.* (1987) agrupando os parasitos em dois clados: *Leishmania* e *Viannia* (CUPOLILLO *et al.*, 2000, 2003).

O controle da leishmaniose tem sido realizado principalmente por quimioterapia e pelo controle do inseto vetor, diminuindo a transmissão da doença, já que até o momento nenhum método imunoprolático mostrou eficácia a nível mundial (KUMAR e ENGWERDA, 2014).

O tratamento da leishmaniose utilizando drogas isoladas é um método de eficácia limitada, já que em algumas regiões os parasitos têm apresentado resistência aos medicamentos administrados, além de possuir alto custo e ter efeitos tóxicos (Tabela I). Os parasitos podem apresentar resistência aos antimônias pentavalentes, e como recurso a anfotericina B é associada ao tratamento. Combinações de diferentes drogas podem melhorar a eficácia do tratamento, diminuindo o tempo da terapia, a toxicidade de cada um dos compostos devido as baixas dosagens e principalmente, reduzindo a seleção dos organismos resistentes. Adicionalmente, há duas formas predominantes da doença, cutânea e visceral, que exigem formulações farmacêuticas que tenham tropismo direcionado ao parasito causador da doença (CROFT e OLLIARO, 2011; MCGWIRE e SATOSKAR, 2014).



**Figura IV. Taxonomia do gênero *Leishmania*.** (A) Proposta taxônomica de *Leishmania* sp. sugerida por Lainson *et al.* (1987) de acordo com o comportamento do parasito no intestino do inseto vetor (BAÑULS, HIDE e PRUGNOLLE, 2007); (B) Nesta proposta, o amastigota isolado do hospedeiro infecta experimentalmente o vetor *Lutzomia* sp. concentrando-se no intestino posterior quando pertencente ao clado *Viannia*, enquanto os amastigotas pertencentes ao clado *Leishmania* desenvolvem-se preferencialmente no intestino médio e anterior (PIMENTA, FREITAS e SECUNDINO, 2012).



**Tabela I. Quimioterápicos usados para tratamento da leishmaniose** (Adaptado de CROFT e OLLIARO, 2011; MCGWIRE e SATOSKAR, 2014).

Medicamento	Propriedades e Administração	Comentários
Pentostam <sup>®</sup> , Glucantime <sup>®</sup>	Compostos de antimônio pentavalente, via intravenosa ou intramuscular	Para VL e CL (eficácia variável), resistência a droga em Bihar (Índia)
Fungizone <sup>®</sup>	Composto de anfotericina B, via intravenosa	Para VL, CL (incluindo MCL), usado na Índia (resistência ao antimônio)
Ambisome <sup>®</sup>	Composto de anfotericina B, via intravenosa	Efetiva para VL, mas por alto custo, usado em formas mais graves (PKDL, MCL)
Miltefosine <sup>®</sup>	Alquil-fosfocolina, via oral	Para VL e algumas formas de CL, contra-indicada por ser teratogênica em ratos
Paramomicina	Antibiótico aminoglicosídico, via intramuscular (VL) ou tópica (CL)	Na Índia e África, para VL associado ou não a anfotericina B; para CL associada à gentamicina
Amphocil, Abelcet, Amphomul	Formulações lipídicas de anfotericina B, via intravenosa	Principalmente para VL
Pentamidina	Diamidina, como sais de isetionato, via intramuscular	Para formas específicas de CL (América do Sul)

CL, leishmaniose cutânea; PKDL, leishmaniose dérmica pós-Calazar; MCL, leishmaniose muco-cutânea; VL, leishmaniose visceral.

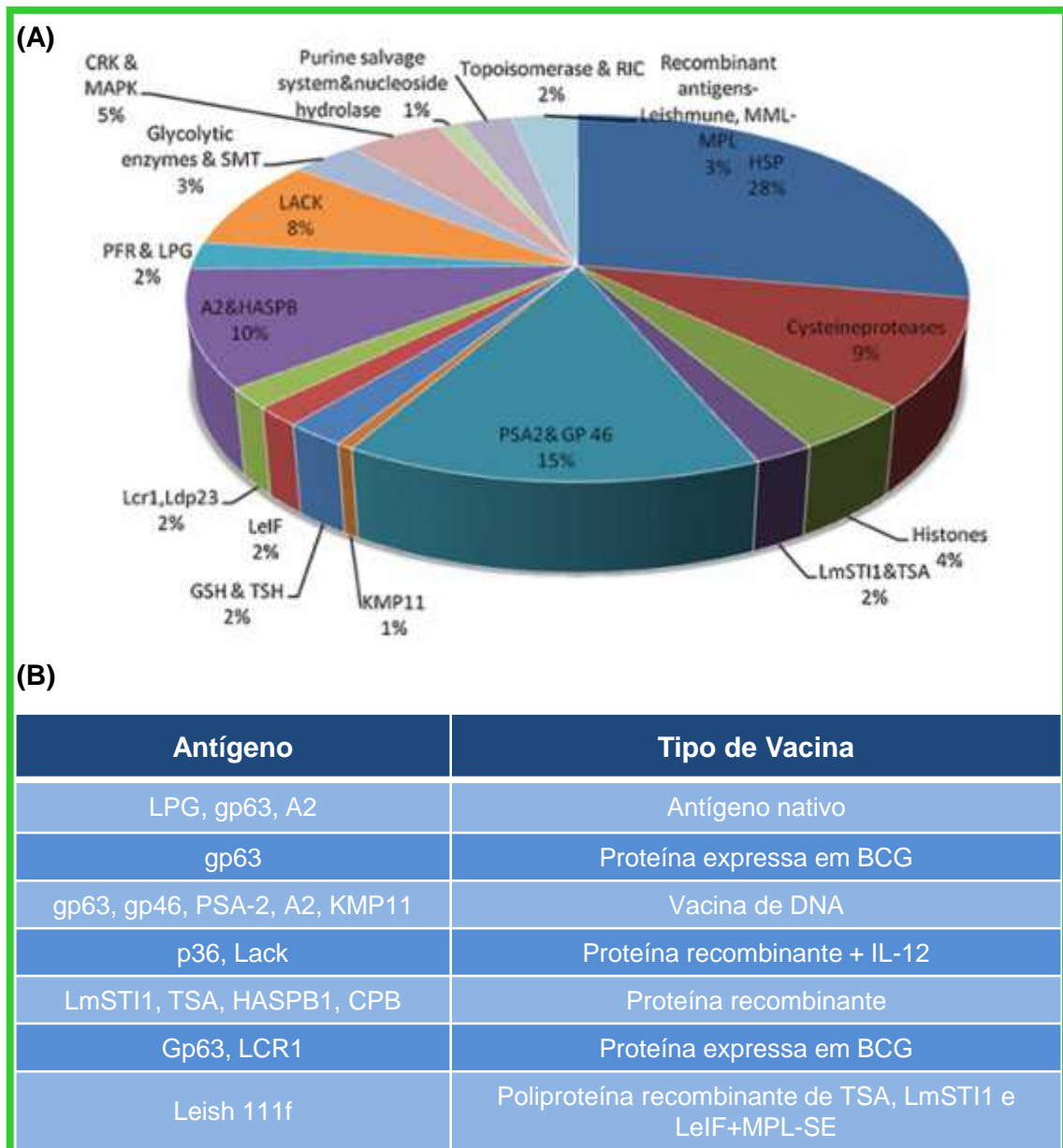
As intervenções quimioterápicas são tóxicas e requerem administração sistêmica (intravenosa ou intramuscular) diária por períodos que variam de 3-5 semanas. Além disso, o surgimento de linhagens resistentes a drogas é crescente, e estes tratamentos não são capazes de induzir a cura estéril por não eliminarem parasitos persistentes no hospedeiro. Assim, há uma necessidade contínua para o desenvolvimento de novas terapias contra leishmaniose que sejam seguras, efetivas na indução de uma cura por longo período, e que seja de fácil administração (MCGWIRE e SATOSKAR, 2014).

Como alternativa ao método quimioterápico, pode ser utilizada a intervenção por imunoterápicos, ou ainda métodos não difundidos como a terapia com resfriamento ou aquecimento da área afetada. A crioterapia é realizada com aplicações de nitrogênio líquido diretamente sobre as lesões cutâneas de uma a várias vezes, podendo ser usada em combinação com antimônio. A terapia por calor

é realizada aquecendo as lesões a 50°C durante 30s por até 3 vezes para acelerar a resolução da lesão e é comparável a terapia com antimônios, podendo ser utilizada em substituição ao uso destes em caso de pacientes não-responsivos a esta droga. Vacinas consistindo de parasitos mortos suplementados com BCG ou com antígenos recombinantes juntamente com fatores estimuladores de colônias de granulócitos/macrófagos têm sido utilizadas também na imunoterapia de pacientes com leishmaniose cutânea difusa ou mucosa (MCGWIRE e SATOSKAR, 2014).

A história da vacinação contra a leishmaniose pode ser dividida basicamente em quatro etapas. Inicialmente foi realizado um processo denominado leishmanização, o qual é caracterizado pela infecção do indivíduo com baixas doses de parasitos vivos e virulentos, conferindo resistência a infecções posteriores, sendo este método descartado por sua baixa segurança e reprodutibilidade (KHAMESIPOUR, DOWLATI e ASILIAN, 2005; BIRNBAUM e CRAFT, 2011). Assim, foram iniciados estudos envolvendo o inóculo de parasitos mortos ou atenuados, o qual não tem conferido proteção significativa contra a leishmaniose humana (NOAZIN *et al.*, 2009; BIRNBAUM e CRAFT, 2011). Atualmente, novos métodos vacinais têm sido explorados, em um deles frações purificadas do parasito ou microorganismos expressando biomoléculas heterólogas são utilizados em tentativas vacinais. Outra tentativa é a administração de biomoléculas de maneira direta como proteínas purificadas ou de maneira indireta, através da inserção do DNA codificante da sequência de interesse (KEDZIERSKI, 2011; BIRNBAUM e CRAFT, 2011; BIRNBAUM e CRAFT, 2011).

Assim, atualmente, diversos estudos têm sido realizados visando à identificação de antígenos que possam ser úteis na imunoprevenção e imunoterapia de doenças infecciosas (SINGH e SUNDAR, 2012; Figura V, A e B). Frequentemente, os antígenos identificados com essa finalidade pertencem a grupos evolutivamente conservados de proteínas, conhecidos como panantígenos (REQUENA *et al.*, 2000). Em *Leishmania*, tem se buscado antígenos presentes em todas as fases do ciclo de vida do parasito que sejam conservados dentre as diversas espécies, e que sejam filogeneticamente diferentes de seus homólogos encontrados em mamíferos (HANDMAN, 2001; SINGH e SUNDAR, 2012).



**Figura V. Terceira Geração de Vacinas contra leishmaniose. (A)** Porcentagem relativa de estudos envolvendo antígenos usados como candidatos a vacinas nos últimos dez anos; **(B)** Potentes antígenos vacinais testados em camundongos, bem como tipo de vacina administrada (Adaptado de SINGH e SUNDAR, 2012).

#### 1.4 Leishmaniose causada por *L. amazonensis*

A *L. amazonensis* é um importante agente etiológico da leishmaniose tegumentar difusa anérgica em mamíferos, o qual tem expandido sua distribuição geográfica com as constantes interferências do homem em seu ambiente natural. Esta espécie tem demonstrado alta capacidade de escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro, principalmente, direcionando a resposta imunológica e suprimindo a formação de anticorpos que auxiliam na eliminação do parasito. No Brasil tem aumentado o interesse nos estudos envolvendo a espécie *L. amazonensis*, por ser essa o agente etiológico responsável por uma das formas mais severas da leishmaniose cutânea (SILVEIRA *et al.*, 2009).

Para melhor entender as características deste processo infeccioso, tem sido utilizado modelos de infecção experimental envolvendo diferentes linhagens de camundongos. A infecção experimental auxilia no conhecimento dos aspectos da doença, que podem direcionar estratégias de imunoterapia e/ou imunoprofilaxia (PEREIRA e ALVES, 2008).

A linhagem de camundongos isogênicos BALB/c é altamente susceptível à infecção por *L. amazonensis* e, quando inoculados no coxim plantar com este parasito, desenvolvem lesões crônicas ulcerativas típicas (CALABRESE e GONÇALVES-DA-COSTA, 1992; BERNARDO e ALVES, 2008). A análise de cortes histológicos evidencia grande quantidade de macrófagos infectados contendo vacúolos parasitóforos gigantes e extensiva destruição tecidual (ALMEIDA *et al.*, 1996; CUPOLILLO *et al.*, 2003; CARDOSO *et al.*, 2010).

O estabelecimento da leishmaniose murina parece ser dependente de anticorpos circulantes, uma vez que camundongos com esta deficiência se mostraram resistentes à infecção por *Leishmania* (KIMA *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2007; WANASSEN, XIN e SOONG, 2008). Esta associação pode estar relacionada à exacerbação da produção de IL-10 pelos macrófagos, induzida pela opsonização dos parasitos, tanto por IgG1 quanto por IgG2a/c (YANG *et al.*, 2007; CHU *et al.*, 2010).

Camundongos nocautes para IgG1 submetidos a infecção com *L. mexicana* foram resistentes a infecção, apresentando uma produção precoce e exacerbada dos níveis de IgG2a/c, indicando a atividade protetora destes isotipos, enquanto a produção de altos níveis de IgG1 durante a progressão da doença contribuem para seu estabelecimento (CHU *et al.*, 2010).

Visando a obtenção de um conjunto de antígenos possivelmente vacinais, deve-se atentar para aqueles com tendência ao desenvolvimento de resposta predominantemente Th1 (isotipos IgG2a/c), onde os níveis do isotipo IgG1 (Th2) permaneçam baixos, os quais poderiam desenvolver uma resposta protetora ao parasito (IBORRA *et al.*, 2008; CHU *et al.*, 2010; RAMÍRES *et al.*, 2010).

Nesta Tese, o gene *LamNTPDase* que codifica a NTPDase 1 de *L. amazonensis* foi obtido. Estudos *in silico* e experimentais viabilizaram a caracterização molecular e localização da NTPDase 1 em promastigotas. Além disso, por meio de biomoléculas recombinante e sintética, o potencial biotecnológico de um domínio conservado e antigênico desta proteína foi também avaliado. Estes estudos deram suporte a existência do domínio B conservado e antigênico entre NTPDases de plantas e organismos filogeneticamente distintos, como previamente observado por análises *in silico* (FARIA-PINTO *et al.*, 2008; MAIA *et al.*, 2011) e, o estudo particularizado da NTPDase 1 de *L. amazonensis* propiciou novos dados funcionais, bioquímicos e imunológicos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos Gerais**

Estudar os aspectos bioquímicos e imunológicos do domínio B da NTPDase 1 de *L. amazonensis* por meio da clonagem do gene desta proteína e análises *in silico*, e usando como ferramentas biológicas a apirase de batata, o recombinante r-potDomB derivado desta proteína vegetal e peptídeos sintéticos derivados do domínio B de NTPDase de *Leishmania*.

### **2.2 Objetivos Específicos**

2.2.1 Expressar o polipeptídeo recombinante r-potDomB, derivado do domínio B da apirase de batata, utilizando *E. coli* BL21 (DE3) como célula hospedeira e purificá-lo por meio de cromatografia de afinidade;

2.2.2 Clonar o gene da NTPDase 1 de *L. amazonensis* utilizando “primers” construídos a partir de proteínas homólogas de *Leishmania* spp. já anotadas nos bancos de dados do NCBI, e realizar estudos *in silico* da proteína codificada;

2.2.3 Identificar e localizar a NTPDase 1 de promastigotas de *L. amazonensis* por meio de “Western blots” de preparações de frações subcelulares e microscopia eletrônica de transmissão utilizando anticorpos específicos para o domínio B desta proteína;

2.2.4 Isolar e identificar a NTPDase 1 e SUMO de *L. amazonensis* por meio de gel não-desnaturante, “Western blots” e espectrometria de massas;

2.2.5 Avaliar a reatividade entre anticorpos de camundongos BALB/c infectados com promastigotas de *L. amazonensis* e o recombinante r-potDomB ou peptídeos sintéticos derivados do domínio B de NTPDase de *Leishmania*, durante a progressão da leishmaniose;

2.2.6 Avaliar o potencial imunogênico do r-potDomB em testes de hipersensibilidade tardia e em protocolos de proteção contra *L. amazonensis*.

## **3 Material e Métodos**

### **3.1 Obtenção do r-potDomB**

#### **3.1.1 Vetor de Expressão**

Para a obtenção do domínio B da apirase de batata (r78-117; NCBI U58597.1) foi construído um plasmídeo sintético otimizado para a expressão do polipeptídeo recombinante r-potDomB em *E. coli*. O plasmídeo sintético foi desenhado como ilustrado na Figura VI-A, contendo o promotor T5 associado ao operon lac; um sítio de ligação ao ribossomo; sítios específicos para início e término da transcrição; gene de resistência a ampicilina; nucleotídeos codificadores da sequência do domínio B e mais dez aminoácidos (Figura VI-B), estes últimos necessários ao início da tradução e reconhecimento do anticorpo anti-RGS-his. Este plasmídeo (GS44939-3 pBSK REGB) foi obtido da Epoch Biolabs (Missouri, USA), e foi idealizado com a colaboração do Dr. Marcelo de Oliveira Santos, do Departamento de Biologia do ICB/UFJF, que também auxiliou nas etapas subsequentes para a expressão do polipeptídeo recombinante na *Escherichia coli* BL21 (DE3).

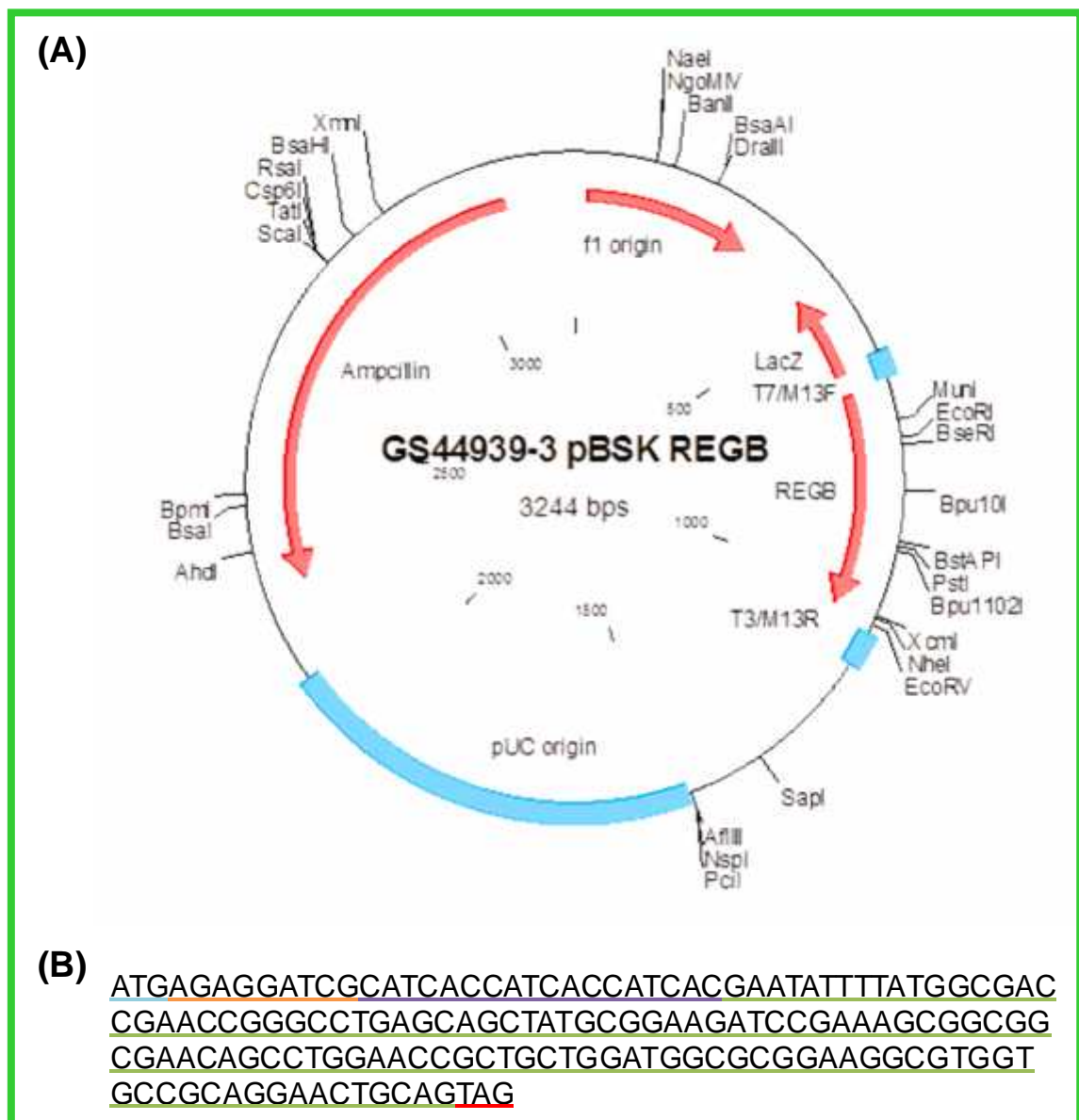
#### **3.1.2 Transformação da *Escherichia coli* BL21 (DE3)**

O cultivo desta cepa foi realizado em meio de cultura SOB (Super Optimal Broth) contendo triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 86 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM.

O preparo de células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) foi realizado de acordo com o método Inoue, Nojima e Okayama (1990), sendo as culturas expandidas sob leve agitação (150 rpm) a 37 °C em meio SOB até atingir D.O.<sub>600nm</sub> de 0,55-0,6. A densidade ótica das culturas bacterianas foi monitorada em



espectrofotômetro. Em seguida, as células foram lavadas em tampão PIPES 10 mM [piperazina-1,4-bis(ácido 2-etanosulfônico)], pH 6,7, contendo  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  55 mM,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  15 mM, KCl 250 mM, e ressuspendidas neste mesmo tampão acrescido de DMSO 7,5%, sendo armazenadas a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  até o momento do uso.



**Figura VI. Plasmídeo sintético utilizado para a expressão do r-potDomB em *E. coli* BL21 (DE3).** (A) Vetor de expressão contendo a sequência codificadora do polipeptídeo de interesse; (B) Quadro de leitura da sequência nucleotídica a ser expressa em *E. coli*, contendo sítio de iniciação (azul; M); região codificadora da trinca arginina-glicina-serina (RGS; laranja) e da cauda de 6xhistidina (lilás) para reconhecimento do anticorpo anti-RGS-his; a região codificadora do Domínio B da apirase de batata (r78-117; NCBI U58597.1; verde) e o sítio de terminação (vermelho).

Após a homogeneização de 100 µl de *E. coli* BL21 (DE3) competente e 1 µl do plasmídeo sintético pBSK\_RegB (100 ng/ml), este plasmídeo foi inserido na célula hospedeira por eletroporação usando pulso elétrico de aproximadamente 1.500 V por 3 milisegundos (*Gene-Pulser, Bio-Rad, Brasil*). Após choque elétrico, foi adicionado 1 ml de meio de cultura SOC (SOB + Glicose 20 mM) às células eletroporadas, mantendo-as incubadas sob agitação (200 rpm) a 37 °C por 1 h. Após este período, as células foram plaqueadas em meio LB sólido (Luria-Bertani: triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, pH 7,5, ágar 1,5%) contendo o antibiótico de seleção (ampicilina 100 µg/ml) e incubadas a 37 °C durante 12 h. Para a obtenção do pré-inóculo, algumas colônias transformadas foram, individualmente, expandidas em 6 ml de meio de cultura SOB, acrescido de ampicilina (100 µg/ml), incubadas sob agitação (200 rpm) a 37 °C por 12 h.

### 3.1.3 Expressão do polipeptídeo recombinante r-potDomB

Para a expressão do r-potDomB, cada pré-inóculo contendo a cultura de *E. coli* BL21 transformada (*E.coli\_regB*) e expandida foi vertido em um erlenmeyer contendo 250 ml de meio SOB e incubado a 37 °C sob agitação (200 rpm) até atingir densidade ótica adequada a indução da expressão (D.O.<sub>600 nm</sub> 0,6-0,7). Foram realizadas quatro condições de cultura identificadas da seguinte maneira: *E. coli* vazia (*E. coli\_∅*, não-transformada); *E. coli\_regB*, na ausência de IPTG; *E. coli\_regB* induzida com IPTG 0,5 mM ou IPTG 1 mM. Assim, após atingir a D.O. adequada, as culturas *E. coli\_regB* tiveram sua expressão induzida com IPTG 0,5 mM ou 1 mM, permanecendo sob agitação (200 rpm) a 37 °C, as mesmas condições nas quais permaneceram incubadas as culturas de *E. coli\_∅* ou *E. coli\_regB*, na ausência de IPTG. Após a indução (0 h, 2 h, 4 h e 6 h) foram retiradas duas alíquotas de 49 e 1 ml de cada erlenmeyer, e as densidades óticas foram mensuradas. As alíquotas das diversas amostras foram centrifugadas a 4.500 g a 4 °C por 20 min, sendo os sobrenadantes devidamente descartados e os “pellets” armazenados a -80 °C.

Inicialmente, utilizando protocolos padrão de extração, eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio 0,1% (SDS-PAGE) e “Western blots”, foram realizadas várias análises visando avaliar se o polipeptídeo estava sendo expresso, e

se estaria de forma predominante na fração solúvel ou em corpos de inclusão (SAMBROOK e RUSSEL, 2006). Para analisar as condições de expressão de proteínas solúveis, os “pellets” resultantes das alíquotas de 1 ml foram ressuspensos em tampão de amostra para eletroforese (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, contendo glicerol 2%, SDS 0,2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 2% e azul de bromofenol 0,1%) e incubados a 100 °C por 5 min. Em seguida, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida 18% e SDS 0,1% (SDS-PAGE 18%), segundo método descrito por Laemmli (1970), usando o sistema Mini-Protean III Cell (Bio-Rad Laboratórios, São Paulo, Brazil). Marcadores de peso molecular (*Low-Range RainbowMarkers*, 3.500 – 38.000 Da) foram também aplicados.

#### 3.1.4 Purificação do polipeptídeo recombinante *r-potDomB*

Visando a purificação do polipeptídeo, o “pellet” obtido após centrifugação da cultura (49 ml) foi ressuspensado em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8, NaCl 500 mM e imidazol 20 mM, denominado Tampão de Ligação. Em seguida, para o rompimento das células, lisozima (0,5 mg/ml) foi adicionada e a suspensão foi incubada a 37 °C por 30 min. O lisado foi, em seguida, incubado em banho fervente por 40 min para promover a desnaturação da lisozima. Para garantir uma lise eficiente, o homogeneizado obtido foi sonificado em gelo com pulsos de 200 W de potência por 25 s com intervalo de 1 min entre os ciclos (Disruptor de Células DES500, UniqueGroup, Brasil). Após efetivada a lise, Triton X-100 1% e os inibidores de proteases (leupeptina 0,5 µg/ml, pepstatina 0,07 µg/ml, tripsina 0,05 µg/ml e PMSF 2 µg/ml) foram adicionados à preparação sob agitação por 10 min. Em seguida, o material foi centrifugado a 4.500 rpm por 30 min a 4 °C, e o sobrenadante proveniente do lisado celular foi armazenado a -20 °C.

O procedimento cromatográfico foi realizado em coluna de afinidade His Trap HP Ni-Sepharose (1 ml; GE Healthcare, Brasil), com o auxílio de um bomba peristáltica (Peristaltic Pump P-1, GE Healthcare Life Sciences, Brasil). Antes deste procedimento, o sobrenadante foi submetido à filtração em membrana de 0,45 µm (Millipore Corporation, USA) para a devida eliminação de possíveis detritos provenientes da lise, os quais poderiam levar ao entupimento da coluna. Inicialmente

a coluna, armazenada em etanol 20%, foi lavada com 5 volumes de água deionizada e equilibrada com 7 volumes de tampão de ligação, sendo o fluxo ajustado para 1 ml/min. Uma alíquota de 1 ml do filtrado (*E.coli\_RegB*) foi então aplicada no topo da coluna, e todo o processo cromatográfico subsequente foi monitorado por meio da coleta de frações (500 µl) eluídas da coluna e leitura espectrofotométrica de uma alíquota de cada fração acrescida do reagente de Bradford (1976). Após a saída do filtrado de *E.coli\_RegB* aplicado à coluna, ela foi lavada com o tampão de ligação até que a dosagem protéica se estabilizasse em valores desprezíveis, descartando assim proteínas adsorvidas ou de baixa afinidade. Em seguida, foi realizada a eluição do polipeptídeo expresso por meio da aplicação de tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 6,0, NaCl 500 mM e imidazol 500 mM à coluna.

A dosagem de proteínas das amostras de *E. coli* não transformada (*E.coli\_Ø*) e *E. coli* transformada, induzida por IPTG (*E.coli\_RegB*), e das possíveis frações contendo r-potDomB puro foi feita utilizando o “Pierce™ BCA ProteinAssay Kit” (ThermoScientific, Pierce Biotechnology, USA). Este sistema quantitativo combina a redução de ions  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  por proteínas em meio alcalino (reação de biureto) com uma sensível e seletiva detecção do cátion cuproso e das ligações peptídicas pelo ácido bicinconínico (BCA), com a formação do complexo colorimétrico com absorvância em 562 nm.

Alíquota de *E.coli\_Ø* (100 µg de proteína total), *E.coli\_RegB* (100 µg de proteína total) ou r-potDomB puro (1 ou 5 µg) foi solubilizada em tampão de amostra para eletroforese e submetida a SDS-PAGE 18%, seguida de coloração pelo Coomassie Brilliant Blue R-250 (NEUHOF *et al.*, 1988) ou eletrotransferência das proteínas para membranas de nitrocelulose (Amersham Hybond ECL 0,2 µm, GE Healthcare) por 20 min a 100 V. Marcadores de peso molecular (*Low-Range Rainbow Markers*, 3.500 – 38.000 Da: GE Healthcare Life Sciences; *Peptide Marker Kit*, 2.512-16.949: Sigma) foram também aplicados.

Após o bloqueio das membranas de nitrocelulose em tampão fosfato 10 mM (PBS), pH 7,6, suplementado com caseína 1% por 2 h sob agitação, as proteínas foram incubadas por 1 h com anticorpos de camundongo anti-his (1:2.000) ou soro imune policlonal de camundongo BALB/c contendo anticorpos anti-apirase de batata (1:2.000; MAIA *et al.*, 2011). Após este período, as membranas foram lavadas 3

vezes por 10 min com PBS acrescido de Tween 20 0,1%, e incubadas por 1 hora com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo acoplados à peroxidase, diluídos 1:10.000 em PBS. Em seguida, as membranas foram novamente lavadas como já descrito, retirando o Tween 20 da última lavagem. A revelação foi realizada por quimioluminescência utilizando o luminol como substrato (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent; GE Healthcare Life Sciences), e os sinais foram detectados em filmes de raio-X (Hyperfilme ECL; GE Healthcare Life Sciences).

### **3.2 Clonagem da NTPDase 1 de *L. amazonensis***

#### *3.2.1 Extração do DNA genômico*

Para a clonagem do gene da NTPDase de *L. amazonensis* foi utilizado o DNA genômico da cepa de referência MHOM/BR/1973/M2269. As formas promastigotas do parasito foram cultivadas em meio Schneider, sendo coletadas em sua fase exponencial de crescimento, lavadas 3 vezes em solução tampão salina-fosfato (PBS) e centrifugadas a 500 g por 15 min. O DNA genômico foi extraído utilizando um kit de purificação (*Wizard Genomic DNA Purification System*, Promega, USA), conforme as instruções do fabricante. Brevemente, após lavagem com PBS, os protozoários precipitados foram ressuspendidos em tampão de lise celular, homogeneizados e incubados por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida foi realizada uma centrifugação a 14.000 g por 5 min, sendo o “pellet” ressuspendido em outro tampão de lise, capaz de romper a membrana nuclear, promovendo a liberação efetiva do material genético. Ao homogeneizado resultante foi adicionada RNase para a devida eliminação dos ácidos ribonucléicos e, após adição de uma solução tampão, o sobrenadante foi obtido por centrifugação a 13.000 g por 3 min e armazenado a -80 °C até o momento do uso. A cepa de referência MHOM/BR/1973/M2269 e seu DNA genômico foram gentilmente doados pelo Dr. Marcos José Marques do Departamento de Biologia da UNIFAL/MG.

### 3.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase

Para a amplificação do gene de interesse, foram desenhados iniciadores direto (5'ggATCCCATgTgACTCggCgTAC; BamHI) e reverso (5'gAATTCTCATTCCATCTTgAgCaggAAgg; EcoRI) associados a sítios de restrição, desenhados com base nas sequências das NTPases hipotéticas de *L. major* (XM\_001681865.1) e *L. infantum* (XM\_001464304.1) depositadas no NCBI. A idealização destes oligonucleotídeos sintéticos e todas as etapas subseqüentes foram realizadas com a colaboração da Dra. Melissa Regina Fessel, pesquisadora do CNPEM/Campinas/São Paulo.

Utilizando o DNA genômico de *L. amazonensis* (gDNA) e os iniciadores sintéticos foi realizada a amplificação da sequência nucleotídica da hipotética NTPDase 1 em termociclador GeneAmp 2400 (Applied Biosystems), usando a mistura reacional composta de gDNA 1 ng/μl, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, dNTP 200 μM, F\_NTPD 0,5 μM, R\_NTPD 0,5 μM e DNA polimerase Taq Platinum (5 U; Invitrogen). A amplificação da sequência de interesse foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida por 25 ciclos de 30 s a 95 °C (desnaturação), 45 s a 55 °C (anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores) e 1 min a 72 °C (extensão) e, após, uma etapa adicional de extensão por 7 min a 72 °C. Posteriormente, o produto desta reação foi colocado em tampão de amostra contendo brometo de etídio e analisado em gel de agarose 2%, sob luz ultravioleta, na presença de padrão de peso molecular (100 bp DNA Ladder, Promega, USA).

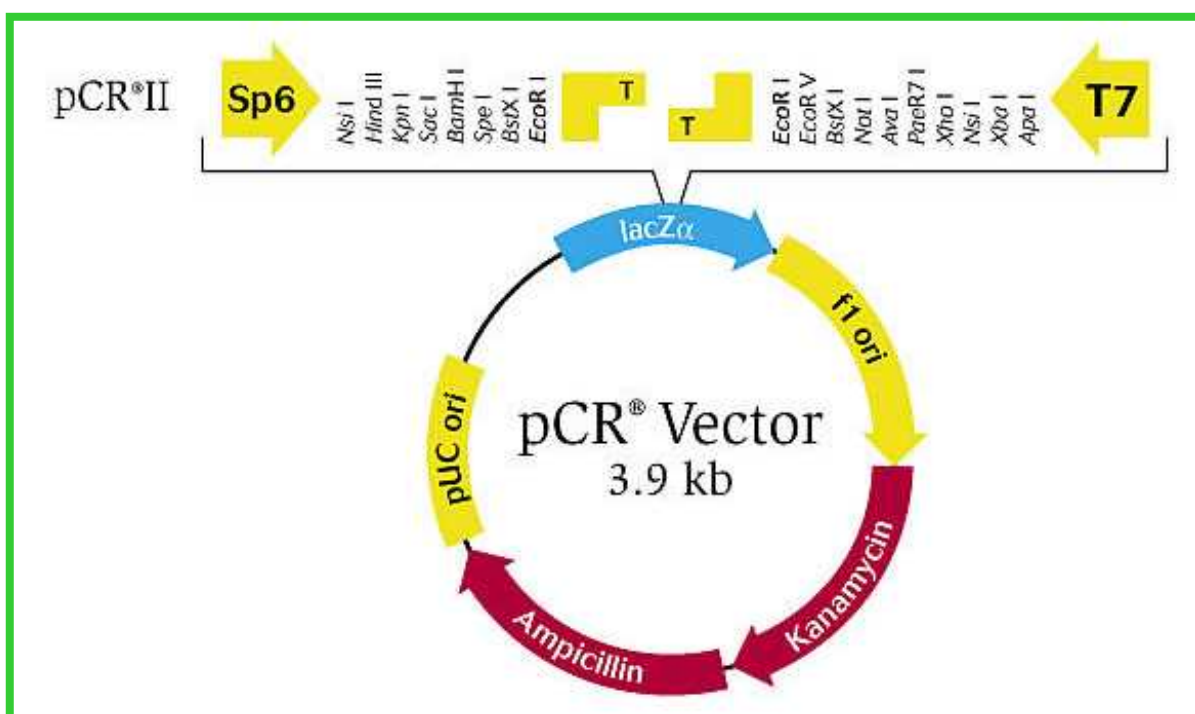
O produto de PCR de interesse foi então purificado do gel utilizando-se o *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente o fragmento de gel contendo o fragmento de interesse foi cortado do gel e devidamente pesado, sendo adicionado 1 μl do tampão de ligação para cada 1 mg de amostra. A amostra foi incubada por 10 min a 50 °C sob agitação para a completa solubilização do gel, permanecendo a solução amarela, um indicativo do correto pH < 7,5 para o processamento subseqüente. Em seguida, esta solução foi aplicada em microcoluna de sílica acoplada a um tubo centrífuga, e após 1 minuto da aplicação, o conjunto foi submetido à centrifugação a 10.000 g durante 1 min. O DNA ficou adsorvido na sílica e o sobrenadante foi descartado, sendo a coluna lavada com 500 μl de tampão de lavagem e novamente submetida à centrifugação

por 1 min a 10.000 g. A coluna foi transferida para um novo tubo, sendo o DNA eluído pela adição de 50 µl do tampão de eluição (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5) seguida de centrifugação a 10.000 g por 30 segundos.

O fragmento purificado foi então inserido no vetor de clonagem pCRII [TA Cloning® Kit Dual Promoter (pCR®II), Invitrogen, Figura VII] de acordo com as instruções do fabricante, por meio da adição do produto de PCR purificado de interesse em tampão contendo o vetor pCRII e a T4 DNA Ligase, com incubação por 14 h a 4 °C. O produto desta ligação foi utilizado para transformação de células competentes de *E. coli* DH5 por eletroporação como previamente descrito. Após este procedimento, adicionou-se 1 ml de meio SOB, seguido de incubação por 30 min a 37 °C sob agitação, para que as bactérias se recuperassem do estresse sofrido. As células foram, em seguida, plaqueadas em meio LB sólido, contendo ampicilina e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- -D-galactopiranosídeo), este último um substrato da -galactosidase que permanece íntegro na presença do inserto correto, promovendo o crescimento de colônias brancas. Colônias azuis foram indicativas de inserção do plasmídeo pCR®II vazio (sem o gene de interesse), o qual permite a expressão de -galactosidase apta a degradar X-gal, com a produção de um cromógeno azul.

Cada colônia identificada como positiva foi expandida durante 12 h a 37 °C em meio LB sob agitação (200 rpm), centrifugada a 12.000 rpm por 15 s, sendo o sobrenadante descartado. O precipitado obtido de cada colônia foi ressuscitado em tampão hipotônico Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, contendo EDTA 10 mM e glicose 50 mM sob agitação. Para promover a lise das células, foram adicionados (1) lisozima (2 mg/ml), seguido de incubação em gelo por 10 min; (2) NaOH 200 mM e SDS 1%, e incubação por 5 min em gelo e (3) acetato de sódio 1 M, e incubação por 15 min em gelo. O DNA genômico da bactéria foi então precipitado por centrifugação a 12.000 rpm por 5 min, e o sobrenadante resultante foi submetido a nova centrifugação (12.000 rpm por 5 min) na presença de etanol absoluto gelado para o isolamento do DNA plasmidial. Após precipitado e lavado, o DNA plasmidial originário de cada colônia foi ressuscitado em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM sob agitação e, em seguida, submetido à digestão por enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* (NEB, New England Biolabs, UK), sendo o produto da digestão e o plasmídeo não-digerido submetidos à eletroforese em gel de agarose

2%. Os clones positivos foram submetidos ao sequenciamento de nucleotídeos, com o kit BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing Kit (Applied Biosystems, USA), usando primers Sp6 e T7 que anelam, respectivamente, nos promotores Sp6 e T7 presentes no vetor pCRII, em sequenciador da Applied Biosystems (modelo 3130xl). As seqüências obtidas foram analisadas usando o software Data Collection 3.0 e o Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems, USA).



**Figura VII. Vetor de clonagem (TA Cloning® Kit Dual Promoter; pCR®II).** O vetor pCR®II permite a amplificação da seqüência de interesse *in vivo* para posterior seqüenciamento. A triagem de bactérias transformadas por este vetor ocorre por crescimento de colônias brancas, indicativas da presença do inserto. Na ausência do inserto, há expressão de lacZ, capaz de degradar o substrato X-Gal e gerar um cromôgeno, promovendo o crescimento de colônias azuis. O plasmídeo também apresenta o gene de resistência a canamicina e ampicilina; pUCori, o qual permite a replicação, manutenção e um alto número de cópias em *E. coli*; Sp6 e T7, os quais permitem o sequenciamento do inserto; f1 ori, o qual permite o sequenciamento da fita simples.



### 3.2.3 Análises in silico

A sequência de nucleotídeos foi submetida a análises usando ferramentas de bioinformática, as quais permitiram (A) a identificação do amplificado (*nucleotideblast*; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); (B) a tradução dos códons de nucleotídeos e a resultante sequência de aminoácidos (*ExpASy-Bioinformatics Research Portal*; [http://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna\\_aa](http://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna_aa)); (C) o alinhamento múltiplo de sequências primárias de NTPDases de diferentes espécies de *Leishmania* (*Clustalw*, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>; GeneBee, [http://www.genebee.msu.su/services/malign\\_reduced.html](http://www.genebee.msu.su/services/malign_reduced.html)), obtidas nos bancos de dados do NCBI. Depois de identificada, a sequência de nucleotídeos foi submetida ao NCBI para anotação em seu banco de dados.

## 3.3 Localização subcelular da NTPDase 1 de *L. amazonensis*

### 3.3.1 Fracionamento de promastigotas de *L. amazonensis*

A cepa de *L. amazonensis* H21 MHOM/BR/76/MA foi isolada de um paciente com leishmaniose cutânea difusa, sendo a identificação do parasito realizada por caracterização de isoenzimas e kDNA. Esta cepa tem sido mantida *in vivo* por uma série de passagens em camundongos no Laboratório de Protozoologia e Imunomodulação do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ (GONÇALVES-DA-COSTA e LAGRANGE, 1981; SCHOTELIUS e GONÇALVES-DA-COSTA, 1982; GRIMALDI JR *et al.*, 1991).

Formas promastigotas deste parasito foram centrifugadas em sua fase logarítmica de crescimento ( $10^6$  parasitos/ml), lavadas três vezes em Tris-HCl 5 mM estéril, pH 7,4, a 4 °C, com centrifugação intercalada a 2.500 rpm por 15 min. Para o preparo do homogeneizado total (TH), os promastigotas foram ressuspensos em tampão Tris-HCl 5 mM, pH 7,4, sacarose 8% suplementado com inibidores de proteases. O rompimento do parasito foi realizado por 3 ciclos de choque térmico,

alternando incubação em nitrogênio líquido e banho maria a 37 °C, seguido de incubação por 30 min em banho ultrassom. Uma alíquota desta preparação (TH) foi estocada a -80 °C até o momento do uso.

Em outro procedimento, promastigotas de *L. amazonensis* foram submetidos a fracionamento subcelular como previamente descrito por Zaverucha do Valle *et al.* (2007). Brevemente, após lavagem, as formas promastigotas foram ressuspensas em meio hipotônico permanecendo incubadas por 20 min em banho de gelo, sendo realizado em seguida o rompimento da membrana por ação mecânica em um homogeneizador tipo Dounce (Konté Glass, EUA) na presença de lubrol-PX 10%. A eficiência do rompimento foi acompanhada por microscopia óptica, sendo as células íntegras restantes eliminadas por centrifugação (High Performance Centrifuge, BeckmanCoulter, USA) a 750 *g* por 2 min. A preparação foi centrifugada duas vezes a 10.000 *g* por 10 min, e os “pellets” foram purificados em um gradiente linear de sacarose e estocado como fração de flagelo (FF), constituída de estrutura axonemal e paraflagelar associados, e ausência de membrana. O sobrenadante foi centrifugado novamente a 27.000 *g* por 30 min para obter um “pellet” de fração de membrana (MF), a qual não formou vesículas e apareceu associada com microtúbulos subpeliculares. Finalmente, alíquotas do sobrenadante foram depositados no topo de tubos plásticos contendo Tris HCl 10 mM, pH 7,4, sacarose 20%, MgCl<sub>2</sub> 10 mM e KCl 25 mM. O material foi centrifugado a 100.000 *g* por 30 min em um rotor “swing”, sendo a fração microsomal (Fm) recuperada do “pellet”, uma fração enriquecida de ribosomos contendo uma menor quantidade de membrana (ZAUERUCHA DO VALLE *et al.*, 2007). Todas as frações foram ressuspensas em tampão Tris-HCl 5mM, pH 7,4, suplementado com sacarose 8% e inibidores de proteases (leupeptina 0,5 µg/ml, pepstatina 0,07 µg/ml, tripsina 0,05 µg/ml e PMSF 2 µg/ml), e armazenados a -80 °C até o momento do uso.

### 3.3.2 Eletroforese em gel de poli(acrilamida) e SDS (SDS-PAGE) e “Western blots”

Alíquota (100 µg) de homogeneizado total (TH), fração de membrana (MF), fração de flagelo (FF) ou fração microsomal (Fm) foi solubilizada em tampão de amostra para eletroforese (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, glicerol 2%, SDS 0,2%, -

mercaptoetanol 2% e azul de bromofenol 0,1%) e aplicada em gel de poliacrilamida 10% e SDS 0,1% (SDS-PAGE 10%), segundo método descrito por Laemmli (1970), usando o sistema Mini-Protean III Cell (Bio-Rad Laboratórios, São Paulo, Brasil). Marcadores de peso molecular *High-Range Rainbow Markers* (12.000 – 225.000 Da, GE Healthcare Life Sciences) foram também aplicados. As proteínas do gel foram coradas por Coomassie blue ou eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond-C Extra, Nitrocellulose, 45 µm; Amersham Biosciences) a 100 V por 1 h.

Após a etapa de bloqueio (PBS suplementado com caseína 1% e Tween 20 0,1%), as membranas foram incubadas neste mesmo tampão por 1 h com anticorpos policlonais de camundongo anti-r-potDomB (MAIA *et al.*, 2011; 1:400), anti-LbB1LJ (1:200) ou anti-LbB2LJ (PORCINO *et al.*, 2012; 1:200) durante 12 h. A membrana foi lavada em PBS acrescido de Tween 20 0,1% (PBS-T; 6 lavagens de 5 min cada) e em seguida com PBS sem Tween 20 (2 lavagens de 5 min cada). A incubação com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo acoplado à enzima peroxidase (Sigma Aldrich, Brasil) foi realizada por 1 h 30 min na diluição 1:1.000, seguido de lavagem com PBS-T por 7 vezes, e PBS na última lavagem. A revelação foi realizada por quimioluminescência utilizando o luminol como substrato (*ECL Western Blotting System*; GE Healthcare, Brazil), e os sinais foram detectados em filmes de raio-X (Hyperfilme ECL; GE Healthcare Life Sciences).

### 3.3.3 *Imunolocalização da NTPDase1 de L. amazonensis por microscopia eletrônica*

Para análise ultraestrutural por microscopia eletrônica, os promastigotas de *L. amazonensis* foram centrifugados (2500 rpm por 10 min) em sua fase logarítmica de crescimento, lavados 3 vezes em PBS. Posteriormente foram fixados e incubados por 1 h a 4 °C em tampão cacodilato de sódio 100 mM, pH 7,2, contendo paraformaldeído 4%, glutaraldeído 0,1% e ácido pícrico 0,2%. Os parasitos foram lavados no mesmo tampão e posteriormente em PBS, sendo em seguida, desidratados em concentrações crescentes de metanol e incluídos em resina Lowicryl K4M (Polysciences, Inc., PA, USA). Após polimerização sob luz ultravioleta, os blocos foram submetidos a corte ultrafino em micrótomo, sendo os cortes recolhidos em grades de níquel (300 mesh) que foram incubadas durante 30 min à

25 °C em PBS 100 mM, pH 8,0, acrescido de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM. Os cortes ultrafinos foram visualizados ao microscópio eletrônico para verificar a integridade dos protozoários.

As grades devidamente selecionadas foram incubadas durante 10 min à temperatura ambiente em PBS contendo albumina bovina 3% e Tween 20 0,2%, pH 8,0, e em seguida incubadas na presença de soro imune anti-r-potDomB (1:200), anti-LbB1LJ (1:100), anti-LbB2LJ (1:100) ou soro pré-imune diluído 1:100 ou 1:200 por 12 h. Após incubação, as grades foram lavadas em PBS acrescido de Tween 20 0,2% e, finalmente, incubadas durante 60 min com anticorpos de cabra anti-camundongos conjugados com partículas de ouro coloidal (10 nmol; Sigma Chemical, EUA), na diluição 1:20. Os cortes foram contrastados com acetato de uranila para a devida localização dos imunocomplexos de ouro coloidal. Amostras expostas apenas aos anticorpos secundários ou ao soro pré-imune e anticorpos secundários, submetidos às mesmas condições experimentais, foram usados como controles negativos. As imagens foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 da Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, com a colaboração da Dra. Suzana Corte Real, do Laboratório de Biologia Estrutural, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ.











### **3.5 Avaliação da reatividade de anticorpos com o domínio B durante a progressão da infecção em camundongos infectados com *L. amazonensis***

#### *3.5.1 Animais e protocolos de infecção*

Camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade foram obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ) e mantidos em biotério experimental sob condições controladas. Os animais foram separados em dois grupos: (1) Controle, subcutaneamente inoculados com 50 µl de PBS no coxim plantar direito; (2) Infectados, inoculados subcutaneamente com 50 µl de PBS contendo  $10^6$  promastigotas de *L. amazonensis* no coxim plantar direito. A cinética da lesão foi monitorada nos camundongos infectados por meio da medida do tamanho do edema aos 20, 40, 60, 90 e 120 dias após infecção, com auxílio de um paquímetro (Schnelltaster, H.C. Kröplin, GMBH, Hessen, Germany) como previamente descrito (ABREU-SILVA *et al.*, 2004). O tamanho das lesões foi expresso como a diferença entre a espessura do edema da pata de cada camundongo do grupo experimentalmente infectado e a do grupo controle. Os resultados foram expressos como a média aritmética de oito animais, e o erro padrão da média foi calculado e estatisticamente comparado pelo teste de Tukey. Amostras de sangue foram coletadas aos 12, 20, 40, 60, 90, e 120 dias após a infecção. Todos os experimentos foram conduzidos sob aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais de Laboratório da FIOCRUZ (CEUA-FIOCRUZ; processo nº L. 001/07; ver Anexo A).

#### *3.5.2 Análise de anticorpos por ELISA*

Para os ensaios de ELISA foram utilizados, como antígenos, o domínio B recombinante da apirase de batata (r-potDomB; item 3.1) ou os peptídeos sintéticos originados do domínio B conservado de *L. braziliensis* LbB1LJ e LbB2LJ obtidos por síntese em fase sólida (PORCINO *et al.*, 2012). Alíquota (5 µg/poço) de r-potDomB, LbB1LJ ou LbB2LJ solubilizada em tampão NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 9,6, foi incubada em

placa de fundo chato contendo 96 poços (Costar 3590; Corning Inc., Corning, NY, USA) durante 12 h. Em seguida, foi realizada uma etapa de bloqueio com tampão fosfato (PBS), pH 7,2, acrescido de Tween-20 0,05% e caseína 1%. Após o bloqueio, soros de animais saudáveis e experimentalmente infectados foram testados diluídos 1:100, em duplicatas, em PBS suplementado com caseína 1%, e incubados durante 12 h a 4 °C. A revelação dos anticorpos ligados ao antígeno adsorvido na placa foi realizada com anticorpos específicos anti-IgG1 ou anti-IgG2a de camundongo acoplado à peroxidase (Sigma Chemical Co., MO, USA), e dicloreto de -fenilenodiamina (OPD)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como substrato. A reação enzimática foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 4 N, sendo a coloração resultante quantificada a 492 nm em um leitor de microplacas (Molecular Devices Corp., Menlo Park, CA, USA). Os valores de densidade ótica (D.O.) considerados foram calculados subtraindo os valores de D.O. obtidos de um “pool” de soros do grupo controle, usado como branco. As análises foram realizadas em três diferentes experimentos com uma variação inferior a 15% entre eles. Os dados foram analisados usando o teste Kruskal-Wallis (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA). Valores de P < 0,05 foram considerados significativos.















## **4 RESULTADOS**

### **4.1 OBTENÇÃO DO POLIPEPTÍDEO RECOMBINANTE r-potDomB**

Utilizando protocolos padrão de extração, fracionamento de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS (SDS-PAGE) e “Western blots” foi observada maior expressão do r-potDomB na fração solúvel (citossólica) da cultura bacteriana. Os parâmetros mais adequados à expressão do r-potDomB no citosol foram também avaliados por meio de variações na concentração e no tempo de exposição ao agente indutor (IPTG).

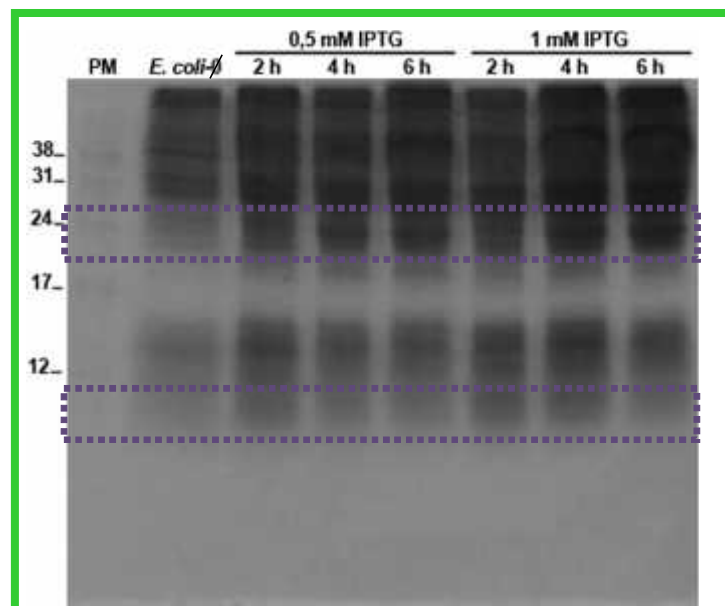
Para a realização de uma eletroforese comparativa entre as diferentes condições, uma alíquota retirada de cada cultura teve a sua densidade ótica mensurada (Tabela 1), e uma alíquota equivalente a D.O. 0,250 foi submetida à eletroforese (Figura 1; SDS-PAGE 18%). Por predição, o polipeptídeo recombinante (MRGSHHHHHHEYFMATEPGLSSYAEDPKAAANSLEPLLDGAEGVVPQELQ) tem massa molecular de 5.493 Da.

**Tabela 1. Avaliação de cultura de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com r-potDomB sob distintas condições.** Uma alíquota de 1 ml de cultura de *E. coli* foi obtida após 0, 2, 4 e 6 h de cultivo na ausência (Ø) ou presença de 0,5 mM ou 1 mM de IPTG. O crescimento da bactéria está expresso em densidade ótica (600 nm).

[IPTG]		Ø mM	0,5 mM	1 mM
Δt pós indução	0 h	0,500	0,566	0,422
	2 h	0,802	0,768	0,746
	4 h	0,878	0,835	0,817
	6 h	1,041	0,930	0,954

Após o fracionamento de proteínas por eletroforese e coloração por Coomassie blue, foi possível observar que as alíquotas retiradas de culturas de *E. coli* vazia, induzida ou não com IPTG, apresentaram perfil protéico similar (dados não mostrados). Em *E. coli* transformada e na ausência de IPTG (Tabela 1; 0 a 6 h), usada como controle, foi visualizado baixo enriquecimento de polipeptídeos na altura de 5-6 kDa (dados não mostrados), provavelmente devido a expressão inespecífica induzida pela lactose existente no extrato de levedura usado na preparação do meio de cultura.

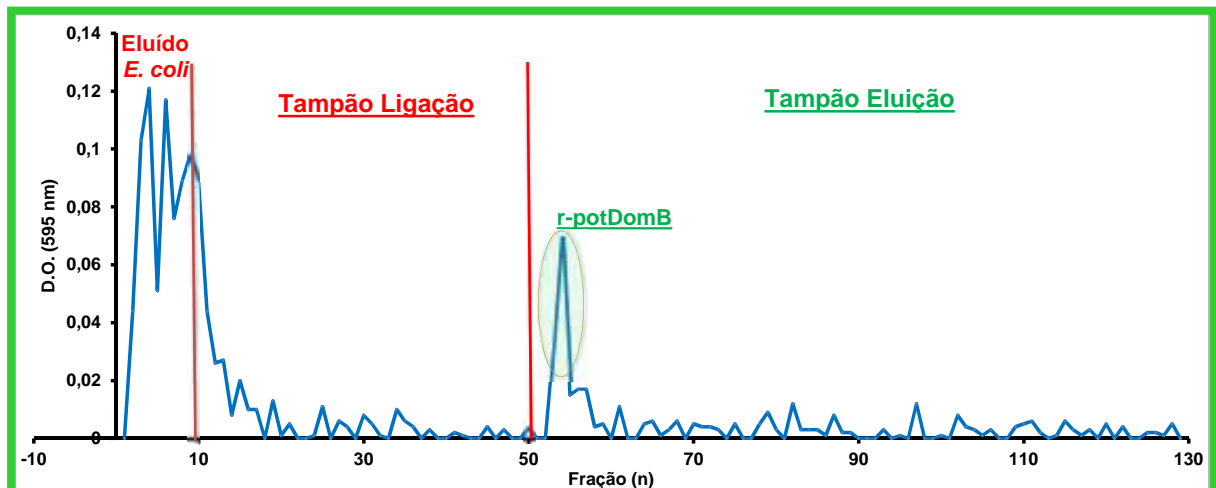
Por outro lado, as culturas induzidas com IPTG (2 a 6 h, 0,5 e 1 mM de IPTG) apresentaram maior abundância de peptídeos em torno de 6 e 24 kDa, evidenciando a possível expressão do domínio B (Figura 1). O cultivo de *E. coli* por 2 h sob a indução de 1 mM de IPTG foi a melhor condição encontrada (Figura 1; 1 mM IPTG, poço 2 h). Após 4 ou 6 h de cultivo, e com a adição de 0,5 ou 1 mM de IPTG, ocorreu diminuição da quantidade do polipeptídeo de ~6 kDa e, aparentemente, simultâneo aumento de bandas de ~24 kDa (Figura 1), sugerindo agregação do mesmo, uma ocorrência *in vivo* ou durante o preparo das amostras para eletroforese.



**Figura 1. Expressão do r-potDomB em *E. coli* BL21 (DE3) em condições distintas.** Uma alíquota (D.O. 0,250) de cultura de *E. coli* (Tabela 1) foi solubilizada em tampão de amostra e submetida a eletroforese (SDS-PAGE 18%) e coloração por *Coomassie blue*. As bandas de aproximadamente 6 e 24 kDa estão evidenciadas nas caixas pontilhadas.

Para a purificação de r-potDomB, o “pellet” bacteriano obtido após 2 h de cultivo na presença de 1 mM de IPTG foi lisado, e a formação de corpos de inclusão foi descartada, visto que o topo do “pellet” estava livre da típica camada de precipitado branco arenoso que é formada em sua presença. A ausência de viscosidade, indicando completa degradação de DNA, e o depósito de resíduo preto no fundo do tubo após centrifugação, foram indicadores do sucesso desta lise.

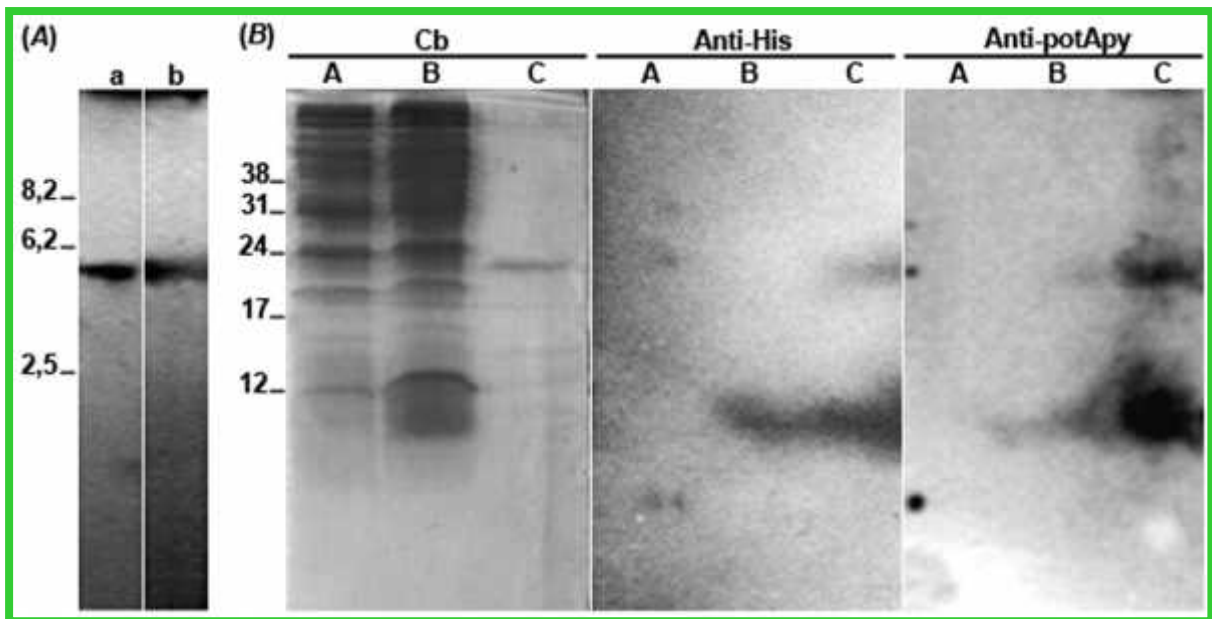
O sobrenadante, após filtrado, foi aplicado em coluna de afinidade, e o reagente de Bradford (BRADFORD, 1976) foi adicionado a uma alíquota de cada fração coletada, seguido de leitura espectrofotométrica (595 nm), o que permitiu o monitoramento do processo cromatográfico (Figura 2). Após eluição do sobrenadante (frações 1 a 10), as proteínas de *E. coli* adsorvidas ou ligadas com baixa afinidade à coluna foram também descartadas por lavagem com tampão contendo imidazol 20 mM (Figura 2; frações 11 a 50). Após a aplicação de tampão contendo imidazol 500 mM, os polipeptídeos de alta afinidade para os íons bivalentes do níquel foram eluídos nas frações 53 e 54, e em menor quantidade nas frações 55 a 60 (Figura 2).



**Figura 2. Purificação de r-potDomB por cromatografia de afinidade.** Após aplicação de alíquota de *E. coli* transformada com r-potDomB, a coluna His Trap HP Ni-Sepharose foi lavada com Tampão de Ligação (fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8, suplementado com NaCl 500 mM e imidazol 20 mM) e, em seguida, o polipeptídeo r-potDomB foi eluído da coluna por meio do Tampão de Eluição (fosfato de sódio 20 mM, pH 6, suplementado com NaCl 500 mM e imidazol 500 mM). A eluição foi monitorada pela adição de reagente de Bradford a uma alíquota de cada fração recuperada da coluna, seguida de leitura espectrofotométrica (595 nm), e os dados estão representados em densidade óptica (D.O.).

Alíquotas (100 µg) de homogeneizado de *E. coli* não transformada, *E. coli* transformada e induzida com IPTG expressando o polipeptídeo recombinante r-potDomB, e alíquotas de 1 µg de r-potDomB foram submetidas à SDS-PAGE 18% seguida de coloração por *Coomassie blue* (Cb) e eletrotransferência das proteínas para membranas de nitrocelulose (Figura 3, A e B).

A coloração por *Coomassie blue* (Figura 3 B, painel Cb) permitiu a visualização de maior quantidade de peptídeos em torno de 6 kDa e 24 kDa na *E. coli* transformada e induzida com IPTG (poço B) quando comparada com a bactéria não transformada (poço A), reproduzindo o resultado observado durante a padronização das condições ótimas para a expressão de r-potDomB (Figura 1, painel 1 mM IPTG, poço 2 h).



**Figura 3. Expressão e purificação de r-potDomB.** (A) Alíquotas de r-potDomB (1 µg; poços “a” e “b”) foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE 18% e eletrotransferência para membranas de nitrocelulose. Os “Western blots” foram desenvolvidos com anticorpos anti-histidina diluídos 1:2000 (a) ou soro policlonal de coelho anti-apirase de batata diluído 1:2000 (b). Em (B), alíquotas (100 µg de proteína total) de homogeneizado de *E. coli* não transformada (poços A) ou expressando r-potDomB (poços B), e alíquotas de r-potDomB puro (5 µg; poços C) foram submetidas à SDS-PAGE 18% seguida de coloração por *Coomassie blue* (Cb) ou eletrotransferência das proteínas para membranas de nitrocelulose. Os “Western blots” foram desenvolvidos com anticorpos anti-histidina diluídos 1:2000 (painel Anti-his) ou anti-apirase de batata diluídos 1:2000 (painel Anti-potApy). Os sinais foram revelados por quimioluminescência. Marcadores de peso molecular de 2,5-17 kDa (A) ou 3,5-38 kDa (B) foram também aplicados.

A coloração por *Coomassie blue* (dados não mostrados) e o “Western blot” de 1 µg de r-potDomB usando anticorpos anti-histidina (poço “a”) evidenciaram uma única banda de aproximadamente 6 kDa (Figura 3 A), identificando e confirmando a pureza do recombinante. Adicionalmente, anticorpos policlonais de coelho anti-apirase de batata (poço “b”) também foram reativos com r-potDomB, reafirmando sua identidade.

Em vista da aparente agregação de polipeptídeos percebida durante a padronização das condições ótimas para expressão de r-potDomB (Figura 1), alíquotas de 5 µg de r-potDomB puro foram também submetidas à SDS-PAGE 18% e coloração por *Coomassie blue*. Foi possível visualizar bandas de aproximadamente 6, 12, 18 e 24 kDa (Figura 3 B; painel Cb; poço C). As bandas de 6 e 24 kDa, predominantes, foram reconhecidas por anticorpos anti-histidina (painel Anti-His; poço C) ou anticorpos policlonais anti-apirase de batata (painel Anti-potApy; poço C), sugerindo a habilidade do polipeptídeo r-potDomB agregar-se *in vivo* ou durante a preparação das amostras, formando dímero, trímero e tetrâmero (Figura 3).

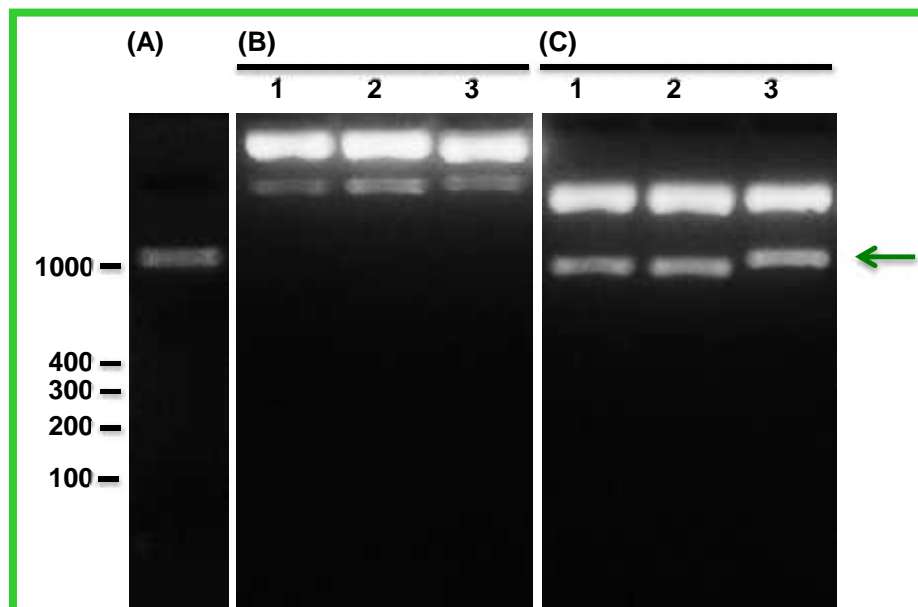
Por meio de cálculos de rendimento, foi verificado que é possível a obtenção de 600 µg de r-potDomB puro a cada litro de cultura de *E. coli* BL21 (DE3).

## 4.2 CLONAGEM E ANÁLISES *IN SILICO* DA NTPDase 1 DE *L. amazonensis*

As sequências de nucleotídeos das isoformas das NTPDases 1 de *L. major* e *L. infantum* obtidas dos respectivos genomas, já completamente descritos (PEACOCK *et al.*, 2007), foram referências para o desenho de oligonucleotídeos sintéticos, os quais foram usados como iniciadores para a clonagem do gene da NTPDase 1 de *L. amazonensis*, a partir de seu DNA genômico. Por meio de PCR seguido de eletroforese em gel de agarose, foi possível detectar a amplificação de 3 fragmentos contendo aproximadamente 2.000, 1.200 e 500 pb. Baseado na extensão gênica das NTPDases 1 de *L. major* e *L. infantum*, o produto de 1.200 pb

foi considerado como o possível gene codificante da NTPDase de *L. amazonensis*, enquanto aqueles de 2.000 e 500 pb, possivelmente resultados de amplificação inespecífica e/ou incompleta, foram descartados. O produto do PCR de interesse foi eluído do gel de agarose e o fragmento puro foi submetido à nova eletroforese (Figura 4 A).

Para amplificação *in vivo* da sequência gênica de interesse, ela foi inserida ao vetor de clonagem pCRII e, por eletroporação, em *E. coli* DH5 . Três colônias representativas de *E. coli* identificadas como positivas tiveram seu DNA plasmidial extraído (poços 1, 2 e 3), e submetido à digestão por EcoRI e BamHI e eletroforese em gel de agarose, resultando em 2 bandas de aproximadamente 4.000 e 1.200 pb, esta última referente ao fragmento esperado, confirmando a transformação da bactéria (Figura 4 C). O DNA plasmidial de cada um dos clones (poços 1, 2 e 3) não digerido, usado como controle, resultou em 2 bandas de alto peso molecular, possivelmente resultado de diferentes graus de enovelamento do DNA (Figura 4 B).



**Figura 4. Amplificação e clonagem da NTPDase 1 de *L. amazonensis*.** O DNA genômico de *L. amazonensis* foi usado como molde na amplificação por PCR com oligonucleotídeos sintéticos, desenhados a partir das sequências nucleotídicas das NTPDases de *L. major* e *L. infantum*. Um fragmento de aproximadamente 1200 pb (A) foi purificado e inserido em vetor de clonagem e usado para a transformação de *E. coli*. O DNA plasmidial de 3 clones positivos de *E. coli* (1, 2, 3) foi extraído e submetido a eletroforese em gel de agarose antes (B) e após a digestão com EcoRI e BamHI (C).

Os plasmídeos oriundos dos três clones positivos e os oligonucleotídeos sintéticos iniciadores foram usados para a amplificação e sequenciamento de nucleotídeos. Cada um dos clones resultou em uma sequência de 1.152 pb, as quais tiveram 100% de identidade entre elas. A remoção dos nucleotídeos usados como iniciadores para a amplificação do fragmento de interesse resultou em uma sequência de 1108 nucleotídeos, denominada Amplificado\_La, que é mostrada na Figura 5.

```

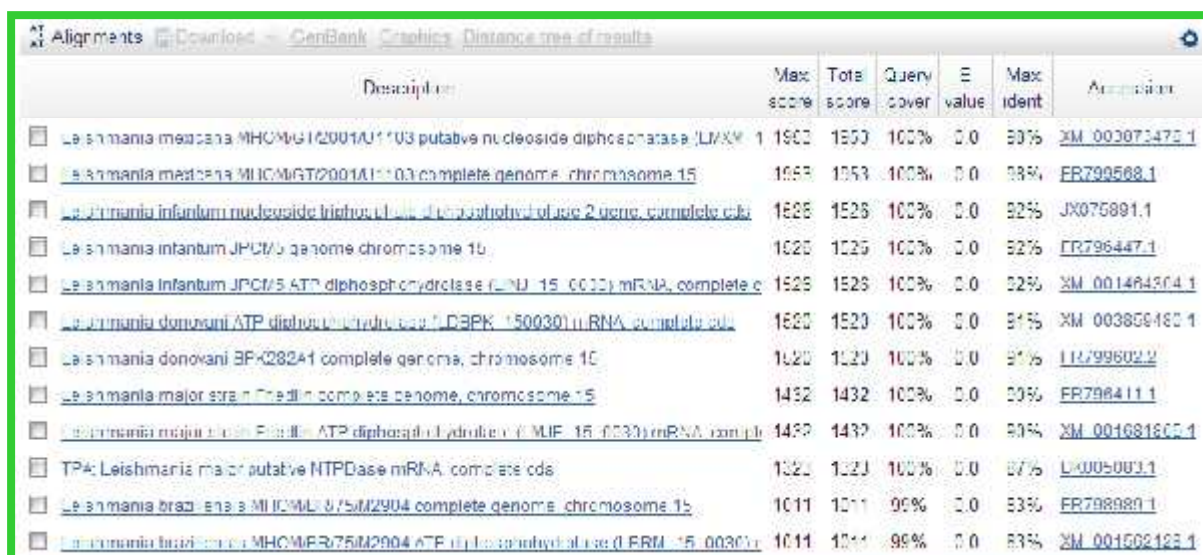
>Amplificado_La
GCGAACGTCT ACGACATCGT AATCGACGCC GGTAGCACTG GCTCACGTGT GCATGTGTTC      60
CAGTACGAGC GCAGCCGCAC CGGTGTGCGTA CTTCTGAAAG AGCGCTTCAA ACGTATAGAG    120
CCGGGTCTGT CCTCTTTTGC CACCGACCCG GACGGCGCCA AGGAGTCGCT TACGGGGCTC    180
CTGCGCTTTG CTGATGAGGT GGTCCCAGAA AGCTACCAGA GGTGCACCTC CGTCATCCTC    240
AAGGCTACCG CCGGCCTTCG GCTCCTACCT GAGTCCGACC AACAGGTGAT GCTGGACGCT    300
GCCCAGCAGG CACTCAACGC ATCTCCGTTT CAGTCTCGTG GCGCCTCCAT CATCTCTGGC    360
GCTCAAGAGG GCGTCTATGG GTGGCTGACG GTGAACTACC TACTGGACAG GCTCGACACG    420
GATGTTGCCA CCATCGCGAC CATCGATATG GGAGGTGCCT CGACACAGGT CGTCTTCGAG    480
ACGACGCCTA CGTCGGGAGA ATGGCTGCCC TTCAACTACG CCCACCAGCT GCGCATACTA    540
AAGCGCACCA TCTCCGTGTA CCAGCACAGC TACCTCGGCC TTGGGATGAA CGAGGCGAAA    600
AAGAAGCTGA TGACGTTGTT CGCTGAAGCG AACGGGACGT CGTCTTTCCC GTGCTTCCCG    660
AGAGGGTATA CGAAACACCT GAACGACGTG AAAC'TCGAA ACAATGACGC CACAGACTTT    720
GACGCGTGTG TAGGACTATT TCGCGAGCAT GTCATAACAA CGTCGACCTG CAGGTTTGAT    780
GCGTGTGGCG CGCGTGGCGT GCCGCAGCCG CTGTTTCCAT CAAGGCGGCA CCCCCTTTAC    840
GCCTTCTCCT ACTTTTATGA CCGACTCTAC CACTTCCACA AGGAGGGGAG GCCAGTCTAC    900
GTCTCGTTGT ACAAGGAGGT CGGGAAAGAG GTGTGCCACC GGAATCTGC GAGTCGGGCC    960
ACCACCCCTG AGGAAACGGC CTGCATGGAG CTGGCGTACC TGTACAGCTT CTTGACAAAC   1020
GGGCTAGGGC TTGGTGACGA CACGGCCCTC ACGGTGCCCA ACCGCATCGC GGGTATGTCA   1080
GTCTCCTGGT CTCTTGGGTC CTCTCTCT

```

**Figura 5. Sequência gênica codificadora da NTPDase 1 de *L. amazonensis*.** A clonagem da NTPDase 1 resultou em uma sequência nucleotídica de 1108 pb, a qual foi chamada Amplificado\_La.

Visando a confirmação de sua identidade, esta sequência (Figura 5) foi usada para buscas em bancos de dados do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Alta identidade (83-98%) foi encontrada com as sequências nucleotídicas codificadoras das NTPDases 1 de *L. mexicana*, *L. infantum*, *L. major*, *L. donovani* e *L. braziliensis* (Figura 6).

A sequência obtida foi então traduzida usando o “software Translate” do ExPASy (Bioinformatics Research Portal, [http://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna\\_aa](http://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna_aa)), resultando em um proteína de 369 aminoácidos (Figura 7; NTPDaseLa1). O alinhamento múltiplo (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) desta sequência protéica e de isoformas de NTPDases de *Leishmania* spp. existentes no banco de dados confirmou a alta identidade entre elas (80-98%) e a presença das 5 regiões conservadas (ACRs; “apyrase conserved regions”), características da família das NTPDases (Figura 7; NTPDaseLa1; ACRs 1 a 5).



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<a href="#">Leishmania mexicana MHC/MG1/2001AU1103 putative nucleoside diphosphatase (LMAX_1)</a>	1503	1503	100%	0.0	93%	<a href="#">XM_003873478.1</a>
<a href="#">Leishmania mexicana MHC/MGT/2001AU1103 complete genome, chromosome 15</a>	1503	1503	100%	0.0	93%	<a href="#">FR799588.1</a>
<a href="#">Leishmania infantum nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 ucnc, complete cds</a>	1525	1525	100%	0.0	92%	<a href="#">JX075891.1</a>
<a href="#">Leishmania infantum JPCU/0 genome, chromosome 15</a>	1525	1525	100%	0.0	92%	<a href="#">FR796447.1</a>
<a href="#">Leishmania infantum JPCU/5 ATP diphosphohydrolase (LINF_0032) mRNA, complete c</a>	1525	1525	100%	0.0	92%	<a href="#">XM_001464304.1</a>
<a href="#">Leishmania donovani ATP diphosphohydrolase (LDBPK_150030) mRNA, complete cds</a>	1520	1520	100%	0.0	91%	<a href="#">XM_003859480.1</a>
<a href="#">Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 10</a>	1520	1520	100%	0.0	91%	<a href="#">U799602.2</a>
<a href="#">Leishmania major strain Trinidad complete genome, chromosome 15</a>	1432	1432	100%	0.0	90%	<a href="#">FR796411.1</a>
<a href="#">Leishmania major L.01.10.11.1 ATP diphosphohydrolase (LMEF_15_0033) mRNA, complete c</a>	1432	1432	100%	0.0	90%	<a href="#">XM_001681865.1</a>
<a href="#">TP4: Leishmania major putative NTPDase mRNA, complete cds</a>	1321	1321	100%	0.0	87%	<a href="#">U005003.1</a>
<a href="#">Leishmania braziliensis MHC/MG1/075/M2904 complete genome, chromosome 15</a>	1011	1011	99%	0.0	93%	<a href="#">FR798980.1</a>
<a href="#">Leishmania braziliensis MHC/MFR/75/M2904 ATP diphosphohydrolase (LBRM_15_0030)</a>	1011	1011	99%	0.0	93%	<a href="#">XM_001562128.1</a>

**Figura 6. Sequências nucleotídicas de isoformas de NTPDases 1 de *Leishmania* spp.** Resultado da busca em banco de dados do NCBI usando a sequência gênica amplificada do DNA de *L. amazonensis*. Número de acesso no NCBI: *L. mexicana*, XM\_003873478.1; *L. infantum*, XM\_001464304.1; *L. major*, XM\_001681865.1; *L. donovani*, XM\_003859480.1); *L. braziliensis*, XM\_001562128.1.

Adicionalmente, como mostrado na Figura 8A, o alinhamento entre a NTPDase 1 de *L. amazonensis* (AFJ22627.1) e a apirase de batata (U58597.1) mostrou o grau de conservação existente entre elas (31% de identidade e 46% de similaridade). Dentre as regiões de maior conservação (A, C, E e F; 73-88% de identidade e 81-100% de similaridade), estão aquelas constituídas pelas regiões conservadas características das NTPDases. As regiões B, D e G foram também



identificadas como regiões de alta homologia (53% de identidade e 64% de similaridade).



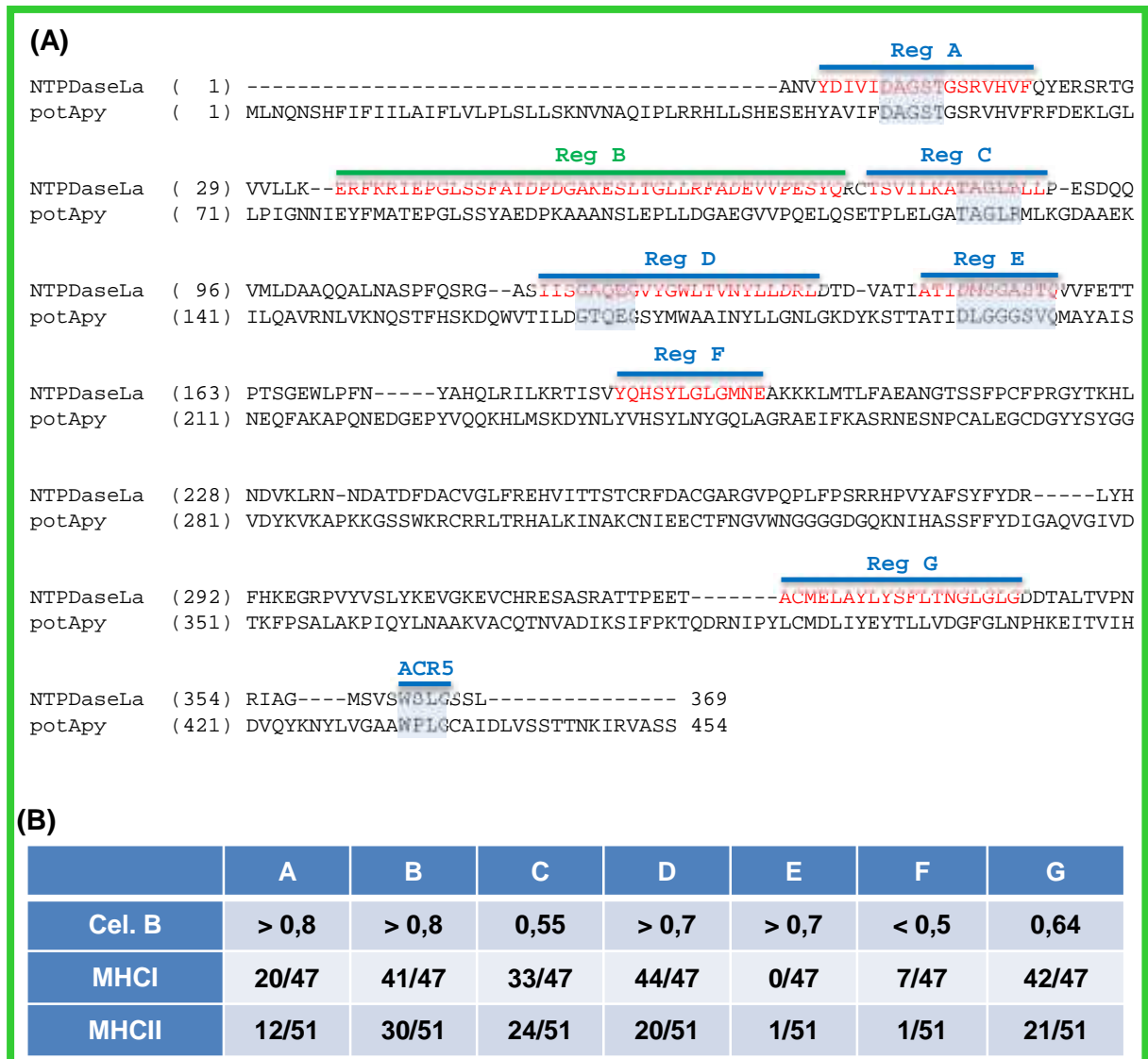
**Figura 7. Alinhamento de NTPDases 1 de *Leishmania* spp.** Alinhamento da isoforma NTPDase 1 obtida pela amplificação do DNA genômico de *L. amazonensis* mostrada neste trabalho (NTPDaseLa1) ou por seqüenciamento de seu cDNA (NTPDaseLa2) com isoformas de NTPDases de distintas espécies de *Leishmania*. As regiões conservadas da família das NTPDases (ACR1 a ACR5) são evidenciadas pelas barras e colunas azul, e o domínio B pela barra e coluna lilás. Na porção C-terminal, em negrito e vermelho, está um sítio passível de modificação pós-traducional (sumoilação). Os números para acesso no NCBI são: *L. amazonensis*, NTPDaseLa1, AFJ22627.1; NTPDaseLa2, AFJ75402.2; *L. mexicana*, NTPDaseLmx, XM\_003873478.1; *L. infantum*, NTPDaseLi, CAM66723.1; *L. major*, NTPDaseLmj, CAJ03227.1; *L. braziliensis*, NTPDaseLb, CAM42020.1. +, similaridade; \*, identidade.

Por predição, estas regiões da NTPDase do parasito, de alta identidade com a apirase de batata, foram identificadas como aptas a ligarem moléculas HLA (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred/index.html>; <http://www.imtech.res.in/raghava/propred1/index.html>; SINGH e RAGHAVA, 2001, 2003) e anticorpos com alto escore (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>; SAHA e RAGHAVA, 2006; Figura 8 B).

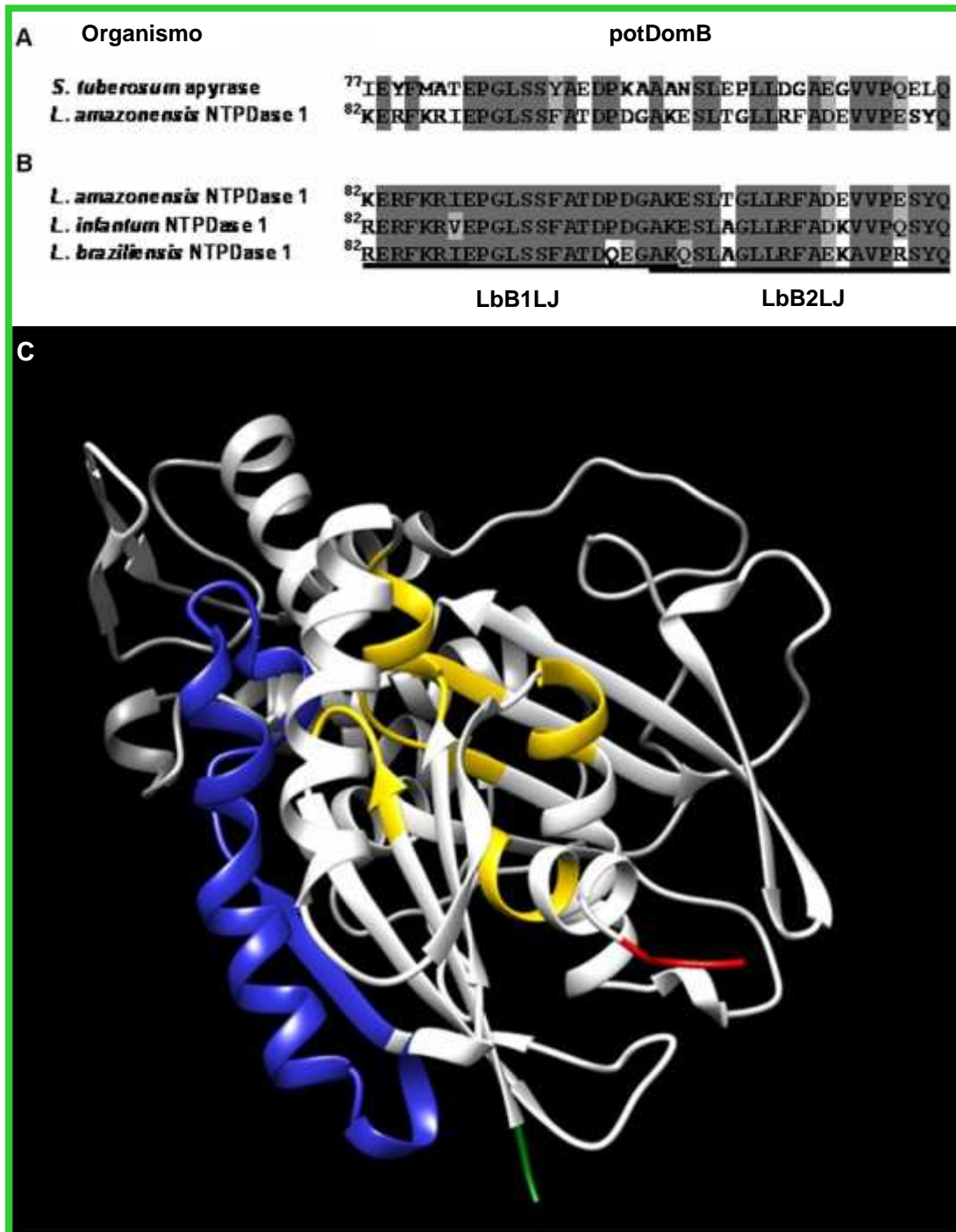
A região B (Figura 8 A), correspondente ao domínio B da NTPDase 1 de *L. amazonensis* e da apirase de batata, apresenta alta probabilidade de se ligar a anticorpos (> 0,8) e ao complexo de histocompatibilidade principal (MHCI e MHCII, 87% e 59%, respectivamente).

Após o alinhamento destas proteínas, a sequência de aminoácidos do domínio B foi editada manualmente. É interessante notar que o domínio B da NTPDase de *L. amazonensis* (r82-121) tem alta homologia (53% de identidade e 60% de similaridade em 40 aminoácidos) com o domínio B da apirase de batata (r78-117) (Figura 9 A) e, de acordo com a predição da estrutura tridimensional da proteína do parasito, é uma sequência em hélice e exposta, disponibilizando seus epitopos para a ligação com anticorpos (Figura 9 C). Alto grau de homologia foi também observado entre os domínios B das NTPDases de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (80% de identidade e 90% de similaridade em 40 aminoácidos) ou *L. infantum* (Figura 9 B; 90% de identidade e 98% de similaridade em 40 aminoácidos).

Como indicado pelas linhas pretas (Figura 9 B), os peptídeos sintéticos LbB1LJ (r82-103; 86% de identidade e 91% de similaridade em 22 aminoácidos) e LbB2LJ (r102-121; 70% de identidade e 80% de similaridade em 20 aminoácidos) abrangem o domínio B conservado (r82-121) da NTPDase 1 de *L. braziliensis* com sobreposição de dois aminoácidos no C-terminal do LbB1LJ e no N-terminal do LbB2LJ, compartilhando alta identidade com a região correspondente na NTPDase 1 de *L. amazonensis*.



**Figura 8. Análise das regiões conservadas entre a apirase de batata e a NTPDase 1 de *L. amazonensis*.** (A) Alinhamento entre a sequência primária da apirase de *S. tuberosum* (U58597.1) e da NTPDase 1 de *L. amazonensis* (AFJ22627.1). As regiões conservadas da família das NTPDases (ACR1 a ACR5) são evidenciadas pelas caixas azuis, e o domínio B pela barra verde (Reg B). Outros domínios com alta identidade e similaridade estão destacados em vermelho. (B) Predições de epitopos ligadores de células B, MHC I e MHC II presentes em domínios conservados entre a proteína vegetal e a NTPDase do parasito.



**Figura 9. Estudo estrutural da NTPDase 1 de *L. amazonensis*.** Alinhamento da estrutura primária do domínio B (**A**) da apirase de batata e sua região correspondente em *L. amazonensis* e (**B**) da NTPDase 1 de *L. amazonensis* e suas regiões correspondentes nas NTPDases de *L. braziliensis* e *L. infantum*. Os resíduos idênticos e similares estão destacados em cinza. A sequência de aminoácidos correspondente aos peptídeos sintéticos LbB1LJ (r-82-103) e LbB2LJ (r-102-121) estão indicadas por linhas pretas. Em (**C**), predição da estrutura tridimensional da NTPDase 1 de *L. amazonensis*, com evidências de seu N-terminal (vermelho), o qual contém o sítio de sumoilação; C-terminal (verde) e de seu domínio B (azul) (Emídio NB; arquivo do Laboratório de Estudo de Estrutura e Função de Proteínas). Número de acesso das sequências no NCBI: *Solanum tuberosum*, P80595; *L. amazonensis*, AFJ22627.1; *L. infantum* XP\_001464341.1; *L. braziliensis*, XP\_001562178.1.

### 4.3 IDENTIFICAÇÃO E LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA NTPDase 1 DE *L. amazonensis*

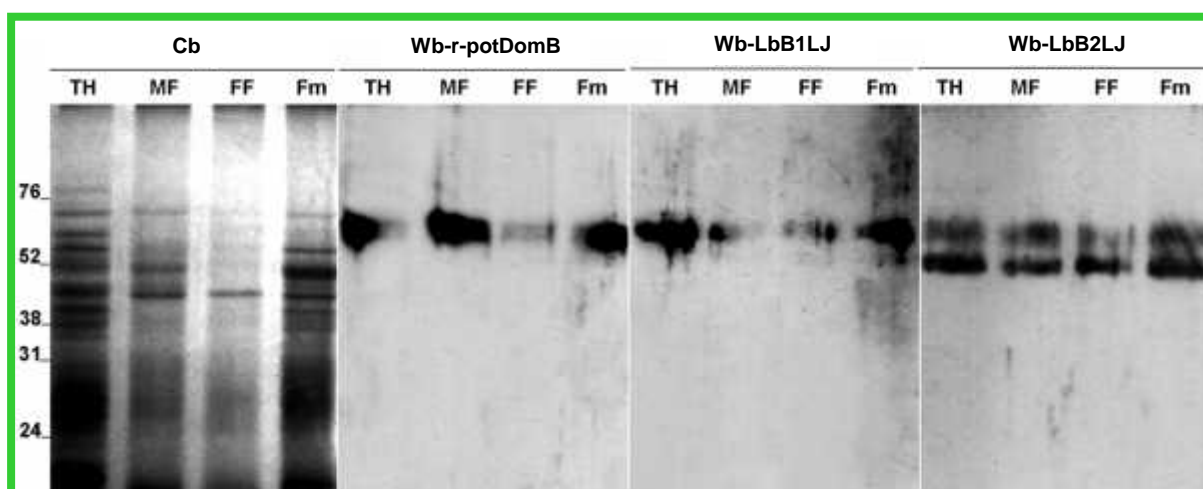
Alíquotas de homogeneizado total (TH) ou frações de membrana (MF), flagelo (FF) e microsomal (Fm) de promastigotas de *L. amazonensis* foram submetidas a eletroforese em SDS-PAGE 10% e coradas por *Coomassie blue*. Como mostrado na Figura 10 (Cb), diferentes perfis foram identificados entre as amostras, com ampla distribuição de polipeptídeos (20 a 76 kDa) em TH ou Fm, bandas majoritárias de 40 a 70 kDa na fração MF e de aproximadamente 40 kDa na fração FF, sendo alguns dos polipeptídeos compartilhados entre as 3 frações.

Por “Western blots”, o soro imune produzido contra r-potDomB, derivado do domínio B da apirase de batata, reconheceu as mesmas bandas difusas de aproximadamente 58-63 kDa na preparação total de promastigotas (TH), e nas frações de membrana (MF), microsomal (Fm) e flagelo (FF), sendo que nesta última a intensidade foi menor (Figura 10, Wb-r-potDom B).

O soro imune produzido contra LbB1LJ (Wb-LbB1LJ) ou LbB2LJ (Wb-LbB2LJ), os peptídeos derivados do domínio B da NTPDase 1 de *Leishmania*, reagiram com as mesmas bandas difusas de 58 a 63 kDa em “Western blots” de TH, MF, FF ou Fm (Figura 10), sugerindo enriquecimento destas proteínas na fração microsomal (Fm) como observado pela maior reatividade dos anticorpos anti-LbB1LJ (Figura 10; Wb-LbB1LJ). O soro imune policlonal anti-LbB2LJ reconheceu uma banda adicional de aproximadamente 48 kDa em todas as amostras de promastigotas (Figura 10; Wb-LbB2LJ; TH, MF, FF e Fm), possivelmente em menor quantidade do que aquelas de 58-63 kDa nestas preparações. Esta banda de 48 kDa foi também reconhecida pelo soro imune anti-LbB1LJ na fração microsomal (Figura 10; Wb-LbB1LJ, Fm), sugerindo novamente enriquecimento da proteína nesta amostra.

A intensidade de reatividade diferente detectada entre cada fração de promastigotas (MF, FF ou Fm) e os anticorpos anti-r-potDom B (Wb-r-potDomB), anti-LbB1LJ (Wb-LbB1LJ) ou anti-LbB2LJ (Wb-LbB2LJ) possivelmente está

relacionada com a afinidade e sensibilidade de cada soro imune para os epitopos expostos no domínio B (Figura 9 C) da proteína. Comparação com preparação total de promastigotas (Cb, HT) mostrou que as bandas de 48 kDa ou aquelas bandas difusas de 58-63 kDa detectadas por “Western blots” (Wb) não são as principais proteínas nas amostras fracionadas (Figura 10; Cb; MF, FF e Fm).

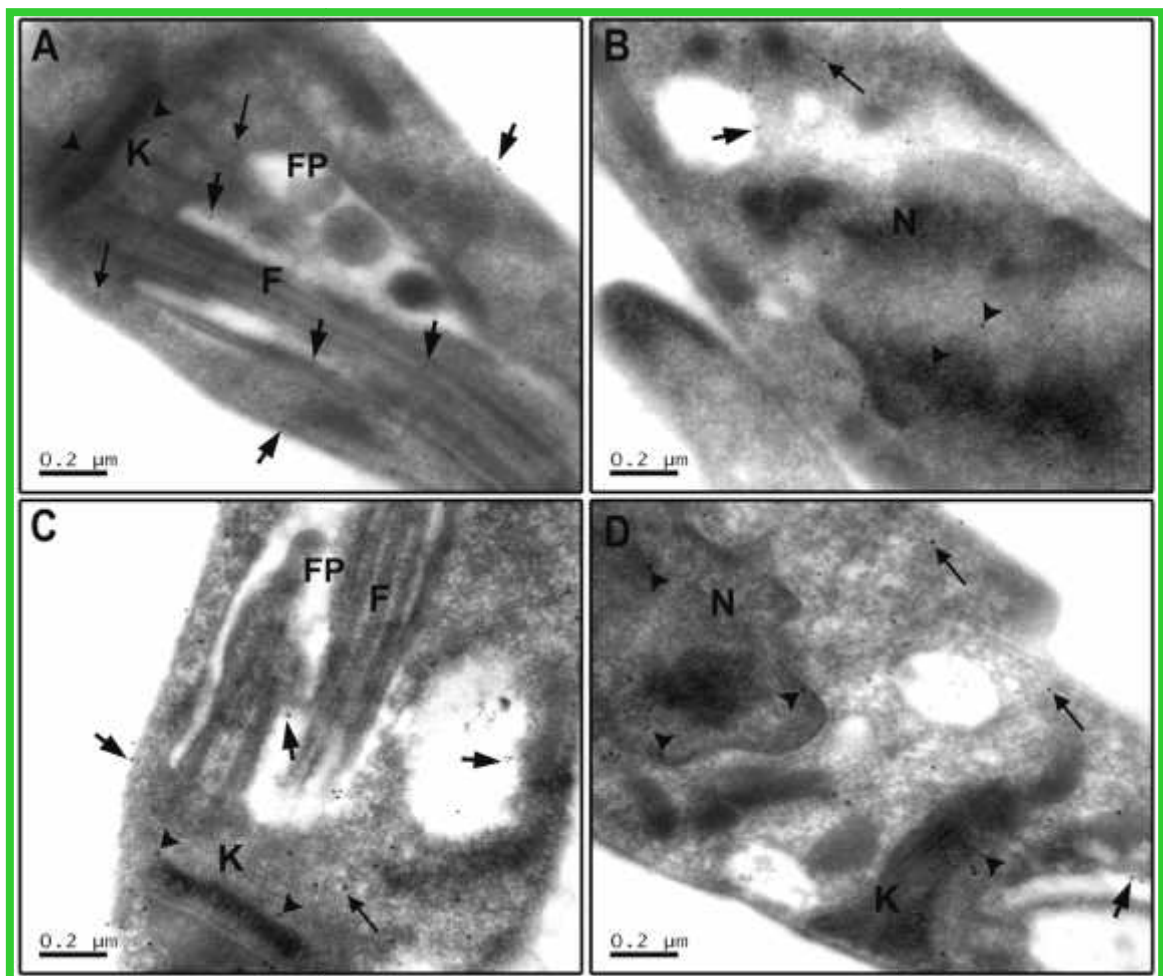


**Figura 10. Identificação da NTPDase 1 em promastigotas de *L. amazonensis*.** Aliquotas (100 µg de proteínas) de homogeneizado total de promastigotas (TH), e frações de membrana (MF), flagelo (FF) e microsomal (Fm) de *L. amazonensis* foram submetidas ao fracionamento por SDS-PAGE 10%, e as proteínas foram coradas por Coomassie blue (Cb) ou eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose. Para o “Western blot”, foi utilizado o soro imune anti-r-potDomB (Wb-r-potDomB; diluído 1:400), anti-LbB1LJ (Wb-LbB1LJ; diluído 1:200), ou anti-LbB2LJ (Wb-LbB2LJ; diluído 1:200). As membranas foram reveladas por quimioluminescência.

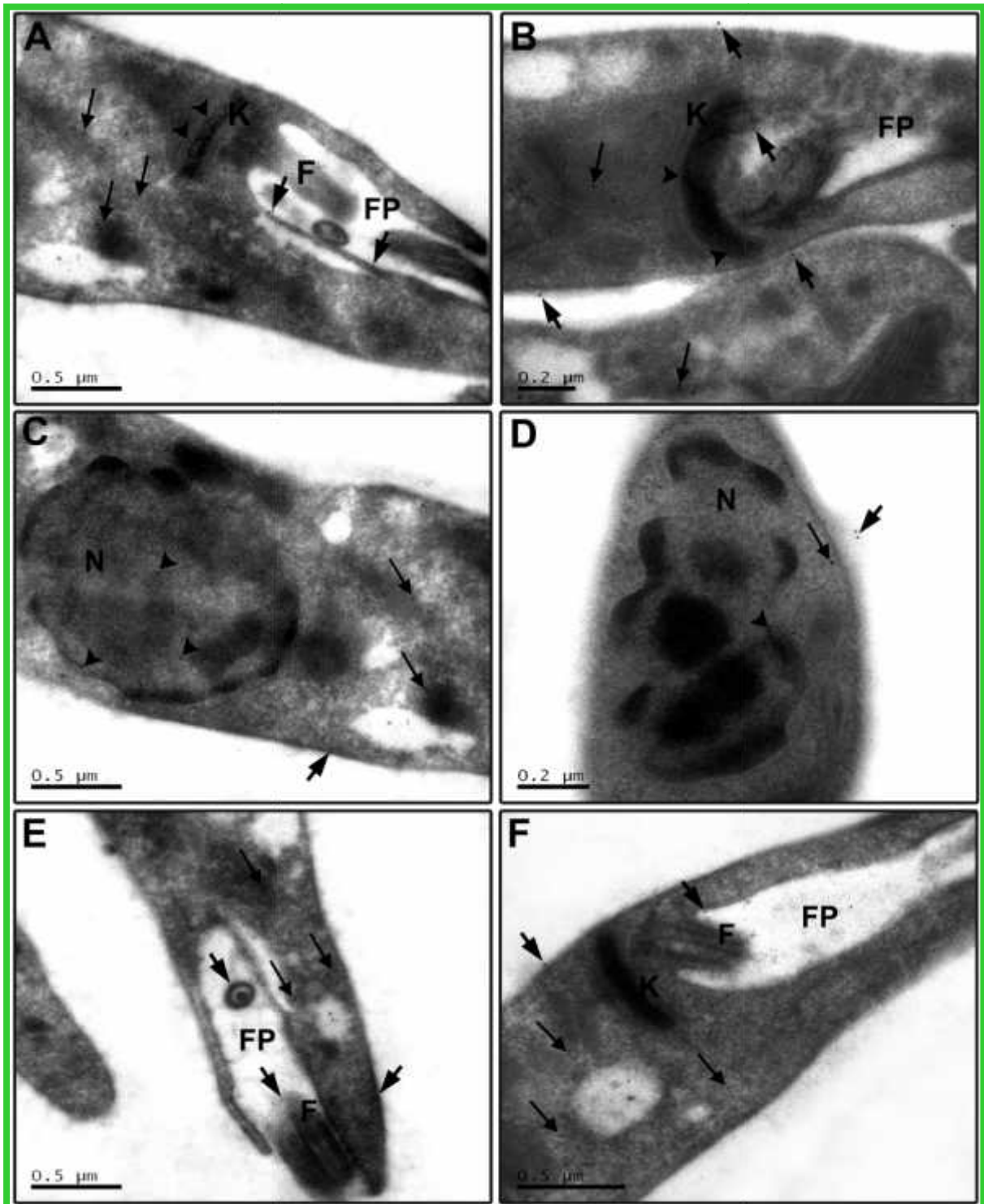
A ampla distribuição da NTPDase 1 de *L. amazonensis* nas frações investigadas instigou a realização de localização mais acurada desta enzima por meio de técnicas de imunocitoquímica e análise por microscopia eletrônica de transmissão. Inicialmente foram usados os anticorpos policlonais anti-r-potDomB (Figura 11), os quais identificaram esta proteína na superfície da membrana plasmática (A e C; setas); dispersa no núcleo (B e D; cabeças de seta), estando principalmente em regiões de cromatina densa; na mitocôndria (A, C e D; cabeças de seta), onde foi encontrada também associada com o cinetoplasto; na bolsa

flagelar e no flagelo (A, C e D), sendo também identificada dispersa no citoplasma e associada a vesículas citoplasmáticas (Figura 11).

Prova definitiva desta ampla localização da NTPDase 1 foi obtida por meio de ensaios imunocitoquímicos usando os soros imunes anti-LbB1LJ e anti-LbB2LJ (Figura 12), os quais – especificamente - identificaram esta proteína na superfície da membrana plasmática (B-F), núcleo (C, D), mitocôndria e cinetoplasto (A, B e F), na bolsa flagelar e flagelo (A, B, E, F), e associada com vesículas citoplasmáticas (Figura 12).



**Figura 11. Localização da NTPDase 1 em promastigotas de *L. amazonensis* por imunocitoquímica e microscopia eletrônica usando soro imune policlonal anti-r-potDomB e anticorpo secundário conjugado a partículas de ouro coloidal. Os imunocomplexos estão distribuídos na superfície da membrana plasmática (A e C, setas), núcleo (B e D; cabeça de seta), mitocôndria e cinetoplasto (A, C e D; cabeças de seta) e na bolsa flagelar e flagelo (A, C e D; setas). Flagelo (F); bolsa flagelar (FP); cinetoplasto (K) e núcleo (N).**



**Figura 12.** Localização da NTPDase 1 em promastigotas de *L. amazonensis* por imunocitoquímica e microscopia eletrônica usando soros imune anti-LbB1LJ (A, C, E), anti-LbB2LJ (B, D, F) e anticorpo secundário conjugado a partículas de ouro coloidal. Os imunocomplexos estão distribuídos pela superfície da membrana plasmática (B-F, setas), núcleo (C, D; cabeça de seta), mitocôndria e cinetoplasto (A, B, F; cabeças de seta) e na bolsa flagelar e flagelo (A, B, E, F; setas grandes). Flagelo (F); bolsa flagelar (FP); cinetoplasto (K) e núcleo (N).

















#### 4.5 O DOMÍNIO B DA NTPDase 1 DE *L. amazonensis* ESTÁ ASSOCIADO À PROGRESSÃO DA LEISHMANIOSE

Visando avançar nos estudos sobre a interferência do domínio B de NTPDases na resposta imune do hospedeiro, a progressão da doença em camundongos susceptíveis BALB/c infectados com *L. amazonensis* foi monitorada durante um período de 120 dias. O tempo de curso de aparecimento de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos reativos com r-potDomB, LbB1LJ ou LbB2LJ, durante a progressão, foi também avaliado. Como mostrado na Figura 16, a cinética da lesão dos camundongos mostrou um crescimento nodular progressivo aos 20, 40, 60, 90 e 120 dias após a infecção.

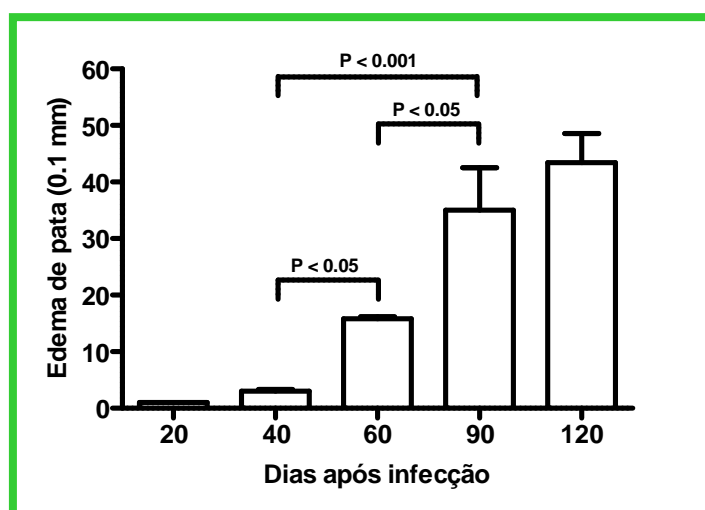


Figura 16. Cinética do edema formado no coxim-plantar de camundongos BALB/c infectados com  $10^6$  promastigotas de *L. amazonensis*. O aumento progressivo das lesões foi analisado pelo teste de comparação múltipla Tukey, e os valores  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

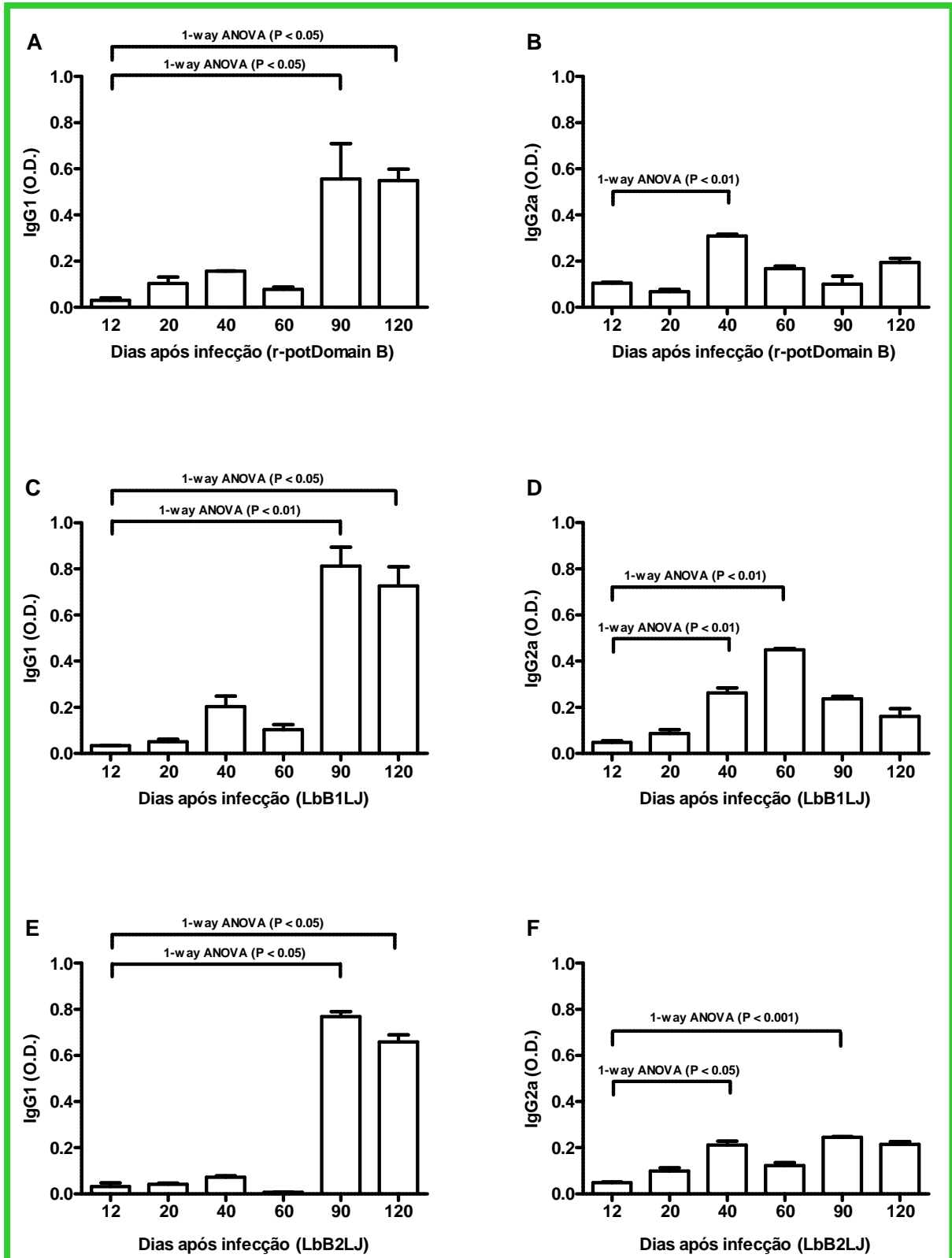
Baixa reatividade de anticorpos IgG1 com r-potDomB (A), LbB1LJ (C) e LbB2LJ (E) foi observada aos 20, 40 e 60 dias após a infecção com valores



permanecendo similares aos encontrados aos 12 dias (Figura 17). Aos 90 dias, a reatividade de anticorpos IgG1 contra cada antígeno aumentou significativamente, de 18 a 24 vezes, quando comparada ao 12º dia, permanecendo elevada mesmo aos 120 dias após a infecção (Figura 17; A, C, E).

Por outro lado, reatividade significativa de anticorpos IgG2a com r-potDomB foi observada aos 40 dias, cerca de 4 vezes maior do que aquelas encontradas no início da infecção, no 12º ou 20º dia (Figura 15B). Aos 60 e 90 dias pós-infecção, a reatividade de anticorpos IgG2a com o r-potDomB diminuiu, permanecendo levemente aumentada quando comparada ao 12º ou 20º dia (Figura 17 B).

Uma alta e significativa reatividade de anticorpos IgG2a com LbB1LJ foi evidenciada após 40 ou 60 dias de infecção, cerca de 3 a 9 vezes maior do que aquelas encontradas nos estágios iniciais, no 12º ou 20º dia (Figura 17 D), enquanto com LbB2LJ foi de 2 a 5 vezes maiores no 40º ou 90º dia da infecção (Figura 17 E).



**Figura 17.** Reatividade de anticorpos com r-potDomB, LbB1LJ ou LbB2LJ durante a progressão da doença em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. A reatividade de anticorpos IgG1 (A, C, E) ou IgG2a (B, D, F) foi quantificada por ELISA usando r-potDomB (A, B), LbB1LJ (C, D) ou LbB2LJ (E, F) como antígeno e amostras de soros (1:100) de camundongos BALB/c infectados obtidas após 12, 20, 40, 60 e 120 dias de infecção. Os dados foram analisados estatisticamente usando o teste de Kruskal-Wallis (GraphPadPrism Software, USA). Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

























## **5 DISCUSSÃO**

### **5.1 O POLIPEPTÍDEO RECOMBINANTE r-potDomB: UMA NOVA FERRAMENTA PARA O ESTUDO DE NTPDases**

Estudos prévios demonstraram elevado nível de imunoreatividade cruzada entre a apirase de batata e soros de pacientes com esquistossomose ou leishmaniose tegumentar ou soros de camundongos experimentalmente infectados com *S. mansoni* ou *L. amazonensis*, sugerindo o compartilhamento de epitopos e a antigenicidade das NTPDases destes parasitos (VASCONCELOS *et al.*, 1996; FARIA-PINTO *et al.*, 2004; 2006; 2008; 2010a,b; COIMBRA *et al.*, 2008; VASCONCELOS *et al.*, 2009; REZENDE-SOARES *et al.*, 2010). Análises *in silico* permitiram indicar o domínio B da estrutura primária da apirase de batata, uma região extensa com 40 aminoácidos, como de alta identidade com o domínio B de NTPDases de parasitos, sugerindo a conservação desta região específica durante a evolução e o seu possível envolvimento na imunomodulação da resposta imune do hospedeiro (FARIA-PINTO *et al.*, 2008; VASCONCELOS *et al.*, 2009).

Tendo como base estas observações, foi idealizado o recombinante r-potDomB composto pela fusão de hexa-histidina com o domínio B da apirase de batata. Como demonstrado nesta Tese, este recombinante foi obtido com alto grau de pureza por expressão heteróloga em *E. coli* seguida de purificação cromatográfica. A reatividade desta nova biomolécula com anticorpos anti-apirase de batata produzidos em coelho permitiram, pela primeira vez, a identificação deste domínio protéico de 40 aminoácidos como rico em epitopos para células B do sistema imune de mamífero (ver ANEXO C: MAIA *et al.*, 2011), e a suposição de ser ele o principal motivo antigênico responsável pelas imunoreatividades cruzadas previamente reportadas.

Novas análises *in silico* foram efetuadas usando o domínio B, e foi verificado que ele está presente em NTPDases de diversos parasitos e, também, em outros organismos patogênicos de diferentes linhagens filogenéticas, sugerindo novamente a sua conservação evolutiva e a possível função imunomoduladora. A antigenicidade deste recombinante foi comprovada por sua habilidade de induzir a produção de altos níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a quando usado para a imunização de camundongos. Além disso, estes anticorpos foram aptos para imunoprecipitar e inibir as NTPDases de *S. mansoni* e *L. braziliensis*, sugerindo que esta região está diretamente envolvida no ciclo catalítico da enzima. O recombinante r-potDomB e os anticorpos produzidos contra ele foram então apresentados como novas ferramentas para o estudo funcional do domínio B de isoformas de NTPDases de parasitos, e para a avaliação do envolvimento desta região com a resposta imune nas respectivas doenças parasitárias (MAIA *et al.*, 2011).

Os testes efetuados com o recombinante r-potDomB, cuja obtenção foi aqui descrita, e com peptídeos sintéticos derivados dos domínios B de NTPDases de *L. braziliensis* e de *S. mansoni*, e com os anticorpos produzidos contra estas biomoléculas, foram ampliados. Estas novas biomoléculas foram usadas em técnicas de ELISA para demonstração da antigenicidade do domínio B; os anticorpos produzidos contra elas foram usados em experimentos de imunoprecipitação e inibição de atividade enzimática, inibição de proliferação de parasitos, e para o isolamento da NTPDase 1 de homogeneizados de parasitos e confirmação de sua identidade. O conjunto de resultados obtidos deu suporte às hipóteses de antigenicidade, conservação e da funcionalidade do domínio B das NTPDases de *S. mansoni*, *L. braziliensis* e *L. infantum*, também resultando em publicações (ver ANEXO G: MENDES *et al.*, 2011; PORCINO *et al.*, 2012; MAIA *et al.*, 2013).

O recombinante r-potDomB e os anticorpos produzidos contra ele, usados nesta Tese para estudos específicos da NTPDase 1 de *L. amazonensis*, poderão ser também empregados em protocolos terapêuticos e/ou de vacinação contra a leishmaniose como será posteriormente discutido. É interessante ressaltar que a produção de r-potDomB em larga escala induz a formação de agregados, visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida, coloração por *Coomassie blue* e por “Western blots” usando anticorpos anti-histidina, técnicas que permitiram

a identificação do polipeptídeo de aproximadamente 6 kDa e, também, de 12, 18 e 24 kDa, sugerindo oligomerização. Esta agregação, condicionada aos tipos de ligações intermoleculares ocorridas entre os monômeros, pode alterar a biodisponibilidade ou estabilidade da biomolécula, aumentando ou reduzindo o seu potencial terapêutico, bem como a resposta imune, como tem sido relatado na literatura (FOWLER *et al.*, 2005; ROSENBERG, 2006; MAGGIO, 2010; TAN, SHANG e DANISHEFSKY *et al.*, 2011). Estas observações ampliaram as possibilidades de novos estudos bioquímicos e imunológicos, visando estabelecer métodos apropriados de estabilização de monômeros e/ou agregados, o que já está em desenvolvimento em nosso laboratório.

## **5.2 A NTPDase 1 DE *L. amazonensis* É ALTAMENTE CONSERVADA ENTRE AS DIFERENTES ESPÉCIES DE LEISHMANIA, E SEU DOMÍNIO B É DE ALTA IDENTIDADE COM SUA CONTRAPARTE DA APIRASE DE BATATA**

Os genomas de *L. braziliensis* (ATPDase 1, XP\_001562178), *L. major* (NDPase, CAJ03227.1) e *L. infantum* (ATPDase, AM66723.1) foram finalizados no ano de 2007 (PEACOCK *et al.*, 2007), e as anotações sobre outras espécies em bancos de dados do NCBI foram também iniciadas, tais como de *L. mexicana* (NDPase, CBZ25018.1; ROGERS *et al.*, 2011) e *L. donovani* (ATPDase, CBZ32820.1; DOWNING *et al.*, 2011). A NTPDase 1 foi anotada como uma proteína hipotética em cada uma delas, apresentando alto nível de conservação (> 80% de identidade) entre as diversas espécies de *Leishmania*.

Dessa maneira, usando como parâmetros as sequências primárias das NTPDases já anotadas nos respectivos genomas, foi realizada a clonagem do gene da NTPDase 1 de *L. amazonensis*, como relatado nesta Tese. As análises *in silico* permitiram observar o alto nível de conservação (83-98% de identidade) entre as sequências nucleotídicas codificadoras das NTPDases de *L. mexicana*, *L. infantum*, *L. major*, *L. donovani* e *L. braziliensis*.



A sequência da NTPDase 1 de *L. amazonensis* obtida neste trabalho, até então inexistente, foi anotada por nós no banco de dados do NCBI (ANEXO B: gi|386762715|gb|JQ623507.1). Posteriormente, a sequência do cDNA completo da NTPDase 1 de *L. amazonensis* (gi|400381332|gb|JQ697233.2|; ATPDaseLa425aa\_AFJ75402.2) foi também anotada por outro grupo de pesquisa, corroborando a sequência por nós obtida.

Como aqui mostrado, o alinhamento das sequências primárias da NTPDase 1 de *L. amazonensis* e da apirase de batata mostrou 31% de identidade e 46% de similaridade entre elas, e as estruturas tridimensionais preditas foram também de elevada semelhança. Particularmente, o domínio B da NTPDase 1 de *L. amazonensis* (r82-121) e o domínio B da apirase de batata (r78-117) mostraram elevada identidade (53%) e similaridade (60%) entre os 40 aminoácidos avaliados, e ambos foram preditos como aptos para ligarem anticorpos (> 0,8) e moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHCI e MHCII, 87% e 59%, respectivamente). A identificação do gene da NTPDase 1 de *L. amazonensis* e os estudos *in silico* efetuados corroboram a expressão desta proteína do parasito, cuja caracterização de atividade ATP difosfohidrolásica já havia sido demonstrada em preparação de membrana plasmática de promastigotas (COIMBRA *et al.*, 2002), bem como a imunoreatividade cruzada entre uma isoforma nativa isolada desta preparação e a apirase de batata (COIMBRA *et al.*, 2008).

Os resultados destas análises permitiram a inclusão da NTPDase 1 de *L. amazonensis* entre aquelas proteínas que tiveram o domínio B conservado durante a evolução, sendo compartilhado com isoformas de NTPDases de plantas e de outros organismos de linhagens filogenéticas distintas (FARIA-PINTO *et al.*, 2004, 2006, 2008; 2010a,b; COIMBRA *et al.*, 2008; VASCONCELOS *et al.*, 2009; REZENDE-SOARES *et al.*, 2010; MENDES *et al.*, 2011; MAIA *et al.*, 2011, 2013; PORCINO *et al.*, 2012), e foram motivo de nova publicação (DETONI *et al.*, 2013).

Adicionalmente, a conservação e elevada identidade entre os domínios B da NTPDase 1 de *L. amazonensis*, apirase de batata e *L. braziliensis*, com visível compartilhamento de regiões aptas a estimular os sistemas imunes humoral e celular, indicaram o uso do recombinante r-potDomB e dos peptídeos sintéticos LbB1LJ e LbB2LJ, os quais abrangem o domínio B conservado (r82-121) da

NTPDase 1 de *L. braziliensis*, como ferramentas moleculares nos estudos subsequentes desta proteína de *L. amazonensis*.

### **5.3 A NTPDase 1 DE *L. amazonensis* É ECTO-LOCALIZADA E TEM DISTRIBUIÇÃO SUBCELULAR UBÍQUA**

Usando os soros imunes anti-r-potDomB, anti-LbB1LJ e anti-LbB2LJ em *Western blots*, a NTPDase 1 de *L. amazonensis* foi identificada nas frações de membrana, flagelo e microssomal de promastigotas de *L. amazonensis*, com massa molecular de 48 e 63 kDa, sugerindo ampla distribuição subcelular desta proteína no parasito. A identificação da NTPDase 1 por anticorpos produzidos contra o domínio B da apirase de batata reforçaram a hipótese de que o domínio B conservado na NTPDase 1 deste parasito é o maior responsável pela imunoreatividade cruzada detectada previamente com a proteína vegetal (COIMBRA *et al.*, 2008).

É interessante observar que os soros imunes anti-LbB1LJ e anti-LbB2LJ, mais específicos que o soro imune anti-r-potDomB, foram aptos a detectar uma banda adicional de 48 kDa. A NTPDase 1 de *L. amazonensis* anotada por nós no banco de dados do NCBI possui massa molecular predita de aproximadamente 48 kDa. Assim, é possível que as bandas de 48 e 63 kDa sejam formas da mesma proteína sujeitas ao processamento pós-traducional, as quais poderiam estar envolvidas em sua função e/ou localização subcelular (KAMATH, VASAVADA e SRIVASTAVA, 2011).

Prova definitiva desta ampla localização da NTPDase 1 foi obtida por meio de ensaios imunocitoquímicos e análises por microscopia eletrônica de transmissão usando os soros imunes anti-r-potDomB, anti-LbB1LJ e anti-LbB2LJ, os quais – especificamente – identificaram esta proteína na superfície da membrana plasmática, núcleo, mitocôndria e cinetoplasto, na bolsa flagelar e flagelo, e associada com vesículas citoplasmáticas.

A ampla distribuição da NTPDase 1, localizada com especificidade em promastigotas de *L. amazonensis*, como mostrado neste trabalho por “*Western blots*” de frações de promastigotas e por imunocitoquímica, é também corroborada pela

ampla distribuição subcelular de sua proteína homóloga em *L. braziliensis* (REZENDE-SOARES *et al.*, 2010; PORCINO *et al.*, 2012). Recentemente, por microscopia eletrônica e usando um soro imune policlonal que reconhece simultaneamente as duas isoformas de NTPDase de promastigotas de *L. infantum*, elas foram descritas como ubiquitadamente distribuídas no parasito (VASCONCELLOS *et al.*, 2014), similarmente ao também observado para a NTPDase 1 de *T. cruzi* (MARIOTINI-MOURA *et al.* 2014), fortalecendo os nossos dados.

A ecto-localização da NTPDase 1 de *L. amazonensis* sugere seu envolvimento na degradação de nucleosídeos di- e trifosfatados aos seus respectivos nucleosídeos monofosfatados, os quais seriam hidrolisados por 5'-nucleotidasas (CD73; EC 3.1.3.5) e recuperados por transportadores específicos para o meio intracelular, recuperando purinas, já que os tripanosomatídeos não realizam a síntese *de novo* (COIMBRA *et al.*, 2002, 2008; KING *et al.*, 2006; PINHEIRO *et al.*, 2006). Uma atividade ecto-NTPDásica em amastigotas de *L. amazonensis* foi associada às necessidades nutricionais do parasito (PINHEIRO *et al.*, 2006) e, em promastigotas, como um fator de virulência influenciando a resposta inflamatória do hospedeiro (DE SOUSA *et al.*, 2011).

Enzimas envolvidas com a degradação de ATP e produção de adenosina podem estar associadas à virulência de parasitos do gênero *Leishmania*, no desenvolvimento da lesão e estabelecimento da infecção (MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2008; SANSOM *et al.*, 2014). Em promastigotas de *L. major* a NTPDase 1 foi identificada somente no Complexo de Golgi, e parece estar envolvida nas vias de alongamento da cadeia de fosfoglicanos do lipofosfoglicano (LPG), o principal componente do glicocálix da superfície de promastigotas envolvido em sua virulência (SANSOM *et al.*, 2014). A distribuição ubíqua da NTPDase 1 de *L. amazonensis* sugere o envolvimento adicional desta enzima em variadas vias metabólicas (DE SOUZA, 2008; SILVERMAN *et al.*, 2008; CUERVO *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2011), regulando os níveis de nucleotídeos, e modulando o crescimento e as mudanças morfológicas durante o ciclo de vida do parasito.

É importante ressaltar que a localização das isoformas de NTPDases 1 de parasitos é de fundamental importância para a indicação desta proteína como um

alvo para a idealização de novas estratégias terapêuticas contra as leishmanioses. Este conjunto de dados já foi publicado (ANEXO D: DETONI *et al.*, 2013).





## **5.5 O DOMÍNIO B DA NTPDase 1 DE *L. amazonensis* ESTÁ ASSOCIADO À PROGRESSÃO DA LEISHMANIOSE**

No presente estudo, a alta reatividade de anticorpos de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* com o polipeptídeo recombinante r-potDomB ou com os peptídeos sintéticos LbB1LJ e LbB2LJ confirmou a antigenicidade da NTPDase 1 deste parasito e, particularmente de seu domínio B, demonstrando ser ele rico em epitopos para células B, sendo por isso um alvo para a resposta imune do hospedeiro. Além disso, reforçou a hipótese de que esta região em isoformas de

NTPDases de organismos de linhagens filogenéticas distintas foi evolutivamente conservada, e que tem importante papel interferindo no sistema imune do hospedeiro (FARIA-PINTO *et al.*, 2008; MAIA *et al.*, 2011).

Da análise do tempo de curso de aparecimento de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos e reativos em leishmaniose, novas peculiaridades podem ser apontadas sobre o domínio B conservado. Como mostrado aqui, a reatividade de IgG1 com r-potDomB, LbB1LJ ou LbB2LJ aumentou significativamente aos 90-120 dias após a infecção, coincidindo com o estágio mais ativo da doença. Por outro lado, epitopos do domínio B conservado da NTPDase 1 de *L. amazonensis* são também capazes de induzir a produção de IgG2a nos estágios iniciais da doença, como demonstrado pela maior reatividade deste isotipo com r-potDomB, LbB1LJ ou LbB2LJ aos 40 dias após a infecção.

Em camundongos, o isotipo IgG1 está associado com a patogenicidade, e os isotipos IgG2a e IgG2c estão possivelmente associados aos mecanismos de resistência (CHU *et al.*, 2010). Em vista destas associações entre os subtipos de IgG e infecção, os resultados sugeriram que o domínio B conservado da NTPDase 1 de *L. amazonensis*, e possivelmente de outras isoformas de NTPDase 1 de outras espécies de *Leishmania* (FARIA-PINTO *et al.*, 2008; REZENDE-SOARES *et al.*, 2010; VASCONCELOS *et al.*, 2009; PORCINO *et al.*, 2012; MAIA *et al.*, 2011, 2013), participa em diferentes respostas imunes, contribuindo tanto com a imunomodulação da doença quanto com os mecanismos que medeiam susceptibilidade ou resistência à infecção.

Estes resultados já foram publicados (DETONI *et al.*, 2013), e associados aos dados da literatura estimularam a continuidade de nossos estudos. Recentemente foi demonstrado que a pré-imunização de camundongos BALB/c com uma proteína recombinante derivada de uma isoforma antigênica de NTPDase de *T. gondii* combinada com alúmen estimulou respostas imunes humoral e celular, com predominância de produção de IgG2a e IFN- $\gamma$ , induzindo proteção parcial contra uma cepa virulenta de *T. gondii* (TAN *et al.*, 2011), fornecendo subsídios promissores sobre o uso de NTPDases em protocolos de imunização.



Além disso, frações microsomal e de flagelo de promastigotas de *L. amazonensis*, obtidas como descrito nesta Tese, foram inoculadas em camundongos Suíços previamente imunomodulados por injeções de BCG e tiveram significativa habilidade protetora, reduzindo o edema de pata e a carga parasitária em lesões (ZAVERUCHA DO VALLE *et al.*, 2007). A NTPDase 1 do parasito pode ter contribuído com estes resultados, motivando a realização de protocolos de imunização visando determinar o potencial imunogênico do domínio B desta proteína.







## **6 CONCLUSÕES**

- ✓ O r-potDomB, um recombinante derivado do domínio B da apirase de batata (r78-117), foi obtido com alto grau de pureza após expressão heteróloga em *E. coli*, e a sua reatividade com anticorpos anti-apirase de batata confirmaram a existência de epitopos indutores de resposta imune humoral em mamíferos. Este recombinante e os anticorpos produzidos contra ele foram apresentados como novas ferramentas para o estudo funcional do domínio B de isoformas de NTPDases de parasitos;
- ✓ A clonagem do gene da NTPDase 1 de *L. amazonensis* e as análises *in silico* realizadas permitiram a inclusão desta proteína entre aquelas que tiveram o domínio B conservado durante a evolução, sendo compartilhado com isoformas de NTPDases de plantas e de outros organismos de linhagens filogenéticas distintas;
- ✓ A NTPDase 1 foi identificada como bandas de 48 e 63 kDa em frações de membrana, flagelo e microsomal de promastigotas de *L. amazonensis*. Esta ampla distribuição da NTPDase 1 foi confirmada por imunocitoquímica ultraestrutural e anticorpos anti-domínio B, que evidenciaram a proteína com especificidade na membrana plasmática, núcleo, mitocôndria e cinetoplasto, bolsa flagelar e flagelo;
- ✓ A reatividade entre r-potDomB, LbB1LJ ou LbB2LJ e anticorpos IgG2a de camundongos BALB/c infectados com promastigotas foi observada aos 40 dias pós-infecção, revelando a antigenicidade do domínio B e a sua habilidade de induzir a produção deste subtipo nos estágios iniciais da doença. A reatividade de IgG1 foi significativamente maior aos 90-120 dias pós-infecção, coincidindo com o estágio mais ativo da doença, sugerindo participação do domínio B da NTPDase 1 de *L. amazonensis* nos mecanismos que medeiam susceptibilidade ou resistência à infecção;



## **7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABREU-SILVA AL, CALABRESE KS, CUPOLILO SMN, CARDOSO FO, SOUZA CSF, GONÇALVES-DA-COSTA SC. 2004. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. **Veterinary Parasitology**, **121**:179-187.

ALBERTS B, BRAY D A, HOPKIN K, JOHNSON A, LEWIS J, RAFFM, ROBERTS K, WALTER P. 2006. **Fundamentos da Biologia Celular**. 2ª ed. Editora Artmed, Porto Alegre, RS, 866p.

ALMEIDA RP, BARRAL-NETO M, DE JESUS AM, DE FREITAS LA, CARVALHO EM, BARRAL A. 1996. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **54**:178-184.

ANDREANI G, LODGE R, RICHARD D, TREMBLAY MJ. 2012. Mechanisms of interaction between protozoan parasites and HIV. **Current Opinion in HIV and AIDS**, **7(3)**:276-282.

ANNOURA T, MAKIUCHI T, SARIOGO I, AOKI T, NARA T. 2012. SUMOylation of paraflagellar Rod Protein, PFR1, and its stage-specific localization in *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE** **7(5)**:e37183. doi:10.1371/journal.pone.0037183.

ASAI T, MIURA S, SIBLEY LD, OKABAYASHI H, TAKEUCHI. 1995. Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Biological Chemistry**, **270**:11391-11397.

BAÑULS AL, HIDE M, PRUGNOLLE F. 2007. *Leishmania* and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. **Advances in Parasitology**, **64**, 113 pp.

BATES PA. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, **37**:1097-1106.

BATES PA, ROGERS ME. 2004. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Current Molecular Medicine**, **4**:601-609.

BAYONA JC, NAKAYASU ES, LAVERRIERE M, AGUILAR C, SOBREIRA TJP, CHOI H, NESVIZHISKII AI, ALMEIDA IC, CAZZULO JJ, ALVAREZ VE. 2011. SUMOylation Pathway in *Trypanosoma cruzi*: Functional characterization and proteomic analysis of target proteins. **Molecular & Cellular Proteomics**, **10**:10.1074/mcp.M110.007369, 1–13.

BERMUDES D, PECK KR, AFIFI MA, BECKERS CJM, JOINER KA. 1994. Tandemly Repeated Genes Encode Nucleoside Triphosphate Hydrolase Isoforms Secretes into the Parasitophorous Vacuole of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Biological Chemistry**, **269(46)**:29252-29260.

BERN C, MAGUIRE JH, ALVAR J. 2008. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, **2(10)**:e313

BERNARDO ASP, ALVES CR. 2008. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Veterinary parasitology**, **158**:239-255.

BIRNBAUM R, CRAFT N. 2011. Innate Immunity and *Leishmania* Vaccination Strategies. **Dermatologic Clinics**, **29**:89-102.

BOLOGNA G, YVON C, DUVAUD S, VEUTHEY AL. 2004. N-terminal Myristoylation Predictions by Ensembles of Neural Networks. **Proteomics**, **4(6)**:1626-1632.

BOURS MJL, SWENNEN ELR, VIRGILIO F, CRONSTEIN BN, DAGNELIE PC. 2006. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, **112**:348-404.

BRADFORD MM. 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

BUFFON A, WINK MR, RIBEIRO VB, CASALI EA, LIBERMANN AT, ZERBINI LF, ROBSON SC, SARKIS JJF. 2007. NTPDase and ecto-nucleotidase expression profiles and the pattern of extracellular ATP metabolism in the Walker 256 tumor. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1770**:1259-1265.

BURNSTOCK G. 1996. Purinoceptors: ontogeny and phylogeny. **Drug Development Research**, **39**:204-242.

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

CALABRESE KS, GONÇALVES-DA-COSTA SC. 1992. Enhancement of *Leishmania amazonensis* infection in BCG non-responder mice by BCG-antigen specific vaccine. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **87**:49-56.

CARDOSO FO, SOUZA CSF, MENDES VG, ABREU-SILVA AL, GONÇALVES DA COSTA SC, CALABRESE KS. 2010. Immunopathological studies of *Leishmania amazonensis* infection in resistant and in susceptible mice. **The Journal of Infectious Diseases**, **201**:1933-1940.

CARNEIRO MBH, SOUZA LMA, VAZ LG, SANTOS LM, VILELA L, SOUZA CC, GONÇALVES R, TAFURI WL, AFONSO LCC, CÔRTEZ DF, VIEIRA LQ. 2014. Short-term protection conferred by Leishvacin<sup>®</sup> against experimental *Leishmania amazonensis* infection in C57BL/6 mice. **Parasitology International**, **63**:826-834.



CHU N, THOMAS BN, PATEL SR, BUXBAUM LU. 2010. IgG1 is pathogenic in *Leishmania mexicana* Infection. **The Journal of Immunology**, **185**:6939-6946.

COIMBRA ES, GONÇALVES-DA-COSTA SC, CORTE-REAL S, FREITAS FGR, DURÃO A, SOUZA CSF, SILVA SANTOS MI, VASCONCELOS EG. 2002. Characterization and cytochemical localization of an ATP diphosphohydrolase from *Leishmania amazonensis* promastigote. **Parasitology**, **124**:137-143.

COIMBRA ES, GONÇALVES-DA-COSTA SC, COSTA BLS, GIAROLA NLL, REZENDE-SOARES FA, FESSEL MR, PEREIRA AP, SOUZA CSF, ABREU-SILVA AL, VASCONCELOS EG. 2008. A *Leishmania (L.) amazonensis* ATP diphosphohydrolase isoform and potato apyrase share epitopes: antigenicity and correlation with disease progression. **Parasitology**, **135**:327-335.

COSTA N, PETERS NC, MARUYAMA SR, BRITO JR EC, SANTOS IKFM. 2011. Vaccines for the Leishmaniases: Proposals for a Research Agenda. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, **5(3)**:e943.

CROFT SL, OLLIARO P. 2011. Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, **17**:1478-1483.

CUERVO P, DE JESUS JB, SABÓIA-VAHIA L, MENDONÇA-LIMA L, DOMONT GB, CUPOLILLO E. 2009. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. **Journal of Proteomics**, **73**:79-82.

CUPOLILLO E, MEDINA-ACOSTA E, NOYES H, MOMEN H, GRIMALDI JR G. 2000. A Revised Classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology Today**, **16(4)**:142-144.

CUPOLILO SMN, SOUZA CSF, ABREU-SILVA AL, CALABRESE KS, GONÇALVES DA COSTA SC. 2003. Biological behavior of *Leishmania (L.) amazonensis* isolated from a human diffuse cutaneous leishmaniasis in inbred strains of mice. **Histology and Histopathology**, **18**:1059-1065.

DE MARCO R, KOWALTOWSKI AT, MORTARA RA, VERJOVSKI-ALMEIDA S. 2003. Molecular characterization and immunolocalization of *Schistosoma mansoni* ATP-diphosphohydrolase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **307**:831-838.

DE SOUZA VL, VERAS PST, WELBY-BORGES M, SILVA TMC, LEITE BR, FERRARO RB, MEYER-FERNANDES JR, BARRAL A, COSTA JML, FREITAS LAR. 2011. Immune and inflammatory responses to *Leishmania amazonensis* isolated from different clinical forms of human leishmaniasis in CBA mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **106**:23-31.

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

DENNY PW, GOKOOL S, RUSSEL DG, FIELD MC, SMITH DF. 2000. Membrane transport structure function and biogenesis: Acylation-dependent Protein Export in *Leishmania*. **The Journal of Biological Chemistry**, **275**:11017-11025.

DESJEUX P. 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **95**:239-243.

DETONI ML, FARIA-PINTO P, QUELLIS LR, RUST NM, TAVARES LS, SANTOS MO, ISAÍAS RMS, SANTOS JC, FERNANDES GW, SOARES GLG, VASCONCELOS EG. 2012. Galls from *Calliandra brevipes* BENTH (Fabaceae: Mimosoidae): evidence of apyrase activity in a plant-insect interaction. **Australian Journal of Botany**, **60**:559-567.

DETONI ML, FESSEL MR, MAIA ACRG, PORCINO GN, QUELLIS LR, FARIA-PINTO P, MARQUES MJ, JULIANO MA, JULIANO LJ, DINIZ VA, CÔRTE-REAL S, GONÇALVRES-DA-COSTA SC, SOUZA CS, VASCONCELOS EG. 2013. An antigenic domain of the *Leishmania amazonensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is associated with disease progression in susceptible infected mice. **Parasitology Research**, **112(8)**:2773-2782.

DOWNING T, IMAMURA H, DECUYPERE S, CLARK TG, COOMBS GH, COTTON JA, HILLEY JD, DE DONCKER S, MAES I, MOTTRAM JC, QUAIL MA, RIJAL S, SANDERS M, SCHÖNIAN G, STARK O, SUNDAR S, VANAERSCHOT M, HERTZ-FOWLER C, DUJARDIN JC, BERRIMAN M. 2011. Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. **Genome Research**, **21**:2143–2156.

DWYER KM, DEAGLIO S, GAO W, FRIEDMAN G, STROM TB, ROBSON SC (2007) CD39 and control of cellular immune responses. **Purinergic Signalling**, **3**:171-180.

DZHANDZHUGAZYAN KN, KIRKIN AF, KTRATEN PT, JESPER ZEUTHEN J. 1998. Ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 is overexpressed in differentiated human melanomas. **FEBS Letters**, **430**:227-230.

FALÚ MA, GARCÍA BUSTOS MF, PARODI C, RASPI EM, CARDOZO RM, CIMINO R, GIL JF, VASVARI JL, BASOMBRÍO MA. 2009. Susceptibility of different mouse strains to *Leishmania amazonensis* infection. **Dermatología Argentina**, **15**:334-339.

FARIA-PINTO P, MEIRELLES MNL, LENZI HL, MOTA EM, PENIDO MLO, COELHO PMZ, VASCONCELOS EG. 2004. ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni* egg: characterization and immunocytochemical localization of a new antigen. **Parasitology**, **129**:51-57.

FARIA-PINTO P, MEIRELLES MNL, LENZI HL, MOTA EM, PENIDO MLO, COELHO PMZ, VASCONCELOS EG. 2006. Cross-immunoreactivity between anti-potato apyrase antibodies and mammalian ATP diphosphohydrolases: potential use of the vegetal protein in experimental schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **101**:359-363.

FARIA-PINTO P, MENDES RGPR, CARVALHO-CAMPOS C, MAIA ACRG, OLIVEIRA AA, COELHO PMZ, VASCONCELOS EG. 2010b. Detection of IgG1 and IgG4 subtypes reactive against potato apyrase in schistosomiasis patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **105(4)**:370-373.

FARIA-PINTO P, MONTESANO MA, JACINTO AA, SANTOS RS, BORDIN FH, FERREIRA AP, PENIDO MLO, COELHO PMZ, VASCONCELOS EG. 2010a. Antibody reactivity against potato apyrase, a protein that shares epitopes with *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase isoforms, in acute and chronically infected mice, after chemotherapy and reinfection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **105(4)**:374-379.

FARIA-PINTO P, REZENDE-SOARES FA, MOLICA AM, MONTESANO MA, MARQUES PMZ, NETO SM, FRANCO OL, VASCONCELOS EG. 2008. Mapping of the conserved antigenic domains shared between potato apyrase and parasite ATP diphosphohydrolases: potential application in human diseases. **Parasitology**, **135**:943-953.

FEASEY N, WANSBROUGH-JONES, MABEY DC, SOLOMON AW. 2010. Neglected tropical diseases. **British Medical Bulletin**, **93**:179-200.

FIETTO JLR, DEMARCO R, NASCIMENTO IP, CASTRO IM, CARVALHO TMU, DE SOUZA W, BAHIA MT, ALVES MJM, VERJOWSKI-ALMEIDA S. 2004. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **316**:454-460.

FOWLER SB, POON S, MUFF R, CHITIS F, DOBSON CM, ZURDO J. 2005. Rational design of aggregation-resistant bioactive peptides: reengineering human calcitonin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **102**:10105-10110.

GARCIA-ESTRADA C, PÉREZ-PERTEJO Y, ORDÓÑEZ D, BALANA-FOUCE R, REGUERA RM. 2008. Characterization of the 5' region of the *Leishmania infantum* LORIEN/NAT2 gene cluster and role of LORIEN flanking regions in post-transcriptional regulation. **Biochimie**, **90**:1325-1336.

GENDRON FP, BENREZZAK O, KRUGH BW, KONG Q, WEISMAN GA, BEAUDOIN. 2002. Purine Signaling and Potential New Therapeutic Approach: Possible Outcomes of NTPDase Inhibition. **Current Drug Targets**, **3**:229-245.

GONÇALVES-DA-COSTA SC, LAGRANGE PH. 1981. Development of cell mediated immunity to flagellar antigens and acquired resistance to infection by *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **76**:367-381.

GRIMALDI JR G, MOMEN H, NAIFF RD, MCMAHON-PRATT D, BARRETT TV. 1991. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild animals, and sandflies in the Amazon region of Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **44**:645-661.

GUEDES HLM, COSTA BLS, CHAVES SP, GOMES DCO, NOSANCHUK JD, SIMONE SG, ROSSI-BERGMANN B. 2014. Intranasal vaccination with extracellular

serine proteases of *Leishmania amazonensis* confers protective immunity to BALB/c mice against infection. **Parasites & Vectors**, **7**:448-454.

GUHA R, GUPTA D, RASTOGI R, VIKRAM R, KRISHNAMURTHY G, BIMAL S, MUKHOPADHYAY A. 2013. Vaccination with leishmania hemoglobin receptor-encoding DNA protects against visceral leishmaniasis. **Science Translational Medicine**, **5(202)**:202ra121.

GUPTA R, JUNG E, BRUNAK S. 2005. NetNGlyc: Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>

HANDA M, GUIDOTTI G. 1996. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohidrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **218**:916-923.

HANDMAN E. 2001. Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. **Clinical and Microbiological Reviews**, **14(2)**:229-243.

HARLOW E, LANE D. 1988. **Antibodies: A Laboratory Manual**, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

HERNESSEY TM. 2005. Responses of the ciliates *Tetrahymena* and *Paramecium* to external ATP and GTP. **Purinergic Signalling**, **1(2)**:101-110.

IBORRA S, PARODY N, ABÁNADES DR, BONAY P, PRATES D, NOVAIS FO, BARRAL-NETTO M, ALONSO C, SOTO M. 2008. Vaccination with the *Leishmania major* ribosomal proteins plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against experimental cutaneous leishmaniasis in mice. **Microbes and Infection**, **10**:1133-1141.

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

KACZMAREK E, KOZIAK K, SÉVIGNY J, SIEGEL JB, ANRATHER J, BEAUDOIN AR, BACH FH, ROBSON SC. 1996. Identification and characterization of CD39 vascular ATP Diphosphohydrolyase. **The Journal of Biological Chemistry**, **271**:33116-33122.

KAMATH KS, VASAVADA MS, SRIVASTAVA S. 2011. Proteomic databases and tools to decipher post-translation modifications. **Journal of Proteomics** **75**:127-144.

KAMHAWI S. 2000. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. **Microbes and infection**, **2**:1765-1773.

KAUR H, THAKUR A, KAUR S. 2015. Studies on cocktails of 31kDa, 36kDa and 51kDa antigens of *Leishmania donovani* along with saponin against murine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**: doi: 10.1111/pim.12176. [Epub ahead of print]

KAYE P, SCOTT P. 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews: Microbiology**, **9**:604-615

- KEDZIERSKI L. 2011. Leishmaniasis. **Human Vaccines**, **7(11)**:1204-1214.
- KERSCHER OR, FELBERBAUM R, HOCHSTRASSER M. 2006. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, **22**:159-180.
- KIEMER L, BENDTSEN JD, BLOM N. 2005. NetAcet: Prediction of N-terminal acetylation sites. **Bioinformatics**, **21(7)**:1269-1270.
- KILLICK-KENDRICK R, RIOUX JA. 2002. Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural life-cycle of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus ariasi*. **Parasitologia**, **44**:67-71.
- KIMA PE, CONSTANT SI, HANNUM I, COLMENARES M, LEE KS, HABERMAN AM, SHLOMCHIK MJ, MCMAHON-PRATT D. 2000. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Experimental Medicine**, **191**:1063-1080.
- KING AE, ACKLEY MA, CASS CE, YOUNG JD, BALDWIN SA. 2006. Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. **Trends in Pharmacological Sciences**, **27**:416-425;
- KNOWLES AF. 2011. The GDA1\_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. **Purinergic Signalling**, **7**:21-45.
- KNOWLES AF. 2009. The single NTPase gene of *Drosophila melanogaster* encodes an intracellular nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 (NTPDase6). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **484**:70-79.
- KOZIAK K, KACZMAREK E, KITTEL A, SÉVIGNY J, BLUSZTAJN JK, SCHULTE AM, ESCH L, IMAI M, GUCKELBERGER O, GOEPFERT C, QAWI I, ROBSON SC. 2000. Palmitoylation targets CD39/endothelial ATP diphosphohydrolase to caveolae. **The Journal of Biological Chemistry**, **275**:2057-2062.
- KUMAR R, ENGWERDA C. 2014. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clinical & Translational Immunology**, **3**, e13; doi:10.1038/cti.2014.4
- LAEMMLI UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophages T4. **Nature**, **227**:680-685.
- LAGRANGE PH, HURTREL B, RAVISSE P. 1978. La réaction locale granulomateuse après vaccination par le BCG chez la souris. **Annales de l'Institut Pasteur Immunology**, **129C**:529-546.
- LAINSON R, SHAW JJ. 1987. **Evolution, classification and geographical distribution, in The Leishmaniasis in Biology and Epidemiology**. Vol. 1 (Peters, W. and Killick-Kendrick, R., eds), pp 1–120, Academic Press.
- LEITE PM, GOMES RS, FIGUEIREDO AB, SERAFOM TD, TAFURI WL, SOUZA CC, MOURE SAL, FIETTO JLR, MELO MN, RIBEIRO-DIAS F, OLIVEIRA MAP, RABELLO A, AFONSO LCC. 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 RA, VERJOVSKI-ALMEIDA S, DE MARCO R. 2007. Characterization of *Schistosoma mansoni* ATPDase 2 gene, a novel apyrase Family member. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **352**:384-389.

LI M, KIM TJ, KWON HJ, SUH JW. 2008. Effects of extracellular ATP on the physiology of *Streptomyces coelicolor* A3(2). **FEMS Microbiology Letters**, **286**:24-31.

LINDOSO JAL, LINDOSO AABP. 2009. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **51(5)**:247-253

MAIA ACRG, DETONI ML, PORCINO GN, SOARES TV, GUSMÃO MAN, FESSEL MR, MARQUES MJ, SOUZA MA, COELHO PMZ, ESTANISLAU JASG, ROCHA MOC, SANTOS MO, FARIA-PINTO P, VASCONCELOS EG. 2011. Occurrence of a conserved domain in ATP diphosphohydrolases from pathogenic organisms associated to antigenicity in human parasitic diseases. **Developmental & Comparative Immunology**, **35**:1057-1065.

MAIA ACRG, PORCINO GN, DETONI MD, EMIDIO NB, MARCONATO DG, FARIA-PINTO P, FESSEL MR, REIS AB, JULIANO LJ, JULIANO MA, MARQUES MJ, VASCONCELOS EG. 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.

MARCHLER-BAUER A, DERBYSHIRE MK, GONZALES NR, LU S, CHITSAZ F, GEER LY, GEER RC, HE J, GWADZ M, HURWITZ DI, LANCZYCKI CJ, LU F, MARCHLER GH, SONG JS, THANKI N, WANG Z, YAMASHITA RA, ZHANG D, ZHENG C, BRYANT SH. 2011. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. **Nucleic Acids Research**, **39(D)**:225-229.

MARIOTINI-MOURA C, BASTOS MS, CASTRO FF, TRINDADE ML, VASCONCELLOS RS, NEVES-DO-VALLE MAA, MOREIRA BP, SANTOS RF, OLIVEIRA CM, CUNHA LCS, SOUTO XM, BRESSAN GC, SILVA-JUNIOR A, BAQUI MMA, BAHIA MT, ALMEIDA MR, MEYER-FERNANDES JR, FIETTO JLR. 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 EA, DE OLIVEIRA JC, FIGUEIREDO AB, DE SOUZA LIMA D, CARNEIRO CM, RANGEL FIETTO JL, AFONSO LCC. 2008. Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. **Microbes and Infection**, **10**:850-857.

MAURER-STROH S, EISENHABER F. 2005. Refinement and prediction of protein prenylation motifs. **Genome Biology**, **6**:R55.

MCALVIN CB, STACEY G. 2005. Transgenic expression of the soybean apyrase in *Lotus japonicus* enhances nodulation. **Plant Physiology**, **137**:1456-1462.

MCGWIRE BS, SATOSKAR AR. 2014. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **An International Journal of Medicine**, **107**:7-14.

MELKONIAN KA, OSTERMEYER AG, CHEN JZ, ROTH MG, BROWN DA. 1999. Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts – Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. **The Journal of Biological Chemistry**, **274**:3910-3917;

MENDES RGPR, GUSMÃO MANG, MAIA ACRG, DETONI ML, PORCINO GN, SOARES TV, JULIANO MA, JULIANO LJ, COELHO PM, LENZI HL, FARIA-PINTO P, VASCONCELOS EG. 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.

MUKBEL R, PETERSEN CA, JONES DE. 2006. Soluble factors from *Leishmania major*-specific CD4+T cells and B cells limit *L. amazonensis* amastigote survival within infected macrophages. **Microbes and Infection**, **8**:2547-2555.

MURRAY HW, BERMAN JD, DAVIES CR, SARAVIA NG. 2005. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, **366**:1561-1577.

NEUHOFF V, AROLD N, TAUBE D, EHRHARDT W. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, **9**:255–262.

NICO D, GOMES DC, PALATNIK-DE-SOUZA I, MORROT A, PALATINIK M, PALATINIK-DE-SOUZA CB. 2014. *Leishmania donovani* nucleoside hydrolase terminal domains in cross-protective immunotherapy against *Leishmania amazonensis* murine infection. **Frontiers in Immunology**, **5**:article273.

NOAZIN S, KHAMESIPOUR A, MOULTON LH, TANNER M, NASSERI K, MODABBER F, SHARIFI I, KHALIL EA, BERNAL ID, ANTUNES CM, SMITH PG. 2009. Efficacy of killed whole-parasite vaccines in the prevention of Leishmaniasis: a meta-analysis. **Vaccine**, **27(35)**:4747-4753.

PALMERI A, GHERARDINI PF, TSIGANHKOV P, AUSIELLO G, SPATH GF, ZILBERSTEIN D, HELMER-CITTERICH M. 2011. PhosTryp: a phosphorylation site predictor specific for parasite protozoa of the family trypanosomatidae. **BMC Genomics**, **12(1)**:614

PEACOCK CS, SEEGER K, HARRIS D, MURPHY L, RUIZ JC, QUAIL MA, 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 SL, FAULCONBRIDGE A, JEFFARES D, DEPLEDGE DP, OYOLA SO, HILLEY JD, BRITO LO, TOSI LRO, BARRELL B, CRUZ AK, MOTTRAM JC, SMITH DF, BERRIMAN M (2007) Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**, **39**:839-847.

PEREIRA BAS, ALVES CR. 2008. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Veterinary Parasitology**, **158**:239-255.

PIMENTA PFP, FREITAS VC, SECUNDINO NFC. 2012. **A interação do Protozoário *Leishmania* com seus insetos Vetores**. In: Termignoni C, Masuda H, Neto M, Silva AC. *Topicos Avançados em Entomologia Molecular*. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular. 2013. Disponível: <http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/biblioteca/arhrolivro-1/capitulo-12-ainteracao-do-protozoario-leishmania-com-seus-insetos-vetores/view>

PINHEIRO CM, MARTINS-DUARTE ES, FERRARO RB, FONSECA DE SOUZA AL, GOMES MT, LOPES AH, VANNIER-SANTOS MA, SANTO AL, MEYER-FERNANDES JR. 2006. *Leishmania amazonensis*: biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. **Experimental Parasitology**, **114**:16-25.

PORCINO GN, CARVALHO-CAMPOS C, MAIA ACRG, DETONI ML, FARIA-PINTO P, COIMBRA ES, MARQUES MJ, JULIANO MA, JULIANO L, DINIZ VA, CORTE-REAL S, VASCONCELOS EG. 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.

RAMÍREZ L, IBORRA S, CORTÉS J, BONAY P, ALONSO C, BARRAL-NETTO M, SOTO M. 2010. BALB/c mice vaccinated with *Leishmania major* ribosomal proteins extracts combined with CpG Oligodeoxynucleotides become resistant to disease caused by a secondary parasite challenge. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, **10**:Article ID 181690, 9 pages, doi: 10.1155/2010/181690.

REN J, GAO X, JIN C, ZHU M, WANG X, SHAW A, WEN L, YAO X, XUE Y. 2009. Systematic study of protein sumoylation: Development of a site-specific predictor of SUMOsp 2.0. **Proteomics**, **9**:3409-3412.

REN J, WEN L, GAO X, JIN C, XUE Y, YAO X. 2008. CSS-Palm 2.0: an updated software for palmitoylation sites prediction. **Protein Engineering, Design and Selection**, **21(11)**:639-644.

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

REZENDE-SOARES FA, CARVALHO-CAMPOS C, MARQUES MJ, PORCINO GN, GIAROLA NL, COSTA BL, TAUNAY-RODRIGUES A, FARIA-PINTO P, SOUZA MA, DINIZ VA, CORTE-REAL S, JULIANO MA, JULIANO L, VASCONCELOS EG. 2010. Cytochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes and identification of an antigenic and catalytically active isoform. **Parasitology**, **137**:773-783.



RIEWE D, GROSMAN L, FERNIE AR, WUCKE C, GEIGENBERGER P. 2008. The potato-specific apyrase is apoplastically localized and has influence on gene expression, growth and development. **Plant Physiology**, **147**:1092-1109.

ROBSON SC, SÉVIGNY J, ZIMMERMANN H. 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic signaling**, **2**:409-430.

ROGERS MB, HILLEY JD, DICKENS NJ, WILKES J, BATES PA, DEPLEDGE DP, HARRIS D, HER Y, HERZYK P, IMAMURA H, OTTO TD, SANDERS M, SEEGER K, DUJARDIN JC, BERRIMAN M, SMITH DF, HERTZ-FOWLER C, MOTTRAM JC. 2011. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. **Genome Research**, **21**:2129-42.

ROSENBERG AS. 2006. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. **The AAPS Journal**, **8(3)**:E501-E507.

ROSENZWEIG D, SMITH D, MYLER PJ, OLAFSON RW, ZILBERSTEIN D. 2008. Post-translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation. **Proteomics**, **8**:1843-1850.

ROUX SJ, STEINEBRUNNER I. 2007. Extracellular ATP: an unexpected role as a signaler in plants. **Trends in Plant Science**, **12**:522-527.

SAHA S, RAGHAVA GPS. 2006. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. **PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics**, **65**:42-49.

SAHA S, RAGHAVA GPS. 2006. Prediction of Continuous B-cell Epitopes in an Antigen Using Recurrent Neural Network. **Proteins**, **65(1)**:40-48.

SAMBROOK JE, RUSSEL DW. 2006. **The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 800 pp.

SANSOM FM. 2012. The role of the NTPDase enzyme Family in parasites: what do we know, and where to from here? **Parasitology**, **139(8)**:963-980.

SANSOM FM, RALTON JE, SERNEE MF, COHEN AM, HOOKER DJ, HARTLAND EL, NADERER T, MCCONVILLE MJ. 2014. Golgi-Located NTPDase1 of *Leishmania major* is Required for Lipophosphoglycan Elongation and Normal Lesion Development whereas Secreted NTPDase2 is Dispensable for Virulence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, **8(12)**:e3402.

SANTOS RF, POSSA MAS, BASTOS MS, GUEDES PMM, ALMEIDA MR, DEMARCO R, VERJOVSKI-ALMEIDA S. 2009. Influence of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, **3**:e387.

SCHOTELIUS J, GONÇALVES-DA-COSTA SC. 1982. Studies on the relationship between lectin binding carbohydrates and different strains of *Leishmania* from the new world. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **77(1)**:19-27.

SHEHADEH N, CLACINARO F, BRADLEY BJ, BRUCHLIM I, VARDI P, LAFFERTY KJ. 1994. Effect of adjuvante therapy on development of diabetes in mouse and man. **Lancet**, **343**:706-707.

SHEVCHENKO A, WILM M, VORM O, MANN M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, **68(5)**:850-858.

SHI SP, QIU JD, SUN XY, SUO SB, HUANG SY, LIANG RP. 2012. PMeS: Prediction of Methylation Sites Based on Enhanced Feature Encoding Scheme. **PLoS ONE**, **7(6)**:e38772.

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.

SILVEIRA FT, LAINSON R, DE CASTRO GOMES CM, LAURENTI MD, CORBETT CEP. 2009. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite immunology**, **31**:423-431.

SILVERMAN LM, CHANN SK, ROBINSON DP, DWYER DM, NANDAN D, FOSTER LJ, REINER, NE. 2008. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. **Genome Biology**, **9**:R35.

SINGH B, SUNDAR S. 2012. Leishmaniasis: Vaccine candidates and perspectives. **Vaccine**, **30**:3834-4842.

SINGH H AND RAGHAVA GPS. 2001. ProPred: Prediction of HLA-DR binding sites. **Bioinformatics**, **17(12)**:1236-37.

SINGH H AND RAGHAVA GPS. 2003. ProPred1: Prediction of promiscuous MHC class-I binding sites. **Bioinformatics** **19(8)**:1009-1014.

SOONG L, HENARD CA, MELBY PC. 2012. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. **Seminars in Immunopathology**, **34(6)**:735-751.

TAN F, HU S, 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 F, XIN H, PAN C-W, DING J-Q, CHEN X-G. 2010. Monoclonal antibodies against nucleoside triphosphate hydrolase-II can reduce the replication of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology International**, **59**:141-146.

TAN Z, SHANG S, DANISHEFSKY SJ. 2011. Rational development of a strategy for modifying the aggregability of proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **108**:4297-4302.

TANAKA K, GILROY S, JONES AM, STACEY G. 2010. Extracellular ATP signaling in plants. **Trends in Cell Biology**, **20**:601-608.

TASCA T, BONAN CD, CARLI GA, BATTASTINI AM, SARKIS JJ. 2003. Characterization of na ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) activity in intact cells of *Trichomonas vaginalis*. **Experimental Parasitology**, **105**:167-173.

TOVELL VE, SANDERSON J. 2008. Distinct P2Y Receptor Subtypes Regulate Calcium Signalling in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, **49(1)**:350-357.

TRAVERSO-CORI A, CHAIMOVICH H, CORI O. 1965. Kinetic Studies and properties of potato apyrase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **109**: 173-184.

UTZINGER J, BECKER SL, KNOPP S, BLUM J, NEUMAYR AL, KEISER J, HATZ CF. 2012. Neglected tropical diseases: diagnosis, clinical management, treatment and control. **Swiss Medical Weekly**, **142**:w13727.

VASCONCELLOS RS, MARIOTINI-MOURA C, GOMES RS, SERAFIM TD, FIRMINO RC, SILVA E BASTOS M, CASTRO FF, OLIVEIRA CM, BORGES-PEREIRA L, DE SOUZA AC, DE SOUZA RF, GÓMEZ GA, PINHEIRO ADAC, MACIEL TE, SILVA-JÚNIOR A, BRESSAN GC, ALMEIDA MR, BAQUI MM, AFONSO LC, FIETTO JL. 2014. *Leishmania infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 is an Apyrase Involved in Macrophage Infection and Expressed in Infected Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, **8(11)**:e3309.

VASCONCELOS EG, FARIA-PINTO P, REZENDE-SOARES FA, PENIDO ML, GONÇALVES-DA-COSTA SC, COELHO PMZ. 2009. **Potato Apyrase: A new tool for parasitic disease research**. In: Tennant P, Benkeblia N (eds). *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology 3*, Ikenobe, Japan: Global Science Books, Ltd.; p. 80-88.

VASCONCELOS EG, FERREIRA ST, DE CARVALHO TM, SOUZA W, KETTLUN AM, MANCILLA M, VALENZUELA MA, 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. **The Journal of Biological Chemistry**, **271**:22139-22145.

VASCONCELOS EG, NSCIMENTO OS, MEIRELLES MNL, VERJOVSKI-ALMEIDA S, FERREIRA ST. 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.

VOLF P, MYSKOVA J. 2007. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. **TRENDS in parasitology**, **23(3)**:91-92.

WANASSEN N, XIN L, SOONG L. 2008. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. **International Journal of Parasitology**, **38**:417-429.

WANG CJH, VLAJKOVIC SM, HOUSLEY GD, BRAUN N, ZIMMERMANN H, ROBSON SC, SÉVIGNY J, SCOELLER C, THOME PR. 2005. C-terminal splicing of NTPDase2 provides distinctive catalytic properties, cellular distribution and enzyme regulation. **Biochemical Journal**, **385**:729-736.

WANG TF, GUIDOTTI G. 1996. CD39 is an ecto-(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>)-apyrase. **The Journal of Biological Chemistry**, **271**:9898-9901.

WU J, STEINEBRUNNER I, SUN Y, BUTTERFIELD T, TORRES J, ARNOLD D, GONZALEZ A, JACOB F, REICHLER S, ROUX SJ. 2007. Apyrases (nucleoside triphosphate diphosphohydrolases) play key role in growth control in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, **144**:961-975.

WU Y, SUN XF, KACZMAREK E, DWYER KM, BIANCHI E, USHEVA A, ROBSON SC. 2006. RanBPM associates with CD39 and modulates ecto-nucleodidase activity. **Biochemical Journal**, **396**:23-30.

YANG Z, MOSSER DM, ZHANG X. 2007. Activation of the MAK ERK following *Leishmania amazonensis* infection of macrophages. **The Journal of Immunology**, **178**:1077-1085.

YOUNG CL, BRITTON ZT, ROBINSON AS. 2012. Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. **Biotechnology Journal**, **7**:620-634.

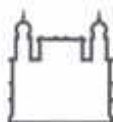
ZAVERUCHA DO VALLE T, GASPAR EB, SOUZA-LEMONS C, SOUZA CS, MARQUEZ FB, BAETAS-DA-CRUZ W, D'ESCOFIER LN, CORTE-REAL S, CALABRESE KS, GONÇALVES DA COSTA SC. 2007. Experimental *Leishmania (L.) amazonensis* leishmaniasis: characterization and immunogenicity of subcellular fractions. **Immunological Investigations**, **36**:473-492.

ZHONG XT, MALHOTRA R, WOODRUFF R, GUIDOTTI G. 2001. Mammalian plasma membrane ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1, CD39, is not active intracellularly – The *N*-glycosylation state of CD39 correlates with surface activity and localization. **The Journal of Biological Chemistry**, **276**:41518-41525;

ZIMMERMAN H, ZEBISCH M, STRÄTER. 2012. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signalling**, **8**:437-502.

ZIMMERMANN H, BEAUDOIN AR, BOLLEN M, GODING JW, GUIDOTTI G, KIRLEY TL, ROBSON SC, SANO K. 2000. **Proposed nomenclature for two novel nucleotide hydrolyzing enzyme families expressed on the cell surface**. In: Vanduffel L, Lemmens R (eds) Ecto-ATPases and related ectonucleotidases. Shaker Publishing B.V., Maastricht, The Netherlands.

ZIMMERMAN H. 2001. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Development Research**, **52**:44-56.

**Anexo A – Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética**

Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo CruzVice-presidência de Pesquisa e  
Laboratórios de ReferênciaComissão de Ética  
no Uso de Animais**TERMO ADITIVO AO CERTIFICADO DE LICENÇA Nº L-001/07**

A Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, em atenção à solicitação da Dr<sup>a</sup>. **KÁTIA DA SILVA CALABRESE**, autoriza o presente Aditivo para prorrogação de 1 ano da licença L-001/07, referente ao protocolo 311/06 “**Imunopatologia das Leishmanioses no Modelo Murino**”.

A validade deste Aditivo é 05 de fevereiro de 2012.

Rio de Janeiro, 14 de dezembro de 2010.

**Octavio Augusto França Presgrave**  
Coordenador da CEUA/FIOCRUZ

Anexo B – Depósito da sequência da NTPDase 1 de *L. amazonensis* no NCBI

**NTPDase 1, partial [Leishmania amazonensis]**

GenBank: AFJ22627.1  
[FASTA](#) [Graphics](#)

---

[Go to](#) 

LOCUS AFJ22627 369 aa linear INV 27-AUG-2013  
 DEFINITION NTPDase 1, partial [Leishmania amazonensis].  
 ACCESSION AFJ22627  
 VERSION AFJ22627.1 GI:386762716  
 DBSOURCE accession [JQ623507.1](#)  
 KEYWORDS -  
 SOURCE Leishmania amazonensis  
 ORGANISM [Leishmania amazonensis](#)  
 Eukaryota; Euglenozoa; Kinetoplastida; Trypanosomatidae;  
 Leishmaniinae; Leishmania.

REFERENCE 1 (residues 1 to 369)  
 AUTHORS Detoni,M.L., Fessel,M.R., Maia,A.C., Forcino,G.N., Quellis,L.R.,  
 Faria-Pinto,P., Marques,M.J., Juliano,M.A., Juliano,L., Diniz,V.A.,  
 Corte-Real,S., Goncalves-da-Costa,S.C., Souza,C.S. and  
 Vasconcelos,E.G.  
 TITLE An antigenic domain of the Leishmania amazonensis nucleoside  
 triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is associated with  
 disease progression in susceptible infected mice  
 JOURNAL Parasitol. Res. 112 (8), 2773-2782 (2013)  
 PubMed [23681191](#)

REFERENCE 2 (residues 1 to 369)  
 AUTHORS Fessel,M.R., Detoni,M.L., Marques,M.J. and Vasconcelos,E.G.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (05-FEB-2012) Instituto de Ciencias Biologicas -  
 Departamento de Bioquimica, Universidade Federal de Juiz de Fora,  
 Rua Jose Lourenco Kelmer, s/n, Juiz de Fora, MG 36036-900, Brazil

COMMENT Method: conceptual translation.

FEATURES  
 Location/Qualifiers  
 source 1..369  
 /organism="Leishmania amazonensis"  
 /strain="MHOM/BR/1973/M2269"  
 /db\_xref="taxon:5659"  
 Protein <1..>369  
 /product="NTPDase 1"  
 /name="LaNTPDase1"  
 Region 6..>159  
 /region\_name="NBD\_sugar-kinase\_HSP70\_actin"  
 /note="Nucleotide-Binding Domain of the sugar  
 kinase/HSP70/actin superfamily: cd00012"  
 /db\_xref="CDD:212657"  
 Site order(9..12,14,16,123,149..152)  
 /site\_type="other"  
 /note="nucleotide binding site [chemical binding]"  
 /db\_xref="CDD:212657"  
 CDS 1..369  
 /gene="NTPDase1"  
 /coded\_by="JQ623507.1:<1..>1108"

ORIGIN  
 1 anvydivida gctgsrvhvf qyerstqgv lkerfkrie pqlsafdtp dgakesltgl  
 61 lrfadevvpv syqrctsevl katagrlrlp esdqqvmla eqqalnaspf qergasiisg  
 121 aqegvygwit vnylldrldt dvtiatidm ggastqvffe tptegewlp fnyahqlril  
 181 krtisvyqhs ylglgmneak kklmtifaea ngtssfpccp rgytkhndv kirnndatdf  
 241 dacvqlfreh vittstorfd acqargvqpq lfperrhpvy afsyfydrly hfhkegrpvv  
 301 velykevgke vchreasara ctpeetacme laylysfltn qlglgddtal tvpnriagms  
 361 vswslgssl  
 //

---

You are here: NCBI > Proteins > Protein Database



**Anexo C – MAIA *et al.*, 2011**

Developmental and Comparative Immunology 35 (2011) 1057–1065

Contents lists available at ScienceDirect

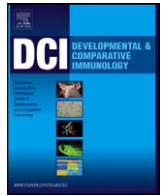
**Developmental and Comparative Immunology**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/dci](http://www.elsevier.com/locate/dci)



**Occurrence of a conserved domain in ATP diphosphohydrolases from pathogenic organisms associated to antigenicity in human parasitic diseases**

Ana Carolina Ribeiro Gomes Maia<sup>a,b</sup>, **Michelle Lima Detoni**<sup>a,b</sup>, Gabriane Nascimento Porcino<sup>a,b</sup>,  
Thais Vieira Soares<sup>a,c</sup>, Michelia Antônia do Nascimento Gusmão<sup>a,b</sup>, Melissa Regina Fessel<sup>d</sup>,  
Marcos José Marques<sup>d</sup>, Maria Aparecida Souza<sup>e</sup>, Paulo Marcos Zech Coelho<sup>f</sup>,  
Juliana Assis Silva Gomes Estanislau<sup>g</sup>, Manoel Olávio da Costa Rocha<sup>h</sup>, Marcelo de Oliveira Santos<sup>b</sup>,  
Priscila Faria-Pinto<sup>a,b,c</sup>, Eveline Gomes Vasconcelos<sup>a,b,c,g</sup>



## Occurrence of a conserved domain in ATP diphosphohydrolases from pathogenic organisms associated to antigenicity in human parasitic diseases

Ana Carolina Ribeiro Gomes Maia<sup>a,b</sup>, Michelle Lima Detoni<sup>a,b</sup>, Gabriane Nascimento Porcino<sup>a,b</sup>, Thais Vieira Soares<sup>a,c</sup>, Michelia Antônia do Nascimento Gusmão<sup>a,b</sup>, Melissa Regina Fessel<sup>a</sup>, Marcos José Marques<sup>d</sup>, Maria Aparecida Souza<sup>e</sup>, Paulo Marcos Zech Coelho<sup>f</sup>, Juliana Assis Silva Gomes Estanislau<sup>g</sup>, Manoel Otávio da Costa Rocha<sup>h</sup>, Marcelo de Oliveira Santos<sup>b</sup>, Priscila Faria-Pinto<sup>a,b,c</sup>, Eveline Gomes Vasconcelos<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil

<sup>b</sup> Pós-Graduação em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias/Genética e Biotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil

<sup>c</sup> Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brazil

<sup>e</sup> Laboratório de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

<sup>f</sup> Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>g</sup> Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>h</sup> Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 December 2010

Received in revised form 15 February 2011

Accepted 27 March 2011

Available online 19 April 2011

#### Keywords:

Potato

*Schistosoma mansoni*

*Leishmania (V.) braziliensis*

*Trypanosoma cruzi*

Apyrase

NTPDase

Polypeptide

### ABSTRACT

A polypeptide (r78–117) belonging to the potato apyrase was identified as a conserved domain shared with apyrase-like proteins from distinct pathogenic organisms, and was obtained as a 6xHis tag polypeptide (r-Domain B). By ELISA, high IgG, and IgG1 and IgG2a subtypes levels were detected in BALB/c mice pre-inoculated with r-Domain B. In *Schistosoma mansoni* adult worm or *Leishmania (V.) braziliensis* promastigote preparation, anti-r-Domain B antibodies inhibit 22–72% of the phosphohydrolytic activities and when immobilized on Protein A-Sepharose immunoprecipitate 42–91% of them. Western blots of the immunoprecipitated resin–antibody–antigen complexes identified bands of mw similar to those predicted for parasite proteins. Total IgG and subclasses of patients with leishmaniasis or schistosomiasis exhibited cross-immunoreactivity with r-Domain B. Therefore, the domain B within both *S. mansoni* SmATPDase 2 (r156–195) and *L. (V.) braziliensis* NDPase (r83–122) are potentially involved in the host immune response, and also seem to be conserved during host and parasites co-evolution.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

ATP diphosphohydrolases (EC 3.6.1.5), also named apyrase, NTPDase, NTPase or NDPase, are ubiquitous enzymes that share several common features, such as ability to hydrolyze nucleosides di- and triphosphate to the corresponding nucleoside monophosphates upon bivalent metal ion activation. They belong to the ATP diphosphohydrolase family, which shares five apyrase-conserved regions

(ACR1–ACR5) that are involved in the catalytic cycle (Handa and Guidotti, 1996; Kettlun et al., 2005; Robson et al., 2006; Sansom et al., 2008b; Vasconcelos et al., 1996, 2009).

Eight different genes encoding members of the mammalian NTPDase family were described, and specific isoforms are involved in the modulation of signals mediated by cell-surface purinergic receptors (Gendron et al., 2002; Robson et al., 2006). In plants, studies concerning the physiological role suggested that apyrase activity is involved in the regulation of the synthesis of cell wall proteins, sucrose and starch biosynthesis and/or modulation signals produced by rhizobial infection (Day et al., 2000; Kettlun et al., 2005). In pathogenic agents such as *Schistosoma mansoni*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, *Trypanosoma cruzi*, *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas gallinae*, *Taenia crassiceps cysticercis* and *Legionella pneumophila*, the ATP

\* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica/ICB, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer s/n - Campus Universitário, Bairro São Pedro, Juiz de Fora, MG, CEP: 36036-900, Brazil. Tel.: +55 32 3229 3217; fax: +55 32 3229 3216.

E-mail address: [eveline.vasconcelos@ufjf.edu.br](mailto:eveline.vasconcelos@ufjf.edu.br) (E.G. Vasconcelos).



diphosphohydrolase activity has been associated with the purine recuperation and/or as a protective mechanism against the host organism under conditions that involve ATP or ADP, such as immune responses and platelet activation (Bermudes et al., 1994; Borges et al., 2008; Coimbra et al., 2002; Faria-Pinto et al., 2004; Fietto et al., 2004; Guevara-Flores et al., 2008; Rezende-Soares et al., 2010; Sansom et al., 2008a; Tasca et al., 2004; Vasconcelos et al., 1993, 1996, 2009). These proteins have been suggested as possible targets for the treatment of several diseases (Burnstock and Verkhatsky, 2009; Gendron et al., 2002; Penido et al., 2007; Sansom et al., 2008b; Vasconcelos et al., 2009).

The antigenicity of native parasite ATP diphosphohydrolase isoforms, recombinant protein or synthetic peptides belonging of them have been reported only in *T. gondii*, *S. mansoni*, *L. amazonensis* and *L. braziliensis* (Asai et al., 1992; Coimbra et al., 2008; Faria-Pinto et al., 2004; Johnson et al., 1999; Rezende-Soares et al., 2010). Cross-immunoreactivity between immune sera against potato (*Solanum tuberosum*) apyrase and native ATP diphosphohydrolase isoforms isolated from *S. mansoni* egg and adult worm tegument, *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) braziliensis* suggested that the vegetable and parasite proteins share epitopes. In addition, total IgG antibody from the serum of either *S. mansoni* or *L. amazonensis*-infected mice, and patients with schistosomiasis or leishmaniasis recognized potato apyrase in accordance with the existence of antigenic domains within parasites ATP diphosphohydrolases, these epitopes being shared with those from vegetable protein (Coimbra et al., 2008; Faria-Pinto et al., 2004, 2006, 2008, 2010a,b; Rezende-Soares et al., 2010; Vasconcelos et al., 1996). In previous work we show domains of high identity between potato apyrase and either *L. braziliensis* NDPase or *S. mansoni* SmATPDase 2 by alignment of their primary amino acid sequences, phylogenetic analysis and by hypothetical three-dimensional models, suggesting that these conserved domains may be exposed and available for antibody and human leukocyte antigen (HLA)-DR binding (Faria-Pinto et al., 2008; Vasconcelos et al., 2009).

Now, *in silico* analysis of a specific domain shared between potato apyrase and apyrase like-proteins of pathogenic organisms from distinct phylogenetic lineages justified the obtaining of a polypeptide belonging to this vegetable protein (r78–117) as a 6xHis tag polypeptide (r-Domain B). It was used in this work as a molecular tool for identification of this conserved domain in homologue proteins from *S. mansoni* and *L. (V.) braziliensis*, and for studies of the immunological potential of the domain B of these parasite proteins.

## 2. Material and methods

### 2.1. *In silico* analysis

Comparison of 38 members of the ATP diphosphohydrolase family, which includes mammals, helminthes and protozoan parasites, hematophagous arthropods, fungi and plant proteins, in the Swiss-Prot database was carried out using Fasta3. Sequence alignments were produced with T-Coffee (Notredame et al., 2000). The domains B from these proteins were extracted and hand-edited. The alignment of the amino acid sequence of the potato apyrase, *S. mansoni* SmATPDase 2 and *L. braziliensis* NDPase, appointing the apyrase conserved regions (ACRs) and domains B from these proteins (A); the alignment of the domains B from these proteins shown in detached mode (B) and modeled structure of isolated protein and its exposed domain B, constructed in Swiss-Model Workspace and using Swiss-Pdb Viewer program (<http://swissmodel.expasy.org/workspace>) (C) are shown in Supplementary figure.

### 2.2. r-Domain B and antibody production

The recombinant Domain B (r-Domain B; molecular mass 5493 kDa) was generated by the fusion of a six-histidine-linked tag at the N-terminal of the conserved domain (r78–117; Fig. 1) of the potato apyrase (accession number U58597.1). The expression cassette of the potato Domain B was synthesized by Epotech Biolabs (Missouri City, USA) bearing T5 promoter and regulatory regions. This plasmid was transferred to *E. coli* cells strain BL21 (DE3) by electroporation. After expression induced by isopropyl-1-thio-d-galactopyranoside (IPTG), r-Domain B was purified by affinity chromatograph using HisTrap affinity columns (GE Healthcare Life Sciences, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's instructions. The pure r-Domain B was evaluated by Western blots using rabbit polyclonal anti-potato apyrase (Faria-Pinto et al., 2004) and mouse anti-His antibody (GE Healthcare Life Sciences, São Paulo, Brazil). Assays were developed by chemiluminescence with the specific secondary antibody coupled to horseradish peroxidase and Luminol as substrate using the ECL Western Blotting System (GE Healthcare Life Sciences, São Paulo, Brazil) and exposed to X-ray film following the manufacturer's instructions.

Polyclonal antiserum against r-Domain B was obtained from seven-week-old BALB/c mice ( $n=5$ ) that were inoculated by a peritoneal route with two injections of r-Domain B (10 µg); the first injection was emulsified in Freund's complete adjuvant and the other injection was in Freund's incomplete adjuvant and delivered in 15-day interval. Pre-immune serum was used as Control. The sera were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3. Patients

The serum samples of patients confirmed with schistosomiasis ( $n=30$ ; Faria-Pinto et al., 2010a), American cutaneous leishmaniasis ( $n=30$ ; Rezende-Soares et al., 2010) or Chagas disease ( $n=30$ ; Faria-Pinto et al., 2008) were selected of serum collections from the Centro de Pesquisas Rene Rachou, Belo Horizonte, MG, Brazil, and Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brazil. As a control, 27 selected sera from healthy individuals from non-endemic areas for these diseases, and without any other parasitic disease were also tested. The study protocols were approved by the Ethical Committee for Human Research under protocols CEPISH/CPqRR 06/2001 and 04/2005, and UNIFAL 141/2006.

### 2.4. Antibody analyses by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

Aliquot of r-Domain B (10 µg/ml) in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6, was adsorbed overnight onto flat-bottomed microtiter plates (Costar 3590; Corning Inc., Corning, NY, USA). Following a blocking step (0.15 M phosphate buffer solution, pH 7.2, plus 0.1% Tween-20 and 2.5% casein), sera diluted 1:200–1:6400, in duplicate, from BALB/c mice ( $n=4$ ) inoculated with potato apyrase (Faria-Pinto et al., 2010b) or r-Domain B ( $n=5$ ), and their respective pre-immune sera, were incubated for 5 h at  $4^{\circ}\text{C}$  in this blocking buffer without Tween-20. Sera diluted 1:100 (total IgG or IgG antibody subclasses) from either healthy individuals ( $n=27$ ) or from patients with ACL ( $n=30$ ), schistosomiasis mansoni ( $n=30$ ) or Chagas disease ( $n=30$ ) were also tested in duplicate, and in 3 different experiments, using the same experimental conditions. Antibodies bound to the antigen-plate were detected using peroxidase-conjugated, isotype-specific (Sigma, St. Louis, MO; PharMingen, San Diego, CA, USA), and o-phenylenediamine dihydrochloride/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as substrate. The subsequent color reaction was read at 492 nm on a microplate reader (Molecular Devices Corp., Menlo Park, CA). The results were expressed in optical density  $\pm 2$  SD (standard deviation). Graph-Pad Prism Software (version 4) was used for statistical analysis.

Organism (protein)	Domain B	I	S
	plants		
> <i>S. tuberosum</i> apyrase	<sup>76</sup> EYEMGTPEGLS SYAEDPKAARN SLKPLLDGAGCVVPELQ	-	-
> <i>D. biflorus</i> apyrase	<sup>62</sup> ELFVKTKPGLS SYAENPEEARE SLVPLLEKAEAVIQELH	62% (25/40)	80% (32/40)
> <i>G. soja</i> apyrase	<sup>66</sup> ELFVKTKPGLS SYAENPDQARE SLIPLLEKAEAVIQEFH	60% (24/40)	72% (29/40)
> <i>P. sativum</i> apyrase	<sup>100</sup> ELFEQLKPGLS SYAKNPKARE SLI SLLDKAE SVVPRELR	60% (24/40)	75% (30/40)
> <i>M. truncatula</i> apyrase	<sup>160</sup> ELFEQLKPGLS SYAOKPOQARE SLVSLLEKAGCVVPELR	58% (23/40)	75% (30/40)
	parasites		
> <i>L. infantum</i> NDPase	<sup>63</sup> EREKRVPEGLS SFATDIDGAKESLMLLRFADTKVVPQ SYQ	55% (22/40)	60% (24/40)
> <i>L. major</i> NDPase	<sup>63</sup> EREKRAEPDLS SFATDIDGAKESLMLLRFADTKVVPQ SYQ	52% (21/40)	57% (23/40)
> <i>L. braziliensis</i> NDPase	<sup>63</sup> EREKRI EPGLS SFATDIDGAKESLMLLRFADTKVVPQ SYQ	50% (20/40)	57% (23/40)
> <i>S. mansoni</i> SmATPase 2	<sup>156</sup> DKEHHVQPLS SYAEKPEEARL SLTKLINIARETSLPVDVC	45% (18/40)	63% (25/40)
> <i>S. japonicum</i> NP	<sup>157</sup> DNYHHI KPGLS SYAEKPEEARL SLTKLINIARETSLPVGVC	43% (17/40)	60% (24/40)
> <i>S. mansoni</i> GDPase	<sup>156</sup> PVVKKKSPGLS SFADKLSIDIRYI SALLDYAE SHIPRSSQ	33% (13/40)	43% (17/40)
> <i>L. infantum</i> GDPase	<sup>236</sup> ELFEELNHKALS ELDNPVQDAPPEALVELFVAKKDFVPRELH	30% (12/40)	30% (12/40)
> <i>L. major</i> GDPase	<sup>236</sup> ELFEELNHKALS SELNSVQDAPPEALVELFVAKKDFVPRELH	30% (12/40)	30% (12/40)
> <i>L. braziliensis</i> GDPase	<sup>251</sup> ELFEELNYKALS SELNPNVQDAPPEALVELFVAKKDFVPRELH	30% (12/40)	30% (12/40)
> <i>S. mansoni</i> SmATPase 1	<sup>165</sup> VTNEKL SPGLS DYI NTDTIKRYD TLKPKLLKLTNSLITEEQK	25% (10/40)	33% (13/40)
> <i>T. cruzi</i> NTP 1	<sup>247</sup> DELEVENYEP L SGLANPNDAVAL SPLIEAARKRYIPE SLH	23% ( 9/40)	38% (15/40)
> <i>T. gondii</i> NTPase 1	<sup>146</sup> QYVPQMEGAKKLMQL LEE DTVAILDSQLNEKQKVVVKAL	MS	MS
> <i>T. gondii</i> NTPase 2	<sup>146</sup> QYVPQMEGAKKLMQL LEE DTVAILDSQLNEKQKVVVKAL	MS	MS
> <i>P. falciparum</i> NDPase	<sup>141</sup> FNRAKVKKSI STISYNKIKDILLTYLINKVIDHLI EKRTYV	MS	MS
	fungi		
> <i>C. neoformans</i> GDPase	<sup>278</sup> ETEMAVKPKGLS SYARDPTAARA SLDPLLE EARYRVVPE SLR	62% (25/40)	77% (31/40)
> <i>A. dermatitidis</i> GDPase	<sup>106</sup> TEKRNCGGLS SYAEDPEAARR SLDPLMLLALNS VPE EYQ	53% (21/40)	65% (26/40)
> <i>P. brasiliensis</i> GDPase	<sup>106</sup> TEKRNCGGLS SYARDPEAARR SLDPLME VALKAVPKEYQ	48% (19/40)	63% (25/40)
> <i>M. canis</i> GDPase	<sup>156</sup> TEKRNCGGLS SYAEDPEAARR SLDPLME VALKAVPKEYQ	43% (17/40)	58% (23/40)
	hematophagous		
> <i>G. m. morsitans</i> NTPDase	<sup>115</sup> ELFEKERPKGLS SFADNPEKRAL SIKLLLDKAKAFIPKEKW	45% (18/40)	70% (28/40)
> <i>A. gambiae</i> NP	<sup>113</sup> ELFEQSKPGLS SFACRPEE GAASTI CGLLDLAKRVVPEAKL	43% (17/40)	63% (25/40)
> <i>A. aegypti</i> NDPase	<sup>107</sup> ELYKHSKPGLS SFADRPEEGARITDKLLQ EAKHVIPKEKI	35% (14/40)	68% (27/40)
> <i>X. cheopis</i> apyrase	<sup>67</sup> EKENKTPAGLS SYADNPRKGA IETVRLVRSINSE VPKHLK	40% (16/40)	57% (23/40)
	mammals		
> <i>H. sapiens</i> NTPDase 6	<sup>153</sup> ETEKALKPGLS SYARDVVEKSAQGI RELLDVAKQDIPDFW	40% (16/40)	60% (24/40)
> <i>H. sapiens</i> NTPDase 5	<sup>61</sup> EVED SVKPKGLS RFVDQPKDCAETVQGLE VAKDSIPRSHW	33% (13/40)	63% (25/40)
> <i>H. sapiens</i> NTPDase 2	<sup>79</sup> SCDVPGGGIS SYADNPSGASQSLVCCLEQALQDVPKERH	35% (14/40)	50% (20/40)
> <i>H. sapiens</i> NTPDase 7	<sup>125</sup> PVVKKI KPGLS SARA DTPEHRSYLRPLLS FARAHVVPVKKH	33% (13/40)	50% (20/40)
> <i>H. sapiens</i> NTPDase 4	<sup>130</sup> PVVVKI KPGLS SEFATSPEKVS DYI SPLLNFAREHVPRAKH	30% (12/40)	53% (21/40)
> <i>H. sapiens</i> NTPDase 8	<sup>76</sup> LACQVEGPGIS SYT SNAQAQGE SLQGCLE EALVL IPEAQH	28% (11/40)	45% (18/40)
> <i>H. sapiens</i> NTPDase 3	<sup>66</sup> EKCSVKGSGIS SYCANPNQD VPRFE EECMQKVKQGVPSHLH	25% (10/40)	40% (16/40)
> <i>H. sapiens</i> NTPDase 1	<sup>62</sup> EBCRVKPGIS SFVQKVNDEIGTYLTDCEMAREV IPRSQH	20% ( 8/40)	35% (14/40)
	green alga		
> <i>O. tauri</i> apyrase	<sup>168</sup> DEFEETKPGLS SAHNDPKAARD SLKGLMKTAVESVPLADR	45% (18/40)	57% (23/40)
	bacteria		
> <i>L. pneumophila</i> NTPDase 2	<sup>61</sup> IVNRKAVPGLSTIEHENEKSVSRYMEKLES DAPAVLMPVYF	23% ( 9/40)	40% (16/40)
> <i>L. drancourtii</i> NTPDase 1	<sup>62</sup> IVLKKIQPAFASLE TNQNTLDYRMAILLES GAPAQKMPVYF	MS	MS

**Fig. 1.** Primary structure alignment of the domain B of proteins from distinct organisms. The identical amino acid residues of potato apyrase are shown as grey columns. GenBank accession numbers of the amino acid sequences are: *S. tuberosum* apyrase, P80595; *Dolichos biflorus* apyrase, AF156781; *Glycine soja* apyrase, AAG32959; *Pisum sativum* apyrase, BAB85978; *Medicago truncatula* apyrase, AA023007; *L. infantum* NDPase, CAM66723; *L. major* NDPase, CAJ03227; *L. braziliensis* NDPase, CAM42020; *S. mansoni* SmATPase2, DQ868522; *S. japonicum* NP, AAW26231; *S. mansoni* GDPase, CAZ35542.1; *L. infantum* GDPase, CAM66031.1; *L. major* GDPase, Q4QHK3; *L. braziliensis* GDPase, CAM37219; *S. mansoni* SmATPase1, AAP94734; *T. cruzi* NTP1, AAS75599; *T. gondii* NTPase 1, AAC80188.1; *T. gondii* NTPase 2, Q27893.1; *P. falciparum* NDPase, XP.00138471; *C. neoformans* GDPase, XP.568971.1; *A. dermatitidis* GDPase, EEQ90304.1; *P. brasiliensis* GDPase, XP.002795447.1; *M. canis (O. taei)* GDPase, XP.002848245.1; *Glossina m. morsitans* NTPDase, ADD18439.1; *A. gambiae* NP, XP.320057.3; *A. aegypti* NDPase, XP.001651207.1; *X. cheopis* apyrase, ABM55468.1; *H. sapiens* NTPDase 6, AAP92131; *H. sapiens* NTPDase 5, NP.001240; *H. sapiens* NTPDase 2, NP.982293; *H. sapiens* NTPDase 7, NP.065087; *H. sapiens* NTPDase 4, NP.004892; *H. sapiens* NTPDase 8, AAR04374; *H. sapiens* NTPDase 3, NP.001239; *H. sapiens* NTPDase 1, NP.001767; *O. tauri* apyrase, CAL51527.1; *L. pneumophila*, ABQ56238.1; ATPDase2; *L. drancourtii* ATPDase1, ZP.05111776.1. NSS, no significant similarity.

The median and the 95% confidence interval were calculated, and the data were analyzed using the Mann–Whitney test to compare 2 groups, or Kruskal–Wallis test to compare 4 groups. *P* values <0.05 were considered significant.

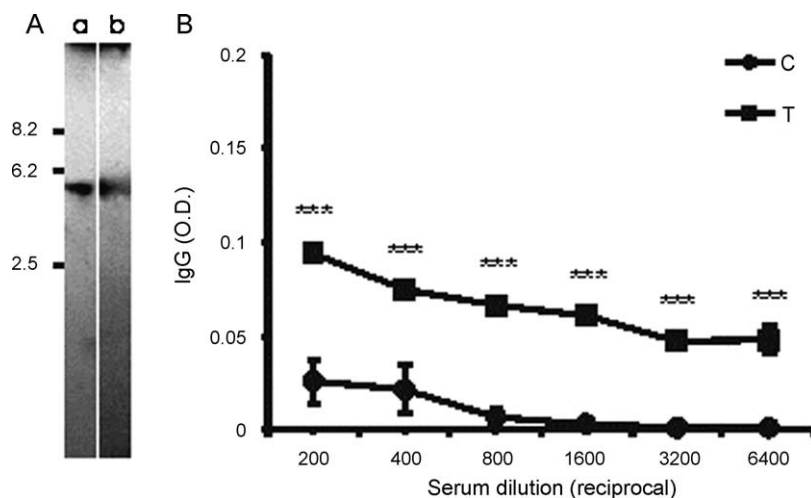
**2.5. Effects of mouse polyclonal anti-r-Domain B antibody on the phosphohydrolytic activity and identification of active ATP diphosphohydrolase isoforms by immunoprecipitation assays**

Preparations of *S. mansoni* adult worm (Faria-Pinto et al., 2010b) and *L. (V.) braziliensis* promastigote (MHOM/BR/1975/M2903 strain; Rezende-Soares et al., 2010) were obtained as previously described. An aliquot of each preparation was suspended in standard reaction medium (see below) supplemented with 1 mg/ml dodecyl nonaethylene glycol ether (C<sub>12</sub>E<sub>9</sub>), a non-ionic detergent that maintains both significant parasite enzyme activity and a clear reaction medium for colorimetric measurements (Coimbra et al., 2008). After centrifugation at 10,000 × *g* for 10 min at 4 °C, mouse immune serum containing polyclonal anti-r-Domain B antibodies at a final dilution of 1:400 was added to the aliquots of high-speed supernatant (5 mg protein/ml) and incubated for 3 h at room temperature. Control assay using pre-immune serum was run in parallel. An aliquot of each preparation was used for phospho-

hydrolytic activity measurements in standard reaction medium, as describe below. Protein A-Sepharose was added and incubated for an additional 2 h. The resin-mouse antibody-antigen complexes were sedimented by centrifugation for 5 min, washed 3 times in 50 mM MOPS buffer, pH 7.4, solubilized in gel loading buffer and submitted to sodium dodecyl sulfate-10% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), using Mini-Protein III Cell (Bio-Rad). Supernatants were used for phosphohydrolytic activity measurements.

**2.5.1. Western blots**

The proteins were electroblotted onto nitrocellulose membranes, followed by blocking step (0.15 M phosphate buffer solution, pH 7.4, plus 0.3% Tween-20 and 3% casein) using standard procedures (Rezende-Soares et al., 2010). To avoid reactivity with subunits from mouse-IgG, rabbit immune serum (diluted 1:1000) containing polyclonal anti-potato apyrase antibodies (Faria-Pinto et al., 2004), diluted in the same blocking buffer without Tween-20, were incubated overnight. Total proteins (100 µg) of *S. mansoni* adult worm and *L. (V.) braziliensis* promastigote preparations were also submitted to electrophoresis in 10% SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membranes, and developed with mouse polyclonal serum anti-r-Domain B (diluted 1:800). Signals were



**Fig. 2.** (A) Aliquot of pure r-Domain B (1 µg; a, b) was electrophoresed in 18% SDS-PAGE, electroblotted onto nitrocellulose and developed with rabbit polyclonal antibodies against potato apyrase (b). Anti-His antibody (a) was used as positive control. The signals were revealed by chemiluminescence. (B) The reactivity of total IgG from BALB/c mice (T;  $n = 4$ ) pre-inoculated with potato apyrase was tested against r-Domain B. Pre-immune serum ( $n = 4$ ) was used as control (C). Data are reported as mean  $\pm$  SD of optical density (O.D.). Asterisks mean  $***P < 0.001$ .

revealed by chemiluminescence using anti-IgG antibody coupled to horseradish peroxidase and Luminol as substrate (ECL Western Blotting System), and exposed to X-ray film following the manufacturer's instructions.

### 2.5.2. Phosphohydrolytic activity measurement

An aliquot of each preparation before addition of Protein A-Sepharose and supernatants obtained after addition of Protein A-Sepharose were used for phosphohydrolytic activity measurements in standard reaction medium. Briefly, for *L. (V.) braziliensis* promastigote, phosphohydrolytic activity measurement was performed in standard reaction medium containing 50 mM MOPS (3-(N-morpholino) propanesulfonic acid) buffer, pH 7.4, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100 µM sodium orthovanadate and 0.1 mg protein/ml (Rezende-Soares et al., 2010). For *S. mansoni* adult worm, phosphohydrolytic activity measurement was performed in standard reaction medium containing 50 mM MOPS buffer, pH 7.4, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 100 µM sodium orthovanadate, 1 mM ouabain, 10 mM sodium azide, and 0.03 mg protein/ml (Penido et al., 2007). The reaction was initiated by addition of 3 mM ATP or ADP, allowed to proceed for 60 min at 37 °C, and the amount of inorganic phosphate (Pi) liberated was determined spectrophotometrically (Rezende-Soares et al., 2010; Penido et al., 2007). All assays were performed in triplicate. The experiments were repeated twice with similar results.

## 3. Results

### 3.1. Alignment and comparison between domain B from the potato apyrase and domains B from distinct organism species

The alignment of the Domain B (r78–117) from the potato apyrase and its counterpart in the 38 members of the ATP diphosphohydrolase family was performed (Fig. 1). The identity between the Domain B from the potato apyrase and other plant apyrases varied from 58 to 62%, with 72–80% similarity over 40 amino acids (Fig. 1).

Among parasites, the proteins having a higher homology with r-Domain B from the potato apyrase were the *Leishmania* NDPases (50–55% identity and 57–60% similarity over 40 amino acids), followed by *S. mansoni* SmATPDase 2 (45% identity and 63% similarity over 40 amino acids) and *S. japonicum* nucleoside phosphatase

(43% identity and 60% similarity over 40 amino acids). High identity was also found within domain B of apyrase like-proteins from the fungi *Cryptococcus neoformans*, *Ajellomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Microsporium canis* (43–62% identity and 58–77% similarity) and hematophagous arthropods *Glossina morsitans morsitans*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* and *Xenopsylla cheopis* (35–45% identity and 57–70% similarity) (Fig. 1). The domain B from the potato apyrase did not share significant identity with its counterpart in *Leishmania* sp. GDPases, *S. mansoni* GDPase, *S. mansoni* SmATPDase 1, *T. cruzi* NTPDase 1, *Plasmodium falciparum* NDPase, *T. gondii* NTPases 1 and 2, *L. pneumophila* ATPDase 2 and *L. drancourtii* ATPDase 1 (Fig. 1).

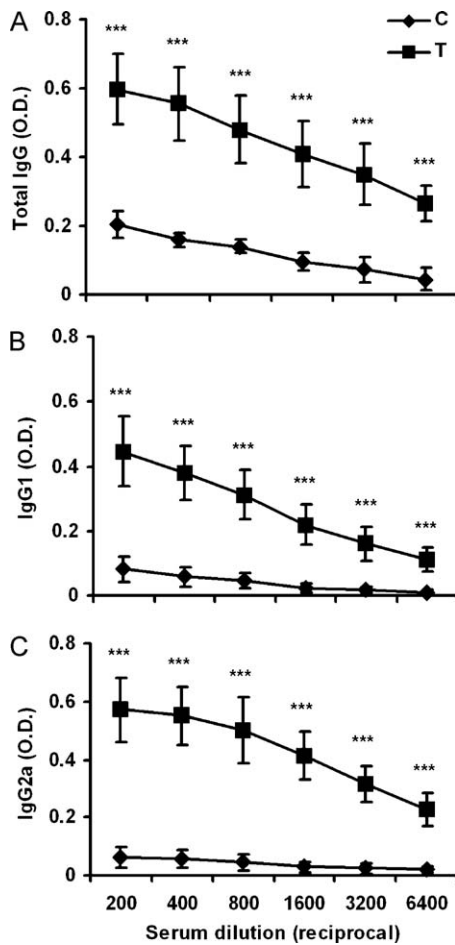
Among domains B from potato apyrase and mammalian proteins (Fig. 1), the highest degree of identity (33–40%) and similarity (60–63%) was encountered with NTPDases 6 and 5, while human NTPDases 1–4, 7 and 8, which are membrane-associated proteins (Robson et al., 2006), showed a lower degree of identity (20–35%) and similarity (35–53%).

### 3.2. Antigenicity of the domain B from the potato apyrase

Polyclonal antiserum against potato apyrase was obtained from pre-inoculated rabbit or BALB/c mice. Western blot of r-Domain B was positive for rabbit polyclonal IgG anti-potato apyrase antibodies (Fig. 2A). In addition, the immunological capacity of reactivity between mouse polyclonal IgG anti-potato apyrase ( $n = 4$ ) and r-Domain B was quantified by ELISA, using this polypeptide as coating antigen (Fig. 2B). High IgG antibody reactivity was observed in all serum dilutions (Fig. 2B; 1:200–1:6400) significantly ( $P < 0.001$ ) higher than the control. These results indicated that this specific domain contributes significantly for antibody production against integral potato apyrase in distinct mammals.

### 3.3. Immunostimulatory property of the r-Domain B

Healthy BALB/c mice were then inoculated per via peritoneal with r-Domain B. Total IgG antibody, and IgG subtype levels were quantified by ELISA using the diluted serum samples (Fig. 3; 1:200–1:6400). This polypeptide induced production of high levels of specific IgG (>1:6400), and IgG1 (>1:6400) and IgG2a (>1:6400) subtypes, significantly ( $P < 0.001$ ) higher than the controls (Fig. 3), suggesting distinct epitopes in this domain.



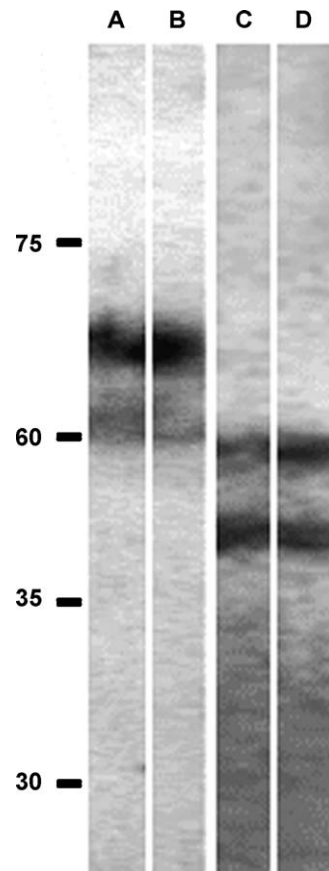
**Fig. 3.** r-Domain B stimulatory property. Total IgG (A) and IgG1 (B) and IgG2a (C) subtypes were quantified in serum samples from BALB/c mouse (T;  $n=5$ ) pre-inoculated with r-Domain B. Pre-immune serum ( $n=5$ ) was used as control (C). Data are reported as mean  $\pm$  SD of optical density (O.D.). Asterisks mean  $***P < 0.001$ .

#### 3.4. Mouse polyclonal anti-r-Domain B antibodies inhibit the ATP diphosphohydrolase activity of *S. mansoni* adult worm or *L. (V.) braziliensis* promastigote preparations

The effect of mouse polyclonal anti-r-Domain B antibodies binding on phosphohydrolytic activity from the *S. mansoni* SmATPDase 2 or *L. braziliensis* NDPase was tested using the detergent-homogenized preparations. Representative results are shown in Table 1. Under experimental conditions employed, polyclonal antibodies inhibited ATPase and ADPase activity of SmATPDase 2 at a similar level with either ATP (38%) or ADP (58%) as substrate (Table 1). Polyclonal antibodies inhibited ADPase activity of *L. braziliensis* NDPase by 72%, and to a lesser extent, the ATPase activity (Table 1; 22%).

#### 3.5. Identification of active ATP diphosphohydrolase isoforms in *S. mansoni* adult worm and *L. (V.) braziliensis* promastigote by anti-r-Domain B antibodies

Anti-r-Domain B antibodies were tested for their ability to immunoprecipitate ATP diphosphohydrolase from detergent-homogenized preparation of either *S. mansoni* adult worm or *L. (V.) braziliensis* promastigote. Under experimental conditions employed, mouse polyclonal anti-r-Domain B antibodies immobilized on Protein A-Sepharose immunoprecipitated approximately 91% of the ATPase and 67% of the ADPase activities from the *S. mansoni* adult worm, and 42% of the ATPase and 46% of the



**Fig. 4.** Identification of active ATP diphosphohydrolase isoforms from *S. mansoni* adult worm and *L. (V.) braziliensis* promastigote by immunoprecipitation assays. Immunoprecipitated Protein A-mouse antibody-antigen complex isolated from adult worm (lane B) or promastigote (lane D) preparation by mouse anti-r-Domain B antibody was submitted to electrophoresis in 10% SDS-PAGE, electroblotted onto nitrocellulose membrane, and the Western blots were developed with rabbit polyclonal serum against potato apyrase (dil. 1:1000). An aliquot (100  $\mu$ g of protein) of *S. mansoni* adult worm (lane A) or *L. (V.) braziliensis* promastigote (lane C) preparation electrophoresed and electroblotted under same conditions were developed with mouse polyclonal serum against r-Domain B (dil. 1:800). The membranes were revealed by chemiluminescence.

ADPase activities from the *L. braziliensis* promastigote preparations (Table 1).

The immunoprecipitated resin-mouse antibody-antigen complexes were washed and subjected to electrophoresis and Western blots. As observed in Fig. 4, the mouse polyclonal antibodies against r-Domain B immobilized on Protein A-Sepharose immunoprecipitated a band of approximately 63 kDa and, in lower amount, band of 55 kDa from the *S. mansoni* adult worm (lane B), and bands of approximately 48 and 43 kDa from the *L. (V.) braziliensis* promastigote preparation (lane D), which were recognized by the rabbit polyclonal anti-potato apyrase antibodies (Fig. 4). In Western blots of either *S. mansoni* adult worm or *L. (V.) braziliensis* promastigote preparation mouse polyclonal anti-r-Domain B antibodies recognized the same bands of approximately 63 and 55 kDa (lane A) or 48 and 43 kDa (lane C), respectively (Fig. 4). No reaction was observed with pre-immune serum (data not shown).

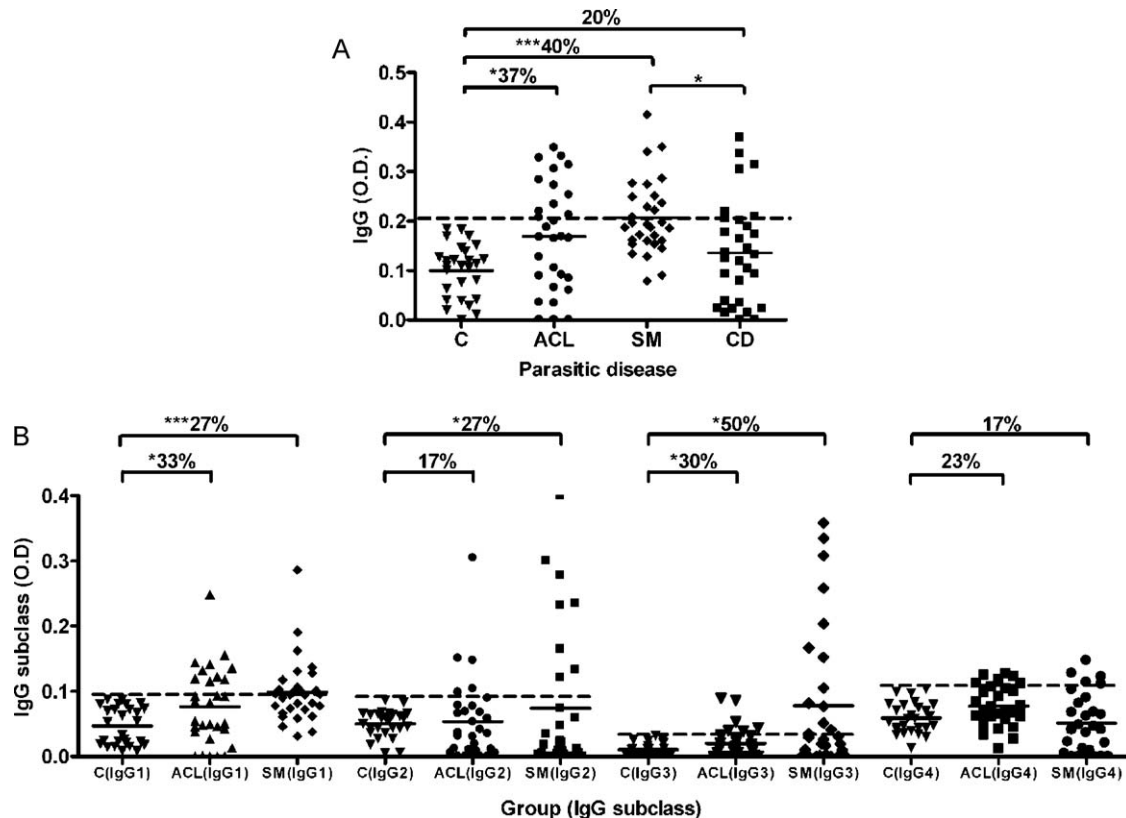
#### 3.6. Cross-immunoreactivity between human serum and r-Domain B

Using r-Domain B as coating antigen in ELISA, significantly higher IgG antibody reactivity was found in sera from individuals with schistosomiasis (SM;  $0.207 \pm 0.075$ ; 40% seropositivity, 12/30;

**Table 1**  
ATP diphosphohydrolase activity inhibition and depletion of this activity from the C<sub>12</sub>E<sub>9</sub>-homogenized parasite preparations by mouse polyclonal anti-Domain B.

Experimental conditions	<i>S. mansoni</i> adult worm		<i>L. braziliensis</i> promastigotes	
	ATPase activity	ADPase activity	ATPase activity	ADPase activity
Before Sepharose-Protein A				
Pre-immune serum	27.29	30.59	29.81	6.35
Immune serum	16.87 (62)	12.84 (42)	23.22 (78)	1.75 (28)
After Sepharose-Protein A				
Pre-immune serum	16.39	15.98	18.68	6.64
Immune serum	1.42 (9)	5.29 (33)	10.74 (58)	3.56 (54)

The phosphohydrolytic activity, expressed in nmol Pi mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, was measured in aliquots of detergent-solubilized preparations pre-incubated 3 h with pre-immune serum or immune serum anti-Domain B diluted 1:400, and after addition of Sepharose-Protein A. The results in parenthesis represent the percentage of hydrolytic activity when compared to the pre-immune serum.



**Fig. 5.** IgG antibody reactivity of patients with American cutaneous leishmaniasis (ACL), schistosomiasis mansoni (SM) or Chagas disease (CD) against r-Domain B. The reactivity of total IgG (A) or IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 antibody subclasses (B) was quantified in serum diluted 1:100 from healthy individuals (C;  $n = 27$ ), and patients with ACL ( $n = 30$ ), schistosomiasis (SM;  $n = 30$ ) or Chagas disease (CD;  $n = 30$ ) using r-Domain B as the coating antigen in ELISA. The result is expressed as optical density of serum samples. The horizontal line and dotted line represent the mean and cut-off, respectively. Values greater than this cut-off level were considered to be seropositive. Asterisks mean \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

$P < 0.001$ ) followed by antibodies from patients with American cutaneous leishmaniasis (ACL;  $0.168 \pm 0.108$ ; 37% seropositivity, 11/30;  $P < 0.05$ ), when compared to the control (Fig. 5A;  $n = 27$ ;  $0.099 \pm 0.054$ ; cut-off 0.207). Sera from patients with Chagas disease had low IgG antibody reactivity against r-Domain B (CD;  $0.135 \pm 0.104$ ), similar to the control and significantly ( $P < 0.05$ ) lower than that found in schistosomiasis patients (Fig. 5A). Only 6 (20%) of the 30 patients with Chagas disease had seropositivity for r-Domain B from the potato apyrase.

The IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 subclass reactivities were also tested (Fig. 5B). The IgG1 ( $0.077 \pm 0.059$ ) or IgG3 ( $0.020 \pm 0.024$ ) antibody reactivity of ACL patients was significantly ( $P < 0.05$ ) higher when compared to the control (IgG1,  $0.047 \pm 0.029$ , cut-off, 0.105; IgG3,  $0.010 \pm 0.009$ , cut-off, 0.029), and 9–10 (30–33%) of the 30 patients were seropositive for r-Domain B (Fig. 5B). The IgG2 ( $0.054 \pm 0.064$ ; 17% seropositivity, 5/30) or IgG4 ( $0.077 \pm 0.031$ ;

23% seropositivity, 7/30) antibody reactivity of ACL patients was similar to the control (IgG2,  $0.050 \pm 0.021$ , cut-off, 0.092; IgG4,  $0.059 \pm 0.023$ , cut-off, 0.105), and close to the background levels for most of them (Fig. 5B). For patients with schistosomiasis, the IgG1 ( $0.100 \pm 0.049$ ;  $P < 0.001$ ), IgG2 ( $0.074 \pm 0.110$ ;  $P < 0.05$ ) or IgG3 ( $0.078 \pm 0.109$ ;  $P < 0.05$ ) antibody reactivity was variable and significantly higher than the control, with 27% (8/30), 27% (8/30) and 50% (15/30) of seropositivity for r-Domain B, respectively (Fig. 5B). The IgG4 seropositivity ( $0.059 \pm 0.045$ ; 17% seropositivity, 5/30) was lower and close to the background level (Fig. 5B).

#### 4. Discussion

In this work we demonstrated the occurrence of a conserved domain, which did not include the characteristic conserved domains (ACRs) of the ATP diphosphohydrolase family, as a

functional region in ATP diphosphohydrolase isoforms of *S. mansoni* and *L. (V.) braziliensis*, and the associated antigenicity of this domain in schistosomiasis and leishmaniasis. The r-Domain B which spans the conserved domain r78–117 within potato apyrase presents immunostimulatory property activating humoral immune responses in healthy BALB/c mice, increasing IgG2a and IgG1 subtypes production. Given that IgG subtypes represent markers for the Th1/Th2 dichotomous immune response associated to the disease resistance and/or immunomodulation in experimental model (Hoffmann et al., 1999; Mountford et al., 1994) our results suggested that r-Domain B has distinct epitopes capable of inducing Th1- and Th2-type cytokine secretion profiles. The ATPase and ADPase activity of detergent-solubilized *S. mansoni* or *L. (V.) braziliensis* preparation were partially inhibited by mouse polyclonal anti-r-Domain B antibodies, suggesting its potential application for the study of the structure and function of the SmATPDase 2 and NDPase, and also of other ATP diphosphohydrolase isoforms of distinct organisms. In addition, antibodies produced against specific epitopes within Domain B could be tested in experimental protocols of disease control like recently demonstrated for human NTPDase 3 and *T. gondii* NTPase 2 (Munkonda et al., 2009; Tan et al., 2010).

IgG antibody of patients with American cutaneous leishmaniasis (37% seropositivity) or schistosomiasis (40% seropositivity) exhibited significant cross-immunoreactivity with r-Domain B. These results suggested strongly that for the human immune system the conserved domain B within either *S. mansoni* SmATPDase 2 (r156–195) or *L. braziliensis* NDPase (r83–122), of high identity with domain B from the potato apyrase (Fig. 1), is rich in B-cell epitopes. Higher IgG seropositivity for potato apyrase was found in serum samples from the patients with leishmaniasis (Rezende-Soares et al., 2010; 90%; 19/20) or schistosomiasis (Faria-Pinto et al., 2010a; 61%, 30/49). On the other hand, in Chagas disease low seropositivity was observed against either r-Domain B (20%) or potato apyrase (Faria-Pinto et al., 2008; 17%, 5/30), corroborating the lower identity found between domains B from vegetable and parasite proteins (Fig. 1). These results suggest existence of other, as yet unidentified, antigenic domains shared between potato apyrase and parasite proteins, as previously predicted (Faria-Pinto et al., 2008). The results obtained from the analyses of IgG subclasses suggest distinct epitopes for IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 within domain B from the *S. mansoni* SmATPDase 2 and *L. braziliensis* NDPase, shared with Domain B from the potato apyrase, which could be linear or conformational. The variable IgG1 (27% seropositivity), IgG2 (27%) and IgG3 (50%) antibody reactivity of schistosomiasis patients, up to 12-fold greater than the threshold, possibly reflects different parasite load and/or host genetic factors. Significant IgG1 and IgG3 seropositivity (30–33%) was also found for ACL patients, whereas IgG4 seropositivity was lower (17–23%) in both ACL and schistosomiasis patients. In previous work was demonstrated that high levels of IgG1 and IgG3, antibody subclasses associated with Th1 like cellular immune response, against specific antigens were correlated with parasite elimination. On the other hand, high IgG4 level, associated with Th2 immune response, was correlated with low developmental of immunity to parasite infection (Souza et al., 2005; Kusel et al., 2007; Faria-Pinto et al., 2010a). We hypothesized that different antigenic epitopes of the Domain B of parasite proteins could be involved in susceptibility or resistance to *S. mansoni* and *L. braziliensis* infections. These observations reinforce the importance of our immunological results.

Under our experimental conditions, mouse polyclonal anti-r-Domain B antibodies immobilized on Protein A-Sepharose immunoprecipitated approximately 42–91% of the ATP diphosphohydrolase activities from the *S. mansoni* and *L. (V.) braziliensis* preparations. In addition, Western blots of the immunoprecipitated resin-mouse antibody-antigen complexes, using rabbit polyclonal

anti-potato apyrase antibodies, identified the same bands previously reported for either *S. mansoni* SmATPDase 2 or *L. braziliensis* ATP diphosphohydrolase (Levano-Garcia et al., 2007; Rezende-Soares et al., 2010). The SmATPDase 2 protein from the *S. mansoni* adult worm has predicted molecular weight 63,785. Antibody against this protein revealed a reactive band of 55 kDa in the supernatant of adult worm *in vitro* cultures, and the authors suggested that this protein could be secreted from the tegument to the exterior environment through a non-classical secretory pathway since signal peptide was not detected (Levano-Garcia et al., 2007). Recent results obtained in our laboratory showed that mouse polyclonal antibodies against a specific peptide (20 amino acids) belonging to the domain B from the *S. mansoni* SmATPDase, a region of lower identity with either SmATPDase 1 or putative GDPase counterpart, recognized the same bands of 63 and 55 kDa in *S. mansoni* adult worm preparation (unpublished data). In *L. (V.) braziliensis* promastigotes, an ATP diphosphohydrolase isoform was identified by rabbit and mouse polyclonal anti-potato apyrase antibodies as a polypeptide of 48 kDa, and the band of 43 kDa was suggested to be the result of proteolysis of the 48 kDa band (Rezende-Soares et al., 2010). The *L. braziliensis* NDPase has predicted molecular weight 47,689. Mouse polyclonal antibodies against a specific peptide (20 amino acids) belonging to the domain B from the *L. braziliensis* NDPase, a region of lower identity with its putative *L. braziliensis* GDPase counterpart, recognized the same bands of 48 and 43 kDa in *L. braziliensis* promastigote preparation (unpublished data). In addition, using Secretome 2.0 prediction algorithm (Bendtsen et al., 2004), the score >0.5 suggested that *L. braziliensis* NDPase could be secreted, and the program alerts the possible presence of a signal peptide in this protein. Search for a signal peptide using TargetP 1.1 Server (Emanuelsson et al., 2007) detected a cleavage site with score 0.678 at glycine 32, which could generate a processed protein with a molecular mass of 44 kDa. Signal P 3.0 prediction (Emanuelsson et al., 2007) was inconclusive about a cleavage site, but appointed the glycine 32 as the most likely one. Taken together these data suggested that mouse polyclonal anti-r-Domain B antibodies are reactive with both native and proteolyzed forms of the protein, and that plant and parasite proteins share the same conserved domain, focal point of this work. In addition, the results suggested that the amino terminus regions from the parasite proteins are subject to a proteolytic posttranslational processing that results in a protein of lower molecular mass. General mechanisms of secretion have been now explored in several eukaryotic pathogens (Silverman et al., 2010). The results shown here encourage new biochemical studies, and our hypotheses are currently under investigation.

We decided to further investigate the degree of identity between the domains B from the potato apyrase and other members of the ATP diphosphohydrolase family recently deposited in GenBank database. It is interesting to observe that a putative apyrase found in the genome of *Ostreococcus tauri*, a primitive green alga that is close to the evolutionary origin of photosynthetic plants (Derelle et al., 2006), has a domain B of high identity with potato apyrase (Fig. 1). It is also relevant the high identity and similarity evidenced between the domain B from the potato apyrase and its counterpart within potato apyrase like-protein from the pathogenic fungi *C. neoformans*, *A. dermatitidis*, *P. braziliensis* and *M. canis*, which cause cryptococcosis, blastomycosis, paracoccidioidomycosis and zoonotic dermatophytosis, respectively. Similar results were observed within proteins of the hematophagous arthropods *G. m. morsitans*, *A. gambiae*, *A. aegypti* and *S. cheopis* (Fig. 1), vectors of pathogens that cause sleeping sickness, malaria, yellow fever and typhus, respectively. Pathogenic organisms belonging to the several distinct phylogenetic lineages and their hosts have co-evolved over thousands of years, the former evading and manipulating the host's immune response (Burnstock and Verkhatsky, 2009; Dunne

and Cooke, 2005; Requena et al., 2000). There is evidence that divergent eukaryotes might share common metabolic pathways, and mechanisms of defense and pathogenicity (Haldar et al., 2006; Hannaert et al., 2003; Zhang and Kato, 2003). It is possible that this specific antigenic domain from the ATP diphosphohydrolase isoforms shown here, and other predicted in previous work (Faria-Pinto et al., 2008), were conserved between the different organism species throughout evolution, and may be related to the success of the parasitism, through host molecular mimicry and/or disease immunomodulation. We believed that comparative studies among them will facilitate the understanding of the host–pathogens relationship and the evolutionary history of these less well investigated proteins.

## Acknowledgements

This work was supported in part by grants from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; processes CBB-APQ-01384-09 and CBB-APQ 00754-09) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Detoni ML, Porcino GN, Gusmão MAN, Soares TV were recipients of Master Degree fellowships from the UFJF/MG, FAPEMIG and CAPES/REUNI.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.dci.2011.03.026.

## References

- 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*. J. Clin. Microbiol. 30, 1291–1293.
- Bendtsen, J.D., Jensen, L.J., Blom, N., von Heijne, F., Brunak, S., 2004. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. Protein Eng. Des. Sel. 17, 349–356.
- Bermudes, D., Peck, K.R., Affi, M.A., Beckers, C.J.M., Joiner, K.A., 1994. Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. J. Biol. Chem. 269, 29252–29260.
- Borges, F.P., de Brum Vieira, P., Wiltuschnig, R.C., Tasca, T., De Carli, G.A., Bonan, C.D., 2008. Characterization of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity in *Trichomonas gallinae* and the influence of penicillin and streptomycin in extracellular nucleotide hydrolysis. FEMS Microbiol. Lett. 283, 189–195.
- Burnstock, G., Verkhatsky, A., 2009. Evolutionary origins of the purinergic signaling system. Acta Physiol. 195, 415–447.
- Coimbra, E.S., Gonçalves-Da-Costa, S.C., Corte-Real, S., Freitas, F.G.R., Durão, A., Souza, C.S.F., Silva Santos, M.I., Vasconcelos, E.G., 2002. Characterization and cytochemical localization of an ATP diphosphohydrolase from *Leishmania amazonensis* promastigote. Parasitology 124, 137–143.
- Coimbra, E.S., Gonçalves-Da-Costa, S.C., Costa, B.L.S., Giarola, N.L.L., Rezende-Soares, F.A., Fessel, M.R., Ferreira, A.P., Souza, C.S.F., 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, 327–335.
- Day, R.B., McAlvin, C.B., Loh, J.T., Denny, R.L., Wood, T.C., Young, N.D., Stacey, G., 2000. Differential expression of two soybean apyrases, one of which is an early nodulin. Mol. Plant Microbe Interact. 13, 1053–1070.
- Derelle, E., Ferraz, C., Rombauts, S., Rouzé, P., Worden, A.Z., Robbins, S., Partensky, F., Degroeve, S., Echeynié, S., Cooke, R., Saeys, Y., Wuyts, J., Jabbari, K., Bowler, C., Panaud, O., Piégu, B., Ball, S.G., Ral, J.P., Bouget, F.Y., Piganeau, G., De Baets, G., Picard, A., Delseny, M., Demaille, J., Van De Peer, Y., Moreau, H., 2006. Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 1647–1652.
- Dunne, D.W., Cooke, A., 2005. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. Nat. Rev. Immunol. 5, 420–426.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. Nat. Protoc. 2, 953–971.
- Faria-Pinto, P., Meirelles, M.N.L., Lenzi, H.L., Mota, E.M., Penido, M.L.O., Coelho, P.M.Z., Vasconcelos, E.G., 2004. ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni* egg: characterization of a new antigen. Parasitology 129, 51–57.
- Faria-Pinto, P., Meirelles, M.N.L., Lenzi, H.L., Mota, E.M., Penido, M.L.O., Coelho, P.M.Z., Vasconcelos, E.G., 2006. Cross-immunoreactivity between anti-potato apyrase antibodies and mammalian ATP diphosphohydrolases: potential use of the vegetal protein in experimental schistosomiasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 101, 359–363.
- 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., 2010a. Detection of IgG1 and IgG4 subtypes reactive against potato apyrase in schistosomiasis patients. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 105, 370–373.
- 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., 2010b. Antibody reactivity against potato apyrase, a protein that shares epitopes with *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase isoforms, in acute and chronically infected mice, after chemotherapy and reinfection. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 105, 374–379.
- Faria-Pinto, P., Rezende-Soares, F.A., Molica, A.M., Montesano, M.A., Marques, M.J., Rocha, M.O.C., Gomes, J.A.S., Enk, M.J., Correa-Oliveira, R., Coelho, P.M.Z., Neto, S.M., Franco, O.L., Vasconcelos, E.G., 2008. Mapping of the conserved antigenic domains shared between potato apyrase and parasites ATP diphosphohydrolases: potential application in human parasitic diseases. Parasitology 135, 943–953.
- 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*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 316, 454–460.
- 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. Curr. Drug Targets 3, 229–245.
- Guevara-Flores, A., Olvera-Sánchez, S., Gómez-Concha, C., Juárez, O., Esparza-Perusquia, 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 cysticercis*. Mol. Biochem. Parasitol. 162, 123–133.
- Haldar, K., Kamoun, S., Hiller, N.L., Bhattacharje, S., van Ooij, C., 2006. Common infection strategies of pathogenic eukaryotes. Nat. Rev. Microbiol. 4, 922–931.
- Handa, M., Guidotti, G., 1996. Purification and cloning of soluble ATP diphosphohydrolase (apyrase) from potato tuber (*Solanum tuberosum*). Biochem. Biophys. Res. Commun. 218, 916–923.
- Hannaert, V., Saavedra, E., Duffieux, F., Szikora, J.P., Rigden, D.J., Michels, P.A., Opperdoes, F.R., 2003. Plant-like traits associated with metabolism of *Trypanosoma* parasites. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100, 1067–1071.
- Hoffmann, K.F., James, S.L., Cheever, A.W., Wynn, T.A., 1999. Studies with double cytokine-deficient mice reveal that highly polarized Th1- and Th2-type cytokine and antibody responses contribute equally to vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni*. J. Immunol. 163, 927–938.
- Johnson, M.S., Broady, K.W., Johnson, A.M., 1999. Differential recognition of *Toxoplasma gondii* recombinant nucleoside triphosphate hydrolase isoforms by naturally infected human sera. Int. J. Parasitol. 29, 1893–1905.
- Kettlun, A.M., Espinosa, V., Garcia, L., Valenzuela, M.A., 2005. Potato tuber isoapyrases: substrate specificity, affinity labeling, and proteolytic susceptibility. Phytochemistry 66, 975–982.
- Kusel, J.R., Al-Adham, B.H., Doenhoff, M.J., 2007. The schistosome in the mammalian host: understanding the mechanisms of adaptation. Parasitology 134, 1477–1526.
- Levano-Garcia, J., Mortara, R.A., Verjovski-Almeida, S., DeMarco, R., 2007. Characterization of *Schistosoma mansoni* ATPDase2 gene, a novel apyrase family member. Biochem. Biophys. Res. Commun. 352, 384–389.
- Mountford, A.P., Fisher, A., Wilson, R.A., 1994. The profile of IgG1 and IgG2a antibody responses in mice exposed to *Schistosoma mansoni*. Parasite Immunol. 16, 521–527.
- Munkonda, M.N., Pelletier, J., Ivanenkov, V.V., Fausther, M., Tremblay, A., Kunzli, B., Kirley, T.L., Sévigny, 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 J. 276, 479–496.
- Notredame, C., Higgins, D.G., Heringa, J., 2000. A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. J. Mol. Biol. 302, 205–217.
- Penido, M.L., Resende, D.M., Vianello, M.A., Bordin, F.H.S., Jacinto, A.A., Dias, W.D., Montesano, M.A., Nelson, D.L., Coelho, P.M.Z., Vasconcelos, E.G., 2007. A new series of schistosomicide drugs, the alkylaminoalkanethiosulfuric acids, partially inhibit the activity of *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. Eur. J. Pharmacol. 570, 10–17.
- Requena, J.M., Alonso, C., Soto, M., 2000. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. Parasitol. Today 16, 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, 773–783.
- Robson, S.C., Sevigny, J., Zimmermann, H., 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. Purinergic Signal. 2, 409–430.
- Sansom, F.M., Riedmaier, P., Newton, H.J., Dunstone, M.A., Muller, C.E., Stephan, H., Byres, E., Beddoe, T., Rossjohn, J., Cowan, P.J., d'Apice, A.J., Robson, S.C., Hartland,

- E.L., 2008a. Enzymatic properties of an ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase from *Legionella pneumophila*: substrate specificity and requirement for virulence. *J. Biol. Chem.* 283, 12909–12918.
- Sansom, F.M., Robson, S.C., Hartland, E.L., 2008b. Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase on host-pathogen interactions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 765–781.
- Silverman, J.M., Clos, J., Oliveira, C.C., Shirvani, O., Fang, Y., Wang, C., Foster, L.J., Reiner, N.E., 2010. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J. Cell Sci.* 123, 842–852.
- Souza, M.A., Silva, A.G., Afonso-Cardoso, S.R., Favoreto Jr., S., Ferreira, M.S., 2005. Immunoglobulin isotype and IgG subclass profiles in american tegumentary leishmaniasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38, 137–141.
- Tan, F., Xin, H., Pan, C.-W., Ding, J.-Q., Chen, X.-G., 2010. Monoclonal antibodies against nucleoside triphosphate hydrolase-II can reduce the replication of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Int.* 59, 141–146.
- Tasca, T., Bonan, C.D., De Carli, G.A., Sarkis, J.J.F., 2004. *Trichomonas vaginalis*: cytochemical localization of a NTPDase 1 and an ecto-5'-nucleotidase and effects of adenine nucleotides on cellular viability. *Parasitol. Res.* 93, 300–303.
- Vasconcelos, E.G., Faria-Pinto, P., Rezende-Soares, F.A., Penido, M.L., Gonçalves-da-Costa, S.C., Coelho, P.M.Z., 2009. Potato Apyrase: a new tool for parasitic disease research. In: Tennant, P., Benkeblia, N. (Eds.), *Potato II. Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, vol. 3. Global Science Books, Ltd., Ikenobe, Japan, pp. 80–88 (special issue 1).
- Vasconcelos, E.G., Ferreira, S.T., Carvalho, T.M.U., 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. *J. Biol. Chem.* 271, 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*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58, 205–214.
- Zhang, H., Kato, Y., 2003. Common structural properties specifically found in the CS $\alpha$  $\beta$ -type antimicrobial peptides in nematodes and mollusks: evidence for the same evolutionary origin? *Dev. Comp. Immunol.* 27, 499–503.



Anexo D – DETONI *et al.*, 2013

Parasitol Res (2013) 112:2773–2782  
DOI 10.1007/s00436-013-3445-9

ORIGINAL PAPER

**An antigenic domain of the *Leishmania amazonensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is associated with disease progression in susceptible infected mice**

**M. L. Detoni** · M. R. Fessel · A. C. R. G. Maia · G. N. Porcino · L. R. Quellis · P. Faria-Pinto · M. J. Marques · M. A. Juliano · L. Juliano · V. A. Diniz · S. Côrte-Real · S. C. Gonçalves-da-Costa · C. S. F. Souza · F. G. Vasconcelos

# An antigenic domain of the *Leishmania amazonensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is associated with disease progression in susceptible infected mice

M. L. Detoni · M. R. Fessel · A. C. R. G. Maia · G. N. Porcino · L. R. Quellis · P. Faria-Pinto · M. J. Marques · M. A. Juliano · L. Juliano · V. A. Diniz · S. Côrte-Real · S. C. Gonçalves-da-Costa · C. S. F. Souza · E. G. Vasconcelos

Received: 1 October 2012 / Accepted: 28 April 2013 / Published online: 17 May 2013  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

**Abstract** An antigenic conserved B domain was previously identified within nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) of plants and parasites. Now, the r-potDomain B, a 6× His-tag polypeptide belonging to the conserved B domain from the potato apyrase, and synthetic peptides LbB1LJ and LbB2LJ derived from the B domain from *Leishmania* NTPDase 1 were used as molecular tools for studies of the *Leishmania amazonensis* NTPDase 1. Widespread subcellular location of the specific NTPDase 1 was detected by Western

blots of promastigote fractions and ultrastructural immunocytochemical microscopy using immune sera raised against these biomolecules. In addition, the *L. amazonensis*-infected BALB/c mice were evaluated at 12 to 120 days after infection, which progresses showing typical nodular lesion. High antibody reactivity with either r-potDomain B, LbB1LJ, or LbB2LJ was found in *L. amazonensis*-infected BALB/c mice indicating the antigenicity of the B domain from NTPDase 1 isoform. The IgG1 antibody reactivity significantly increased at 90–120 days postinfection, 18- to 24-fold when compared to the 12th day, and remained elevated even at 120th after infection, coinciding with the most active stage of the disease. In contrast, significantly higher IgG2a antibody reactivity with each biomolecule was observed at 40th day, about two- to fourfold higher than those found at 12th or 20th day, and decreased along 120-day period. Apparently, the conserved B domain is capable to induce IgG2a production in early disease stages. All together, these results suggest that r-potDomain B or synthetic peptides could be molecular starting points in experimental protocols of immunotherapy and/or vaccination for leishmaniasis.

M. L. Detoni · M. R. Fessel · A. C. R. G. Maia · G. N. Porcino · L. R. Quellis · P. Faria-Pinto · E. G. Vasconcelos (✉)  
Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer  
s/n, Campus Universitário,  
Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil CEP 36036-900  
e-mail: eveline.vasconcelos@ufjf.edu.br

M. J. Marques  
Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências  
Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas  
Gerais, Brazil

M. A. Juliano · L. Juliano  
Departamento de Biofísica, Escola Paulista de Medicina,  
Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

V. A. Diniz · S. Côrte-Real  
Laboratório de Biologia Estrutural, Instituto Oswaldo Cruz,  
FIOCRUZ,  
Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

S. C. Gonçalves-da-Costa · C. S. F. Souza  
Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia, Instituto  
Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

## Introduction

A broad spectrum of manifestations to *Leishmania amazonensis* infection has been observed in humans that includes cutaneous, mucocutaneous, diffuse, and visceral clinical forms (Almeida et al. 1996; Souza et al. 2011). The roles of immune response in visceralization and metastases development in the outcome of *Leishmania* infections in distinct mice

strains have been extensively studied (Cupolilo et al. 2003; Abreu-Silva et al. 2004; Pereira and Alves 2008; Cardoso et al. 2010; Chu et al. 2010). Several proteins of immunological relevance, including members of conserved protein families, have been tested in immunization protocols demonstrating some protective ability against leishmaniasis (Requena et al. 2000, 2004; Zaverucha do Valle et al. 2007; Iborra et al. 2008; Ramirez et al. 2010).

The nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase; EC 3.6.1.5), ubiquitously distributed in distinct organisms, is also named apyrase in plants and ATP diphosphohydrolase (ATPDase) or nucleoside triphosphate hydrolase (NTPase) in parasites. These proteins share five apyrase-conserved regions (ACR1 to ACR5) that are involved in its catalytic cycle and hydrolyze di- and triphosphate nucleosides to the corresponding nucleoside monophosphates upon bivalent metal ion activation (Knowles 2011). They regulate nucleotide/nucleoside rates in several physiological processes, such as purinergic signaling systems, and are involved with infectivity and/or purine recuperation by parasites (Burnstock and Verkhatsky 2009; Knowles 2011). NTPDase isoforms are antigenic in toxoplasmosis (Asai et al. 1992; Kikuchi et al. 2001, 2002; Tan et al. 2010, 2011), schistosomiasis (Faria-Pinto et al. 2004, 2008, 2010a, b) and American cutaneous (Faria-Pinto et al. 2008; Rezende-Soares et al. 2010) or visceral leishmaniasis (Maia et al. 2013). Recently, immunization with a recombinant form of *Toxoplasma gondii* NTPase induced partial protection of BALB/c mice against virulent *T. gondii* strains (Tan et al. 2011).

An active and antigenic NTPDase isoform was isolated from the plasma membrane fraction of *L. amazonensis* promastigotes (Coimbra et al. 2002; 2008). Immunoprecipitation assays using immune serum anti-potato apyrase and cross-immunoreactivity between potato apyrase and sera from either promastigote- or amastigote-infected BALB/c mice suggested the existence of antigenic domains within *L. amazonensis* NTPDase, these epitopes being shared with those from vegetable protein (Coimbra et al. 2008). An antigenic domain (named B domain), which is shared between plants apyrase and NTPDase isoforms of pathogenic organisms from distinct phylogenetic lineages, was recently identified (Faria-Pinto et al. 2008; Rezende-Soares et al. 2010; Vasconcelos et al. 2009; Mendes et al. 2011; Porcino et al. 2012; Maia et al. 2011, 2013).

In this work, a recombinant polypeptide belonging to the conserved B domain (r-potDomain B) from the potato apyrase and synthetic peptides LbB1LJ and LbB2LJ derivatives from the B domain from *Leishmania* NTPDase 1 and mouse immune serum against these biomolecules were used as molecular tools for studies of the specific *L. amazonensis* NTPDase 1 isoform. Immunolocalization of promastigotes NTPDase 1 was obtained by Western blots of subcellular

fractions and ultrastructural immunocytochemical microscopy. The immunological potentials of the r-potDomain B and synthetic peptides were evaluated by the antibody reactivity of *L. amazonensis*-infected BALB/c mice during the disease progression.

## Materials and methods

### Preparation of r-potDomain B, synthetic peptides, and polyclonal antibodies

The recombinant r-potDomain B (5,493 Da) belonging to the conserved potato apyrase domain-B (r78-117) (NCBI accession number U58597.1) was expressed as a six-histidine-tagged polypeptide. The mouse polyclonal anti-r-potDomain B antibodies were obtained as earlier described (Maia et al. 2011). The synthetic peptides LbB1LJ (r82-103) and LbB2LJ (r102-121) also derived from the conserved domain-B from *Leishmania braziliensis* NTPDase 1 (ATPDase; XP\_001562178.1) were obtained by solid-phase synthesis (Korkmaz et al. 2008). The molecular mass and purity of synthesized peptides were confirmed by amino acid analysis and by MALDI-TOF using a Microflex LT mass spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Immune sera anti-LbB1LJ and anti-LbB2LJ were obtained as earlier described (Porcino et al. 2012).

### Parasites and preparation of promastigote antigens

The *L. amazonensis* H21 MHOM/BR/76/MA strain, isolated from a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis, has been maintained in vivo by serial passages in BALB/c mice. Promastigotes ( $10^6$  parasites/ml) from *L. amazonensis* were harvested at the logarithmic growth phase (Zaverucha do Valle et al. 2007) and washed three times in sterile 5 mM Tris-HCl, pH 7.4, at 4 °C. Parasites were resuspended in 5 mM Tris-HCl, pH 7.4, 8 % sucrose plus protease inhibitors. Membrane disruption and antigen release were obtained by 3 cycles of freezing and thawing and 1 cycle of ultrasonication. An aliquot of this preparation (TH) was stored at -80 °C until use. Promastigotes fractions were obtained as previously described (Zaverucha do Valle et al. 2007). Briefly, promastigotes homogenate, obtained by disruption in the presence of the nonionic detergent Lubrol PX, was centrifuged twice at  $10,000\times g$  for 10 min, and the pellets were purified in a linear sucrose gradient and stored as flagellar fraction (FF), composed of axonemal structure with associated paraflagellar rod, and absence of flagellar membrane. The supernatant was centrifuged again at  $27,000\times g$  for 30 min to obtain pellets of membrane fraction (MF), which did not form vesicles and appeared associated with subpellicular microtubules. Finally, aliquots of the

supernatant were layered on top of 10 mM Tris–HCl, pH 7.4, 20 % sucrose plus 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 25 mM KCl in plastic tubes. The material was centrifuged at 100,000×g for 30 min in a swing out rotor on a Beckman ultracentrifuge, and the microsomal fraction (Fm) was recovered from the pellet, a ribosomal enriched fraction containing minor membrane components (Zaverucha do Valle et al. 2007). All fractions were suspended in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, plus protease inhibitors and stored at –80 °C until use.

#### Western blots

Aliquots (100 µg of protein) of the total preparation (TH) or fractions (FF, MF, and Fm) of promastigotes were submitted to electrophoresis in 10 % sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), electroblotted onto nitrocellulose membranes, and developed with mouse immune serum anti-r-potDomain B (diluted 1:400), anti-LbB1LJ (diluted 1:200), or anti-LbB2LJ (diluted 1:200) using standard procedures (Coimbra et al. 2008). Signals were revealed by chemiluminescence using an anti-mouse IgG antibody coupled to horseradish peroxidase and luminol as substrate (ECL Western Blotting System; GE Healthcare, Brazil) and exposed to X-ray film following the manufacturer's instructions.

#### Electron microscopy

Localization of *L. amazonensis* NTPDase 1 was performed by ultrastructural immunocytochemistry as early described (Porcino et al. 2012). Briefly, the *L. amazonensis* promastigotes were fixed, dehydrated, embedded in Lowicryl K4M resin (Polysciences, Inc., PA, USA), and maintained at –20 °C. Ultrathin sections were incubated in the presence of immune serum either anti-r-potDomain B (diluted 1:200), anti-LbB1LJ or anti-LbB2LJ (diluted 1:100), and control serum diluted 1:100 or 1:200. Signals were revealed using goat anti-mouse antibody conjugated with 10-nm gold particles (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluted 1:20, and uranyl acetate stain, and observed in a JEOL 1011 transmission electron microscope from Rudolf Barth Electron Microscopy Platform of the Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

#### Animals and infection protocols

Female BALB/c mice aged 6–8 weeks were obtained from the animal facilities of the FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. Separated groups of mice were subcutaneously infected by injecting 10<sup>6</sup> *L. amazonensis* promastigotes in a volume of 50 µl through the plantar surface with a 30-gauge needle.

Control groups were subcutaneously injected with 50 µl of PBS in the same location. The kinetic of footpad swelling in promastigotes-infected mice was evaluated by measurement at 20, 40, 60, 90, and 120 days after infection, using a dial gauge caliper (Schnelltaster, HC Kroplin, GRBH, Hessen, Germany), as previously described (Abreu-Silva et al. 2004). The size of the lesions was expressed as the difference in thickness between the footpads of mice in the experimental infected group compared to the normal control group. The results were expressed as arithmetic means of eight mice, and the standard error of the mean was calculated and statistically compared by the Tukey's multiple comparison test. The blood was sampled at 12, 20, 40, 60, 90, and 120 days postinfection. The sera were frozen at –80 °C until use. These experiments were conducted in accordance with the guidelines for experimental procedures of the Fundação Oswaldo Cruz (process no. L.0001/07).

#### Antibody analyses by enzyme-linked immunosorbent assays

Aliquot (5 µg/well) of r-potDomain B, LbB1LJ, or LbB2LJ in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6, was absorbed overnight onto flat-bottomed microtiter plates (Costar 3590; Corning Inc., Corning, NY, USA). Following a blocking step (0.15 M phosphate buffer solution, pH 7.2 plus 0.3 % Tween-20, and 2 % casein), sera diluted 1:100 from uninfected or experimentally infected mice were tested in duplicate, diluted in this blocking buffer without Tween-20, and incubated overnight at 4 °C. Antibodies bound to the antigen-plate were detected using horseradish peroxidase-conjugated, isotype-specific, anti-mouse IgG1 or anti-mouse IgG2a (Sigma Chemical Co., MO, USA), and *o*-phenylenediamine dihydrochloride/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as substrate. The subsequent color reaction was read at 492 nm on a microplate reader (Molecular Devices Corp., Menlo Park, CA, USA). The considered values of optical density (OD) were calculated by subtracting OD values obtained of a sera pool from control group, used as blank. The analyses were made in three different experiments with a variation of no more than 15 % between them. The data were analyzed using Kruskal–Wallis test (GraphPad Prism Software version 4; San Diego, CA, USA). *P* values <0.05 were considered significant.

## Results

#### In silico analysis

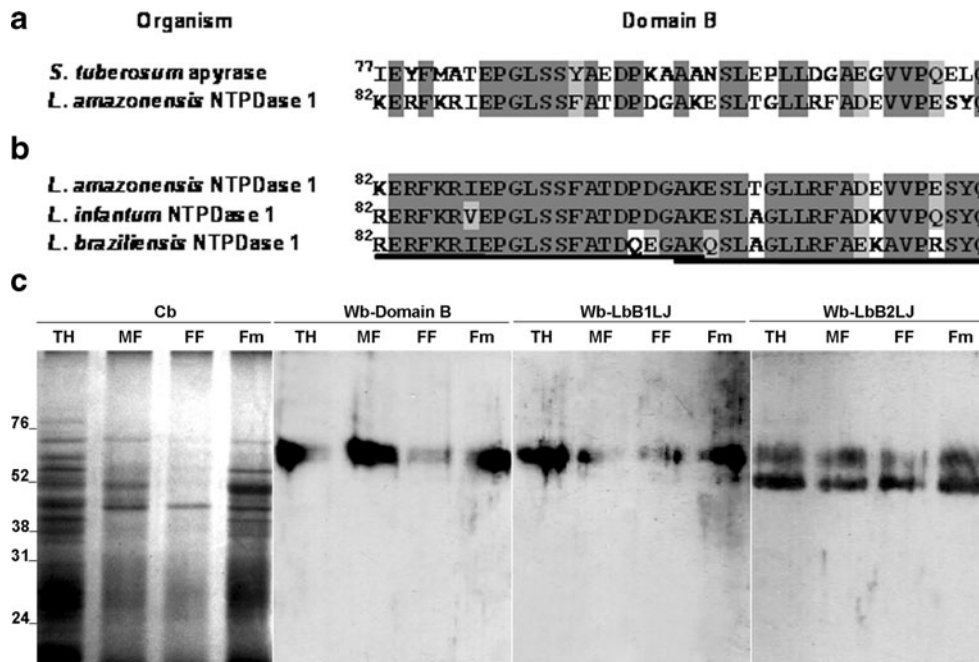
The amino acid sequence of the *L. amazonensis* NTPDase 1, recently annotated by us in NCBI database (accession number AFJ22627.1), was aligned with amino acid sequences of

potato apyrase (U58597.1) and NTPDase 1 isoforms found in the genome of *L. braziliensis* (XP\_001562178.1), *Leishmania infantum* (XP\_001464341.1), and *Leishmania major* (XP\_001681917.1). The amino acid residues of the domain-B from these proteins were identified and hand edited. As shown in Fig. 1, A, the amino acid sequence of the domain-B from the *L. amazonensis* NTPDase 1 has 53 % identity and 60 % similarity over 40 amino acids compared with its potato apyrase counterpart, suggesting existence of possible epitopes shared between them. The amino acid sequences of the NTPDase 1 domain-B from *L. amazonensis*, *L. infantum* (90 % identity and 98 % similarity over 40 amino acids), or *L. braziliensis* (80 % identity and 90 % similarity over 40 amino acids) have high identity (Fig. 1, B), indicating high conservation degree. These results confirmed the possible use of the r-potDomain B, a recombinant polypeptide belonging to the conserved B domain from the potato apyrase, and synthetic peptides LbB1LJ and LbB2LJ derived from the conserved domain-B from *L. braziliensis* NTPDase 1, and the antibodies raised against them, as molecular tools for studies of the specific *L. amazonensis* NTPDase 1 isoform. As indicated by dark lines (Fig. 1, B), the synthetic peptides LbB1LJ (r82-103; 86 % identity and 91 % similarity over 22 amino acids) and LbB2LJ (r102-121; 70 %

identity and 80 % similarity over 20 amino acids) span the conserved domain-B (r82-121) within *L. braziliensis* NTPDase 1 with overlapping of two amino acids at LbB1LJ C terminus and at LbB2LJ N terminus and share high identity with *L. amazonensis* NTPDase 1 counterparts (Fig. 1, B).

Identification of *L. amazonensis* NTPDase 1 by immune sera produced against the conserved B domain

The SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining showed numerous bands in total promastigote preparation (Cb, TH) and distinct and shared polypeptides in fractionated samples (Fig. 1, c; Cb: MF, FF, Fm). By Western blots, immune serum anti-r-potDomain B recognized the same diffuse bands of approximately 58–63 kDa in total promastigote preparation (TH) and membrane (MF), microsomal (Fm), and flagellar (FF) fractions, being the last one with lower intensity (Fig. 1, c; Wb-Domain B). The mouse immune sera anti-LbB1LJ (Wb-LbB1LJ) and anti-LbB2LJ (Wb-LbB2LJ) reacted with these same diffuse bands of 58–63 kDa in Western blot of TH, MF, FF, or Fm (Fig. 1, c), suggesting enrichment of the protein in microsomal fraction (Fm) as observed by greater anti-LbB1LJ antibody reactivity (Fig. 1, c; Wb-



**Fig. 1** Primary structure alignments of the B domain (a) from the potato apyrase and its *L. amazonensis* NTPDase 1 counterpart and (b) from *L. amazonensis* NTPDase 1 and either *L. braziliensis* or *L. infantum* NTPDase 1 counterpart. The identical and similar amino acid residues are shown as gray columns. The amino acid sequences from synthetic peptides LbB1LJ (r82-103) and LbB2LJ (r102-121) are indicated by dark lines. NCBI accession numbers of the amino acid sequences are *Solanum tuberosum* apyrase, P80595; *L. amazonensis*, AFJ22627.1; *L. infantum* XP\_001464341.1; and *L. braziliensis* XP\_001562178.1. (c)

Identification of the NTPDase 1 from *L. amazonensis* promastigote. Aliquots (100 micrograms of protein) of *L. amazonensis* promastigote preparation (TH) and membrane (MF), flagellar (FF), or microsomal (Fm) fractions were submitted to electrophoresis in 10 % SDS-PAGE, stained with Coomassie blue (Cb) or electroblotted onto nitrocellulose membrane, and the Western blots were developed with mouse polyclonal serum anti-r-potDomain B (Wb-Domain B; diluted 1:400), anti-LbB1LJ (Wb-LbB1LJ; diluted 1:200), or anti-LbB2LJ (Wb-LbB2LJ; diluted 1:200). The membranes were revealed by chemiluminescence

LbB1LJ). The mouse polyclonal anti-LbB2LJ antibodies recognized an additional band of approximately 48 kDa in all promastigote samples (Fig. 1c; Wb-LbB2LJ: TH, MF, FF, Fm), possibly in lower amount than those of 58–63 kDa in these preparations. This 48-kDa band was also recognized by the anti-LbB1LJ in microsomal fraction (Fig. 1c; Wb-LbB1LJ: Fm), suggesting again enrichment of the protein in this fraction. Distinct intensity of reactivity between each promastigote fraction (MF, FF, Fm) and either anti-r-potDomain B (Wb-Domain B), anti-LbB1LJ (Wb-LbB1LJ), or anti-LbB2LJ (Wb-LbB2LJ) antibodies was detected, and it appears to be related with the affinity and sensitivity of each immune serum for exposed epitopes within B domain from *L. amazonensis* NTPDase 1. Comparison with total promastigote preparation (Cb, HT) showed that 48 kDa or diffuse 58–63 kDa bands detected by Western blots (Wb) are not the major proteins in fractionated samples (Fig. 1c; Cb: MF, FF, Fm). These results suggested widespread subcellular locations of this parasite protein.

#### Immunolocalization of the *L. amazonensis* NTPDase 1

The *L. amazonensis* NTPDase 1 was localized by immunocytochemical techniques. The immune serum anti-r-potDomain B detected this protein at the surface of plasma membrane (a, c), nucleus (b, d), and mitochondria and kinetoplast (a, c, d) and at flagellar pocket and

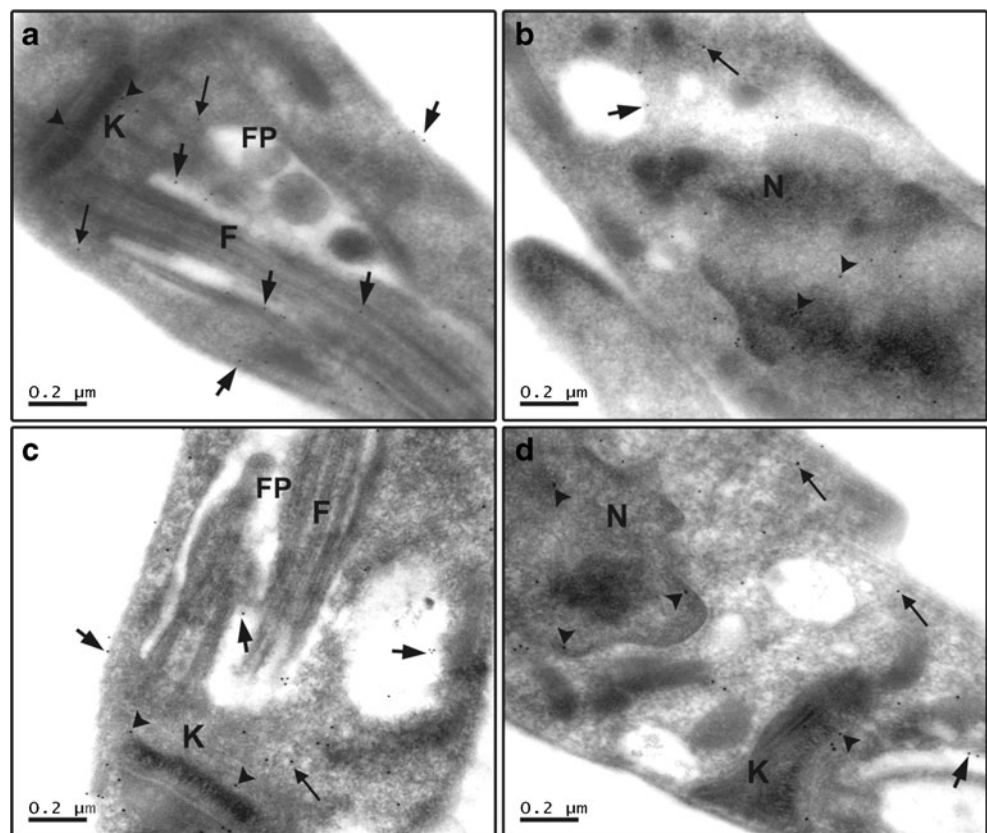
flagellum (a, c, d) and associated it with cytoplasmic vesicles (Fig. 2).

The immune serum anti-LbB1LJ (a, c, e) or anti-LbB2LJ (b, d, f) detected the NTPDase 1 at the surface of plasma membrane (b–f), nucleus (c, d), and mitochondria and kinetoplast (a, b, f) and at flagellar pocket and flagellum (Fig. 3a, b, e, f) and associated it with cytoplasmic vesicles, confirming the ubiquitous NTPDase 1 localization achieved by the immune serum anti-r-potDomain B (Fig. 2).

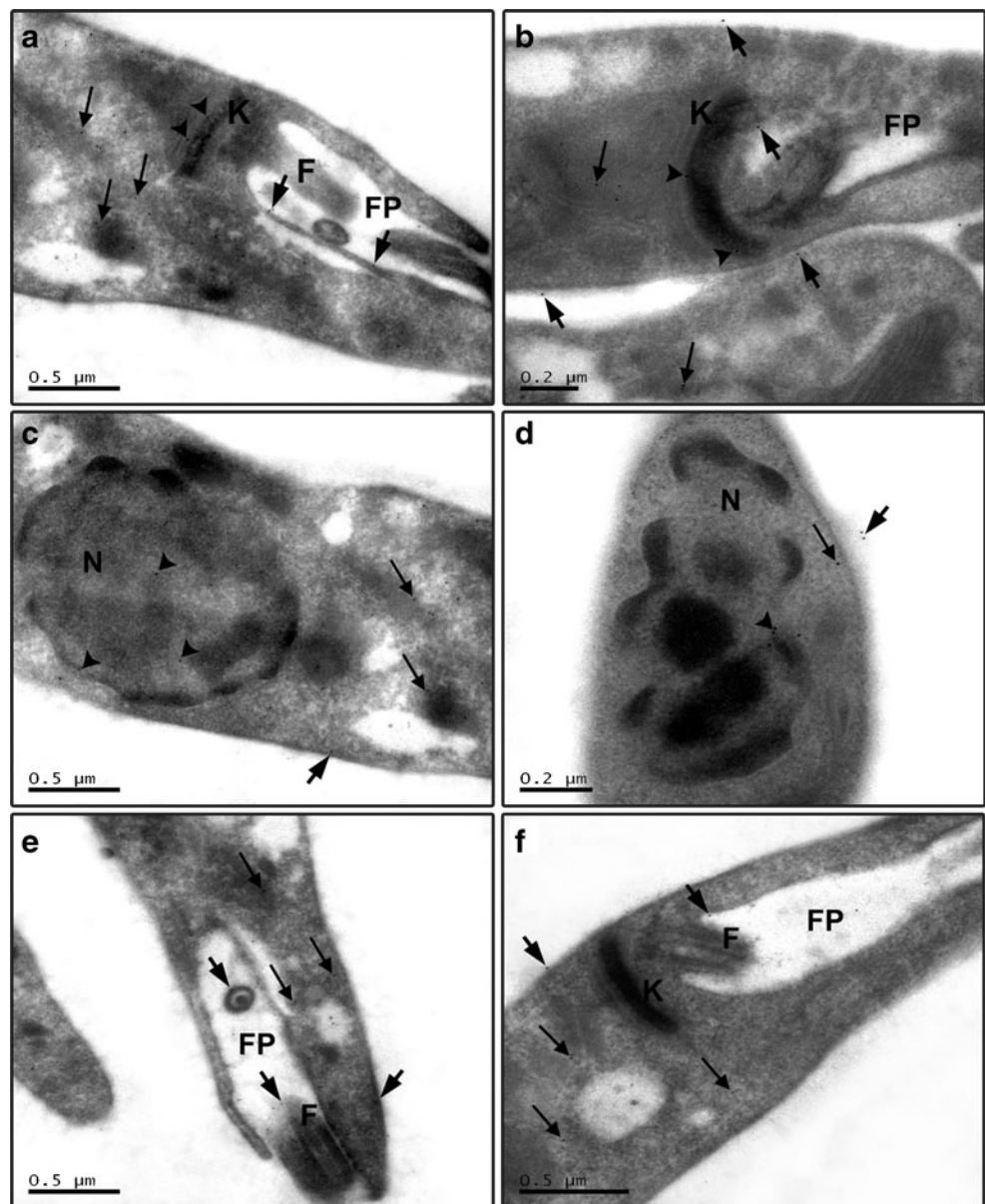
Disease progression and time course of appearance of specific antibody reactive with r-potDomain B or synthetic peptides LbB1LJ and LbB2LJ

In order to investigate the IgG subtype reactivity with r-potDomain B or peptides LbB1LJ and LbB2LJ, the infection progress was monitored along a period of 120 days in promastigote-infected BALB/c mice, a susceptible mice strain to *L. amazonensis* infection. The representative data are shown in Figs. 4 and 5. The primary kinetics of the BALB/c mice showed typical and progressive nodular lesion at 20, 40, 60, 90, and 120 days after infection (Fig. 4). Low IgG1 antibody reactivity with r-potDomain B (a), LbB1LJ (c), or LbB2LJ (e) was observed at 20, 40, and 60 days postinfection with values remaining similar to the reactivity found at 12th day (Fig. 5). At 90th day, the IgG1 antibody reactivity against each antigen significantly

**Fig. 2** Electron micrographs showing the localization of NTPDase 1 in *L. amazonensis* promastigotes using immune serum anti-r-potDomain B (a–d) and a colloidal gold-conjugated secondary antibody. Gold immunocomplexes of anti-peptide antibody are distributed at a–c the surface of plasma membrane (big arrow), b, d nucleus (arrowhead), and a, c, d mitochondria and kinetoplast (arrowheads) and at a, c, d flagellar pocket and flagellum (big arrows). FL flagellum, FP flagellar pocket, K kinetoplast, N nucleus



**Fig. 3** Electron micrographs showing the localization of NTPDase 1 in *L. amazonensis* promastigotes using immune serum anti-LbB1LJ (a, c, e), anti-LbB2LJ (b, d, f), and a colloidal gold-conjugated secondary antibody. Gold immunocomplexes of anti-peptide antibody are distributed at b–f the surface of plasma membrane (big arrow), c, d nucleus (arrowhead), and a, b, f mitochondria, and kinetoplast (arrowheads) and at a, b, e, f flagellar pocket and flagellum (big arrows). FL flagellum, FP flagellar pocket, K kinetoplast, N nucleus

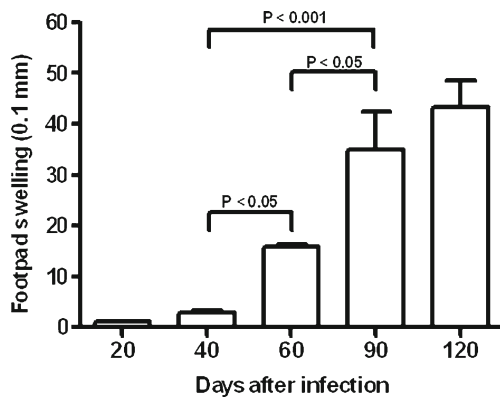


increased about 18- to 24-fold when compared to the 12th day and remained elevated even at 120th after infection (Fig. 5a, c, e).

On the other hand, significantly higher IgG2a antibody reactivity with r-potDomain B was observed at 40th day, about fourfold higher than those found in early stages of the infection, at 12th or 20th day (Fig. 5b). At 60 and 120 days after infection, IgG2a antibody reactivity with r-potDomain B decreased, remaining slightly augmented when compared with the 12th or 20th day (Fig. 5b). Significantly higher IgG2a antibody reactivity with LbB1LJ was evidenced at 40th and 60th days, about three to ninefold higher than those found in early stages of the infection at 12th or 20th day (Fig. 5d), whereas with LbB2LJ was two- to fivefold higher at 40th and 90th days (Fig. 5f). Apparently, the conserved B domain is capable to induce IgG2a production in early stages of infection.

## Discussion

As previously reported, an antigenic *L. amazonensis* NTPDase isoform was partially purified from promastigote membrane fraction and identified as a diffuse band of 58–63 kDa by cross-immunoreactivity with rabbit polyclonal anti-potato apyrase antibodies (Coimbra et al. 2002; 2008). Now, immunoreactivity with immune sera anti-r-potDomain B and anti-LbB1LJ or anti-LbB2LJ antibodies, used in this work as molecular tools, recognized the specific NTPDase 1 as diffuse bands of about 58–63 kDa in total promastigote preparation and in plasma membrane, flagellar, and microsomal fractions, reinforcing the hypothesis that the conserved domain-B within *L. amazonensis* NTPDase 1 is the major responsible by the cross-immunoreactivity detected with potato apyrase (Coimbra et al. 2008) and, also, suggesting

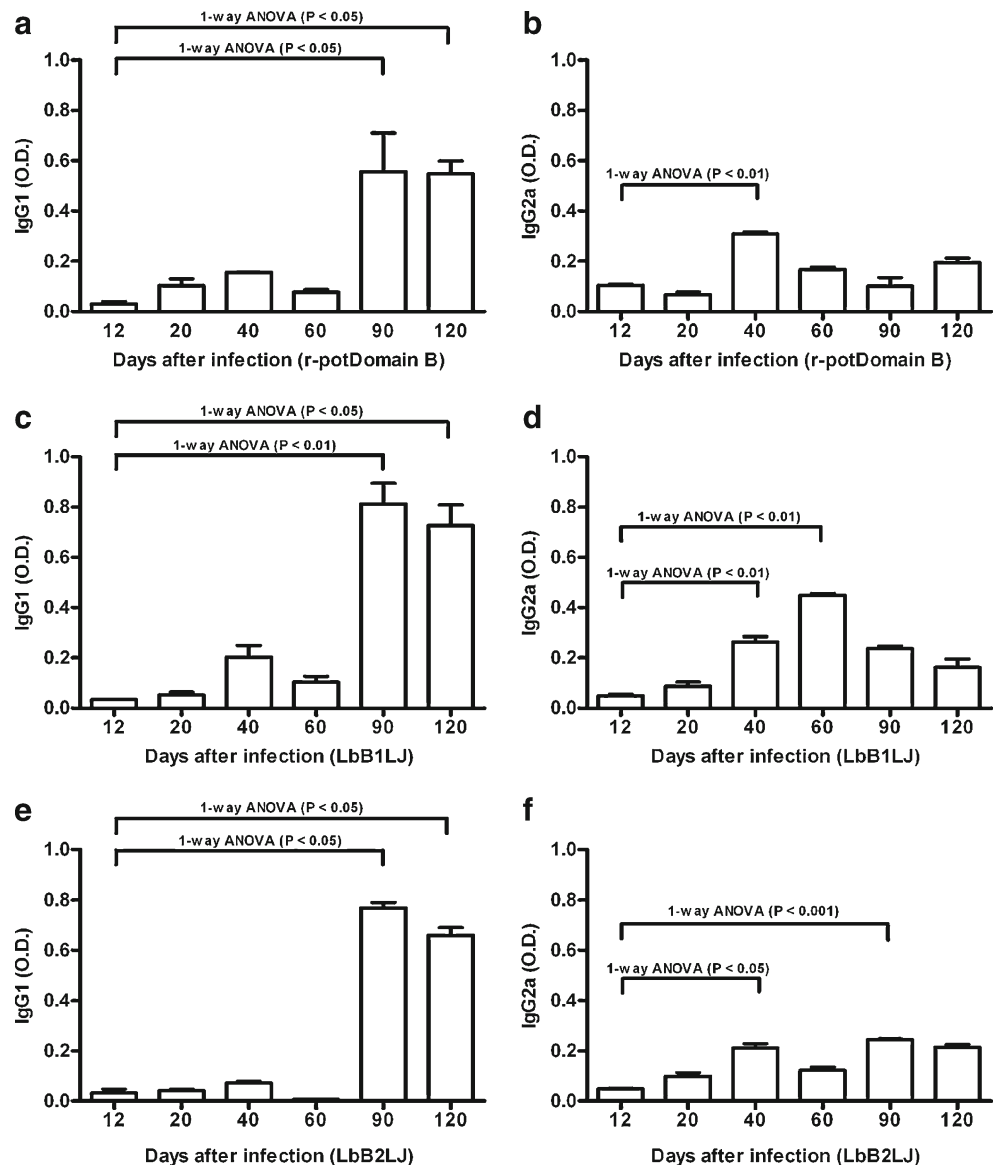


**Fig. 4** Kinetic of footpad swelling in BALB/c mice infected with  $10 \times 10^6$  *L. amazonensis* promastigotes. Progressive increased size of the lesions was analyzed by Tukey's multiple comparison test

widespread subcellular locations of this parasite protein. It is interesting to observe that both immune sera anti-LbB1LJ and anti-LbB2LJ, more specific than the immune serum anti-r-potDomain B, were able to detect an additional band of 48 kDa. The *L. amazonensis* NTPDase 1, annotated by us in NCBI database, has >80 % identity with the conserved NTPDase 1 isoforms annotated in the genome of *L. braziliensis*, *L. infantum*, or *L. major* (Peacock et al. 2007) and predicted molecular weights of approximately 48 kDa. Thus, the 48- and 58–63-kDa bands are possibly forms of the same protein subject to post-translational processing, which could be involved in function and/or subcellular localization (Kamath et al. 2011).

Ultrastructural immunocytochemical microscopy identified the specific *L. amazonensis* NTPDase 1 at the surface of the plasma membrane and at the flagellar pocket and flagellum. Besides this ecto-localization, the NTPDase 1 protein

**Fig. 5** Antibody reactivity with r-potDomain B, LbB1LJ, or LbB2LJ during disease progression of *L. amazonensis* infected-BALB/c. The IgG1 (a, c, e) or IgG2a (b, d, f) antibody reactivity was quantified by the ELISA technique using r-potDomain B (a, b), LbB1LJ (c, d), or LbB2LJ (e, f) as coating antigen and serum samples (diluted 1:100) from infected-BALB/c mice obtained at 12, 20, 40, 60, and 120 days after infection. The data were analyzed using Kruskal–Wallis test (GraphPad Prism Software version 4; San Diego, CA, USA). *P* values <0.05 were considered significant





was also detected at mitochondrial membrane and kinetoplast and in nucleus and was associated with cytoplasmic vesicles, corroborated by the Western blots of *L. amazonensis* promastigote fractions and as also demonstrated for *L. braziliensis* NTPDase 1 (Rezende-Soares et al. 2010; Porcino et al. 2012). Ecto-NTPDase activity in *L. amazonensis* amastigotes has been associated to the nutritional requirements of the parasite inside mammalian macrophages (Pineiro et al. 2006) and in promastigotes as a virulence factor influencing host inflammatory responses (Souza et al. 2011). The ubiquitous distribution of the specific *L. amazonensis* NTPDase 1 isoform shown here suggests its additional involvement in distinct metabolic pathways, modulating growth and morphological changes during its life cycle.

High antibody reactivity with either r-potDomain B or synthetic peptides LbB1LJ and LbB2LJ was found in *L. amazonensis*-infected BALB/c mice indicating the antigenicity of the B domain from NTPDase 1 isoform. The shared B domains from the NTPDases isoforms of *L. braziliensis*, *L. infantum*, and *Schistosoma mansoni* are also antigenic, as previously demonstrated by the antibody reactivity of patients or dogs naturally infected (Faria-Pinto et al. 2008; Rezende-Soares et al. 2010; Vasconcelos et al. 2009; Maia et al. 2011, 2013). In addition, both r-potDomain B and synthetic peptides derived from B domains have immunostimulatory properties inducing IgG1 and IgG2a antibody production (Mendes et al. 2011; Maia et al. 2011), which inhibit in vitro parasite NTPDase activity and/or promastigote proliferation (Porcino et al. 2012; Maia et al. 2011; 2013). These data reinforce the hypothesis that the conserved B domain from *L. amazonensis* NTPDases 1 is also a target for the host immune response.

To access the time course of appearance of specific IgG1 and IgG2a antibodies reactive with either r-potDomain B, LbB1LJ, or LbB2LJ, we analyzed the disease progression in susceptible *L. amazonensis*-infected BALB/c mice, and new features must be pointed out on the conserved B domain. Previous histopathological analysis demonstrated that susceptible infected-BALB/c mice present at 20th day discreet inflammatory infiltrates at the site of inoculation and few parasitized macrophages. At 40th day, a great number of mast cells were observed in the cortical region from draining lymph nodes. The infiltrates increase progressively during the course of the infection, and at 90th day, draining lymph nodes contain parasitized macrophages and giant cells, thus forming a tuberculoid granuloma (Abreu-Silva et al. 2004). As shown here, IgG1 reactivity with either r-potDomain B, LbB1LJ, or LbB2LJ significantly increased at 90–120 days postinfection, coinciding with the more active stage of the disease. On the other hand, epitopes within conserved B domain from *L. amazonensis* NTPDase 1 apparently are also capable to induce IgG2a production in early stages, as demonstrated by higher reactivity of

this isotype with r-potDomain B, LbB1LJ, or LbB2LJ at 40th day postinfection. In mice, the IgG1 isotype is associated to pathogenicity and chronicity of *Leishmania mexicana* infection inducing IL-10 that suppresses a Th1-type immune response, whereas IgG2a/c isotype is possibly associated to resistance mechanisms (Chu et al. 2010). Protection against development of dermal pathology and reduction in the *L. major* amastigote burden was obtained by immunization of BALB/c mice with conserved ribosomal proteins combined to CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant (Iborra et al. 2008). This protocol of immunization shifts a Th2-type immune response, associated with susceptibility, for a specific Th1-type immune response, with IFN- $\gamma$  production and a remarkable reduction of IgG1 and increased IgG2a antibody production against these specific antigens (Iborra et al. 2008). In addition, it was able to control a secondary *L. major* challenge, also with production of high IFN- $\gamma$  level, and a high IgG2a/IgG1 antibody ratio for ribosomal proteins (Ramírez et al. 2010). In view of these previously reported associations between IgG subtypes and infection, we hypothesize that the conserved B domain from *L. amazonensis* NTPDase 1, and possibly of other NTPDase 1 isoforms from *Leishmania* spp. (Faria-Pinto et al. 2008; Rezende-Soares et al. 2010; Vasconcelos et al. 2009; Porcino et al. 2012; Maia et al. 2011, 2013), participates in different immune responses, contributing with both disease immunomodulation and mechanisms that mediate susceptibility or resistance to infection.

Microsomal and flagellar fractions of *L. amazonensis* promastigotes, also used in this work, inoculated in Swiss Webster mice previously immunomodulated by BCG injections had strong protective ability, reducing footpad swelling and amastigotes load in lesions (Zaverucha do Valle et al. 2007), and possibly the NTPDase isoform contributed with these results. Recently, it was demonstrated that preimmunization of BALB/c mice with a recombinant form of an antigenic *T. gondii* NTPDase isoform combined with alum elicits a strong cellular and humoral immune response, with predominance of IFN- $\gamma$  and IgG2a production, inducing partial protection against virulent *T. gondii* strains (Tan et al. 2011). We believed that r-potDomain B, synthetic peptides or its derivatives, combined with a suitable adjuvant, could be tested in experimental protocols of immunotherapy and vaccination for leishmaniasis.

**Acknowledgments** This work was supported in part by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Oswaldo Cruz (FAPES), and Instituto Oswaldo Cruz. M.A. Juliano, L. Juliano, and S.C. Gonçalves-da-Costa are recipients of senior fellowships from CNPq. M.L. Detoni, A.C.R.G. Maia, G.N. Porcino, and L.R. Quellis were recipients of Master's and Doctoral fellowships from FAPEMIG, PROQUALIS/UFJF, CAPES/REUNI.

## References

- Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Cupolilo SMN, Cardoso FO, Souza CSF, Gonçalves da Costa SC (2004) Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. *Vet Parasitol* 121:179–187
- Almeida RP, Barral-Neto M, Jesus AMR, Freitas LAR, Carvalho EM, Barral A (1996) Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from human with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Am J Trop Med Hyg* 54:178–184
- 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*. *J Clin Microbiol* 30:1291–1293
- Burnstock G, Verkhratsky A (2009) Evolutionary origins of the purinergic signaling system. *Acta Physiol* 195:415–447
- Cardoso FO, Souza CSF, Mendes VG, Abreu-Silva AL, Gonçalves da Costa SC, Calabrese KS (2010) Immunopathological studies of *Leishmania amazonensis* infection in resistant and in susceptible mice. *J Infect Dis* 201:1933–1940
- Chu N, Thomas BN, Patel SR, Buxbaum LU (2010) IgG1 is pathogenic in *Leishmania mexicana* infection. *J Immunol* 185:6939–6946
- Coimbra ES, Gonçalves-Da-Costa SC, Corte-Real S, Freitas FGR, Durão A, Souza CSF, Silva Santos MI, Vasconcelos EG (2002) Characterization and cytochemical localization of an ATP diphosphohydrolase from *Leishmania amazonensis* promastigote. *Parasitology* 124:137–143
- Coimbra ES, Gonçalves-Da-Costa SC, Costa BLS, Giarola NLL, Rezende-Souares FA, Fessel MR, Ferreira AP, Souza CSF, Abreu-Silva AL, Vasconcelos EG (2008) A *Leishmania (L.) amazonensis* ATP diphosphohydrolase isoform and potato apyrase share epitopes: antigenicity and correlation with disease progression. *Parasitology* 135:327–335
- Cupolilo SMN, Souza CSF, Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Gonçalves da Costa SC (2003) Biological behavior of *Leishmania (L.) amazonensis* isolated from a human diffuse cutaneous leishmaniasis in inbred strains of mice. *Histol Histopathol* 18:1059–1065
- Faria-Pinto P, Meirelles MNL, Lenzi HL, Mota EM, Penido MLO, Coelho PMZ, Vasconcelos EG (2004) ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni* egg: characterization of a new antigen. *Parasitology* 129:51–57
- Faria-Pinto P, Rezende-Souares FA, Molica AM, Montesano MA, Marques MJ, Rocha MOC, Gomes JAS, Enk MJ, Correa-Oliveira R, Coelho PMZ, Neto SM, Franco OL, Vasconcelos EG (2008) Mapping of the conserved antigenic domains shared between potato apyrase and parasites ATP diphosphohydrolases: potential application in human parasitic diseases. *Parasitology* 135:943–953
- Faria-Pinto P, Mendes RGPR, Carvalho-Campos C, Maia ACRG, Oliveira AA, Coelho PMZ, Vasconcelos EG (2010a) Detection of IgG1 and IgG4 subtypes reactive against potato apyrase in schistosomiasis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105:370–373
- Faria-Pinto P, Montesano MA, Jacinto AA, Santos RS, Bordin FHS, Ferreira AP, Penido MLO, Coelho PMZ, Vasconcelos EG (2010b) Antibody reactivity against potato apyrase, a protein that shares epitopes with *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase isoforms, in acute and chronically infected mice, after chemotherapy and reinfection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105:374–379
- Iborra S, Parody N, Abánades DR, Bonay P, Prates D, Novais FO, Barral-Neto M, Alonso C, Soto M (2008) Vaccination with the *Leishmania major* ribosomal proteins plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against experimental cutaneous leishmaniasis in mice. *Microbes Infect* 10:1133–1141
- Kamath KS, Vasavada MS, Srivastava S (2011) Proteomic databases and tools to decipher post-translation modifications. *J Proteomics* 75:127–144
- Kikuchi T, Furuta T, Kojima S (2001) Membrane localization and demonstration of isoforms of nucleoside triphosphate hydrolase from *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 122:15–23
- Kikuchi T, Furuta T, Kojima S (2002) Kinetics of the nucleoside triphosphate hydrolase of *Toxoplasma gondii* in mice with acute and chronic toxoplasmosis. *Ann Trop Med Parasitol* 96:35–41
- Knowles AF (2011) The GDA1\_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. *Purinergic Signal* 7:21–45
- Korkmaz B, Attucci S, Juliano MA, Kalupov T, Jourdan ML, 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. *Nat Protoc* 3:991–1000
- Maia ACRG, Detoni ML, Porcino GN, Soares TV, Gusmão MAN, Fessel MR, Marques MJ, Souza MA, Coelho PMZ, Estanislau JASG, Rocha MOC, Santos MO, Faria-Pinto P, Vasconcelos EG (2011) Occurrence of a conserved domain in ATP diphosphohydrolases from pathogenic organisms associated to antigenicity in human parasitic diseases. *Dev Comp Immunol* 35:1057–1065
- Maia ACRG, Porcino GN, Detoni MD, Emidio NB, Marconato DG, Faria-Pinto P, Fessel MR, Reis AB, Juliano LJ, Juliano MA, Marques MJ, Vasconcelos EG (2013) An antigenic domain within a catalytically active *Leishmania infantum* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is a target of inhibitory antibodies. *Parasitol Int* 62:44–52
- Mendes RGPR, Gusmão MANG, Maia ACRG, Detoni ML, Porcino GN, Soares TV, Juliano MA, Juliano LJ, Coelho PM, Lenzi HL, Faria-Pinto P, Vasconcelos EG (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. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106:808–813
- Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, 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, Rabinowitz E, Arrowsmith C, White B, Thurston S, Bringaud F, Baldauf SL, Faulconbridge A, Jeffares D, Depledge DP, Oyola SO, Hilley JD, Brito LO, Tosi LRO, Barrell B, Cruz AK, Mottram JC, Smith DF, Berriman M (2007) Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* 39:839–847
- Pereira BAS, Alves CR (2008) Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Vet Parasitol* 158:239–255
- Pinheiro CM, Martins-Duarte ES, Ferraro RB, Fonseca de Souza AL, Gomes MT, Lopes AH, Vannier-Santos MA, Santo AL, Meyer-Fernandes JR (2006) *Leishmania amazonensis*: biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. *Exp Parasitol* 114:16–25
- Porcino GN, Carvalho-Campos C, Maia ACRG, Detoni ML, Faria-Pinto P, Coimbra ES, Marques MJ, Juliano MA, Juliano L, Diniz VA, Corte-Real S, Vasconcelos EG (2012) *Leishmania (Viannia) braziliensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1): Localization and *in vitro* inhibition of promastigotes growth by polyclonal antibodies. *Exp Parasitol* 132:293–299
- Ramírez L, Iborra S, Cortés J, Bonay P, Alonso C, Barral-Neto M, Soto M (2010) BALB/c mice vaccinated with *Leishmania major* ribosomal proteins extracts combined with CpG Oligodeoxynucleotides become resistant to disease caused by a secondary parasite challenge. *J Biomed Biotechnol*. Volume 2010, Article ID 181690, 9 pages, doi: 10.1155/2010/181690
- Requena JM, Alonso C, Soto M (2000) Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitol Today* 16:246–250

- Requena JM, Iborra S, Carrión J, Alonso C, Soto M (2004) Recent advances in vaccines for leishmaniasis. *Expert Opin Biol Ther* 4:1505–1517
- Rezende-Soares FA, Carvalho-Campos C, Marques MJ, Porcino GN, Giarola NL, Costa BL, Taunay-Rodrigues A, Faria-Pinto P, Souza MA, Diniz VA, Corte-Real S, Juliano MA, Juliano L, Vasconcelos EG (2010) Cytochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes and identification of an antigenic and catalytically active isoform. *Parasitology* 137:773–783
- Souza VL, Veras PST, Welby-Borges M, Silva TMC, Leite BR, Ferraro RB, Meyer-Fernandes JR, Barral A, Costa JML, Freitas LAR (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
- Tan F, Hu S, 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 F, Xin H, Pan C-W, Ding J-Q, Chen X-G (2010) Monoclonal antibodies against nucleoside triphosphate hydrolase-II can reduce the replication of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Int* 59:141–146
- Vasconcelos EG, Faria-Pinto P, Rezende-Soares FA, Penido ML, Gonçalves-da-Costa SC, Coelho PMZ (2009) Potato apyrase: a new tool for parasitic disease research. In: Tennant P, Benkeblia N (eds) *Fruit, vegetable and cereal science and biotechnology* 3. Global Science Books, Ikenobe, pp 80–88
- Zaverucha do Valle T, Gaspar EB, Souza-Lemos C, Souza CS, Marquez FB, Baetas-da-Cruz W, d'Escofier LN, Corte-Real S, Calabrese KS, Gonçalves da Costa SC (2007) Experimental *Leishmania (L.) amazonensis* leishmaniasis: characterization and immunogenicity of subcellular fractions. *Immunol Invest* 36:473–492

## Anexo G – Produção bibliográfica adicional obtida durante o Doutorado

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 106(7): 000-000, November 2011 1

**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**

Rita Gabriela Pedrosa Ribeiro Mendes<sup>1</sup>, Michéla Antônia do Nascimento Gusmão<sup>1</sup>, Ana Carolina Ribeiro Gomes Maia<sup>1</sup>, **Michelle de Lima Detoni<sup>2</sup>**, Gabriane Nascimento Porcino<sup>1</sup>, Thais Vieira Soares<sup>1</sup>, Maria Aparecida Juliano<sup>2</sup>, Luiz Juliano<sup>2</sup>, Paulo Marcos Zech Coelho<sup>3</sup>, Henrique Leonel Lenzi<sup>4</sup>, Priscila Faria-Pinto<sup>1</sup>, Eveline Gomes Vasconcelos<sup>1/4</sup>

CSIRO PUBLISHING

Australian Journal of Botany, 2012, 60, 559–567  
http://dx.doi.org/10.1071/BT12096

Short Communication

**Galls from *Calliandra brevipes* BENTH (Fabaceae : Mimosoidae): evidence of apyrase activity contribution in a plant–insect interaction**

**Michelle de Lima Detoni<sup>A,F</sup>**, Priscila Faria-Pinto<sup>A</sup>, Leonardo Ramos Quellis<sup>A</sup>, Naiara Miranda Rust<sup>A</sup>, Letícia Stephan Tavares<sup>A</sup>, Marcelo de Oliveira Santos<sup>A</sup>, Rosy Mary dos Santos Isaias<sup>B</sup>, Jean Carlos Santos<sup>C</sup>, G. Wilson Fernandes<sup>D</sup>, Geraldo Luiz Gonçalves Soares<sup>E</sup> and Eveline Gomes Vasconcelos<sup>A</sup>

Experimental Parasitology, 132 (2012) 293–299

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

**Experimental Parasitology**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yexpr](http://www.elsevier.com/locate/yexpr)

***Leishmania (Viannia) braziliensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1): Localization and *in vitro* inhibition of promastigotes growth by polyclonal antibodies**

Gabriane Nascimento Porcino<sup>a</sup>, Cristiane Carvalho-Campos<sup>a</sup>, Ana Carolina Ribeiro Gomes Maia<sup>a</sup>, **Michelle Lima Detoni<sup>a</sup>**, Priscila Faria-Pinto<sup>a</sup>, Elaine Soares Coimbra<sup>a</sup>, Marcos José Marques<sup>b</sup>, Maria Aparecida Juliano<sup>c</sup>, Luiz Juliano<sup>c</sup>, Vanessa Álvaro Diniz<sup>d</sup>, Suzana Corte-Real<sup>d</sup>, Eveline Gomes Vasconcelos<sup>a,\*</sup>

Parasitology International 62 (2013) 41–52

Contents lists available at ScienceDirect

**Parasitology International**


journal homepage: [www.elsevier.com/locate/parint](http://www.elsevier.com/locate/parint)




**An antigenic domain within a catalytically active *Leishmania infantum* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is a target of inhibitory antibodies**

Ana Carolina Ribeiro Gomes Maia<sup>a</sup>, Gabriane Nascimento Porcino<sup>a</sup>, **Michelle de Lima Detoni<sup>a</sup>**,  
 Nayara Braga Emídio<sup>a</sup>, Danielle Gomes Marconato<sup>a</sup>, Priscila Faria-Pinto<sup>a</sup>, Melissa Regina Fessel<sup>a</sup>,  
 Alexandre Barbosa Reis<sup>b</sup>, Luiz Juliano<sup>c</sup>, Maria Aparecida Juliano<sup>c</sup>,  
 Marcos José Marques<sup>d</sup>, Eveline Gomes Vasconcelos<sup>a,\*</sup>

Fajardo et al. *Parasites & Vectors* 2013, **6**:191  
<http://www.parasitesandvectors.com/content/6/1/191>



**RESEARCH** **Open Access**

**Seroprevalence and risk factors of toxoplasmosis in cattle from extensive and semi-intensive rearing systems at Zona da Mata, Minas Gerais state, Southern Brazil**



Hugo Vieira Fajardo<sup>1</sup>, Stefane D'Ávila<sup>2\*</sup>, Ronaldo Rocha Bastos<sup>3</sup>, Carolina Dutra Cyrino<sup>3</sup>, **Michelle de Lima Detoni<sup>4</sup>**,  
 João Luis Garcia<sup>5</sup>, Leandro Batista das Neves<sup>6</sup>, José Leonardo Nicolau<sup>6</sup> and Maria Regina Reis Amendocira<sup>6</sup>

Peptides 37 (2012) 291–300

Contents lists available at ScienceDirect

**Peptides**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/peptides](http://www.elsevier.com/locate/peptides)

**Antimicrobial activity of recombinant Pg-AMP1, a glycine-rich peptide from guava seeds**

Letícia Stephan Tavares<sup>a</sup>, João Vitor Rettore<sup>a</sup>, Renata Mendes Freitas<sup>a</sup>, William Farias Porto<sup>b</sup>,  
 Ana Paula do Nascimento Duque<sup>a</sup>, Júnya de Lacorte Singulani<sup>a</sup>, Osmar Nascimento Silva<sup>a</sup>,  
**Michelle de Lima Detoni<sup>a</sup>**, Eveline Gomes Vasconcelos<sup>a</sup>, Simoni Campos Dias<sup>b</sup>,  
 Octávio Luiz Franco<sup>a,b,\*</sup>, Marcelo de Oliveira Santos<sup>a</sup>

