

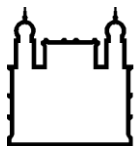
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE DA EXPRESSÃO
GÊNICA DA LaNTPDase-1 EM *LEISHMANIA AMAZONENSIS*

HANNA SILVA CONDELO

Rio de Janeiro
Abril de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Hanna Silva Condelo

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA
LANTPDASE-1 EM *LEISHMANIA AMAZONENSIS*.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo
Cruz como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Dr. Otacilio da Cruz Moreira.

RIO DE JANEIRO

Abril de 2017

Condello, Hanna Silva .

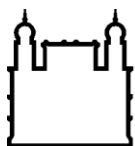
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA LANTPDASE-1 EM LEISHMANIA AMAZONENSIS. / Hanna Silva Condello. - Rio de Janeiro, 2017. 114 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientador: Otacilio da Cruz Moreira.

Bibliografia: f. 87-95

1. LaNTPDase-1. 2. Leishmania amazonensis. 3. Leishmaniose. 4. NTPDase. 5. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: HANNA SILVA CONDELO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA LANTPDASE-1 EM *LEISHMANIA AMAZONENSIS*.

ORIENTADOR: Dr. Otacilio da Cruz Moreira.

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Renato Porrozzi de Almeida- *Presidente* (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dra. Katia da Silva Calabrese. (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dra. Joanna Reis Santos de Oliveira. (IFRJ)

Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello. (UERJ)

Prof. Dr. Maria de Nazaré Correia Soeiro. (IOC/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 20 de abril de 2017.

Dedico este trabalho ao meu marido pela paciência,

compreensão, amor e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo.

À minha família, por todo carinho e incentivo. Aos meus pais, por toda educação a mim dada e por todos os sacrifícios feitos para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu marido, Breno, que sempre acreditou na minha capacidade, sempre me apoiou e me incentivou nesta longa trajetória. Por todos os momentos sacrificados por mim, e por todo amor, paciência, amizade, confiança e parceria.

Ao meu orientador, Otacilio, pela oportunidade de me fornecer toda a experiência profissional nesses dois anos.

À chefe do laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas (LABIMDOE), Dra. Constança e ao Dr. Carlos, pelo apoio.

À todos do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas/FIOCRUZ, especialmente a Natália e a Carol, por todos os momentos de convivência, sempre me auxiliando no que foi preciso.

À Dr. Léa Cysne-Filkenstein, por toda ajuda na realização dos experimentos infecção.

Aos funcionários da Plataforma de Sequenciamento de DNA (PDTIS-Fiocruz).

Aos membros da banca: membros, suplentes e revisor, pelas ótimas sugestões de aprimoramento da qualidade deste trabalho e pelo debate científico.

As agências de fomento e fontes e financiamento, cujo apoio permitiu a realização deste estudo FAPERJ, CNPq e ao IOC pela bolsa de mestrado.

E a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento do trabalho.

*“Nunca deixe que alguém te diga que não pode fazer algo. Nem mesmo eu.
Se você tem um sonho, tem que protegê-lo.
As pessoas que não podem fazer por si mesmas, dirão que você não consegue.
Se quer alguma coisa, vá e lute por ela. Ponto final.”
(À Procura da Felicidade – Filme 2006).*

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA LANTPDASE-1 EM *LEISHMANIA AMAZONENSIS*.

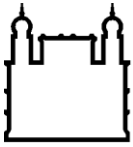
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

HANNA SILVA CONDELO

O presente trabalho trata de um estudo sobre as enzimas nucleotídeo trifosfato difosfohidrolase de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (nucleoside triphosphate diphosphohydrolase - LaNTPDase), um dos principais agentes etiológicos da leishmaniose difusa no Brasil. O desenho experimental do estudo contempla uma abordagem estrutural *in silico* e uma abordagem experimental de expressão genica do gene codificante desta enzima nos promastigotas e amastigotas do parasito. No estudo foi elucidada a sequência nucleotídica codificante correspondente à NTPDase de *L. amazonensis*. A sequência obtida foi alinhada com NTPDases de outras espécies do gênero *Leishmania*. Com os ensaios foi possível propor que esta enzima pode estar ligada à membrana plasmática por um domínio transmembranar, sendo denominada NTPDase-1. A estrutura terciária da enzima foi proposta por modelagem por homologia, indicando importantes diferenças estruturais, especialmente na região de ligação aos nucleotídeos. Expressão heteróloga da enzima de *L. amazonensis* (rLaNTPDase-1) foi realizada indicando uma proteína de 45 kDa em condições desnaturantes. Em paralelo, avaliamos a modulação da expressão gênica da LaNTPDase-1 entre dois isolados de *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8 e MHOM/BR/77/LTB0016), com distintos percentuais de infectividade em macrófagos de camundongos BALB/c cepa PH8 (31,0%±6,3) e cepa LTB0016 (18,2%± 5,3) e perfis diferentes das fases logarítmica e estacionarias de crescimento *in vitro* dos promastigotas. Observamos que durante a curva de crescimento, somente a cepa PH8 apresentou um aumento na expressão do gene no quarto dia de cultivo (4,3±2), quando comparado com a LTB0016. A expressão da LaNTPDase-1 mostrou-se aumentada nos amastigotas, quando comparada com os promastigotas da cepa PH8 (>5,2±0,8) e da cepa LTB0016 (>0,8±0,5). Os resultados aqui apresentados indicam que o parasito *L. amazonensis* expressa o gene correspondente a enzima NTPDase-1, sendo que este gene é mais

expresso nos amastigotas do que nos promastigotas. Estes resultados reforçam a importância desta enzima na fase do parasito quando no hospedeiro vertebrado.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND GENE EXPRESSION ANALYSIS OF LANTPDASE-1 IN *LEISHMANIA AMAZONENSIS*.

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

HANNA SILVA CONDELO

The present work deals with a study on the nucleotide triphosphate diphosphohydrolase enzymes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (LaNTPDase), one of the main etiological agents of diffuse leishmaniasis in Brazil. The experimental design of the study contemplates an *in silico* structural approach and an experimental approach of genetic expression of the gene coding for this enzyme in promastigotes and amastigotes parasites. In the study the nucleotide sequence corresponding to the NTPDase of *L. amazonensis* was elucidated. The sequence obtained was aligned with NTPDases from other species of the genus *Leishmania*. With the assays it was possible to propose that this enzyme may be bound to the plasma membrane by a transmembrane domain, being called NTPDase-1. The tertiary structure of the enzyme was proposed by homology modeling, indicating important structural differences, especially in the nucleotide binding region. Heterologous expression of the *L. amazonensis* enzyme (rLaNTPDase-1) was performed indicating a 45 kDa protein under denaturing conditions. In parallel, we evaluated the modulation of LaNTPDase-1 gene expression between two isolates of *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8 and MHOM/BR/77/LTB0016), with different percentages of infectivity in macrophages of BALB/c mice, strain PH8 (31.0% \pm 6.3) and strain LTB0016 (18.2% \pm 5.3) and different profiles of the logarithmic and stationary phases of *in vitro* growth of promastigotes. We observed that during the growth curve, only the PH8 strain showed an increase in gene expression on the fourth day of cultivation (4.3 \pm 2) when compared to LTB0016. The expression of LaNTPDase-1 was shown to be increased in the amastigotes compared to the promastigotes of strain PH8 (>5.2 \pm 0.8) and strain LTB0016 (> 0.8 \pm 0.5). The results presented here indicate that the parasite *L. amazonensis* expresses the gene corresponding to the enzyme NTPDase-1, and this gene is more expressed in the amastigotes than in the promastigotes. These results reinforce the importance of this enzyme in the parasite phase when in the vertebrate host.

ÍNDICE

RESUMO	8
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Breve histórico:	1
1.2. O parasito e seu ciclo biológico:	5
1.2.1. Epidemiologia:	9
1.2.2. <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> :	10
1.3. Formas clínicas, diagnóstico de tratamento da leishmaniose:	12
1.2.3. Diagnóstico e Tratamento da Leishmaniose:.....	15
METABOLISMO PURINÉRGICO EM LEISHMANIA.....	17
1.4. Purinas e Nucleotídeos Extracelulares:	17
1.5. Purinoreceptores:	18
1.6. As NTP difosfohidrolases:.....	19
1.7. Função das NTPDases em microrganismos:	21
1.8. Justificativa:	24
2. OBJETIVO GERAL	26
2.1. Objetivos Específicos	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS:	27
3.1. Material e reagentes:.....	27
3.2. Animais:	28
3.3. Cultivo de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> :	28
3.3.1. Parasitos utilizados e manutenção in vitro em laboratório.....	28
3.3.2. Manutenção in vivo dos parasitos e obtenção de amastigotas	28
3.3.3. Estratégia para diferenciação dos promastigotas e amastigotas <i>in vitro</i> :.....	29
3.3.4. Obtenção de <i>in vitro</i> das formas amastigotas de macrófagos:	29
3.4. Extração de ácidos nucléicos e síntese de cDNA:	30
3.5. Construção dos oligonucleotídeos e PCR Convencional:	31
3.6. Clonagem e sequenciamento do gene LaNTPDase:.....	34
3.7. Estudos in silico:.....	35

3.7.1. Análise comparativa entre sequências de primária da LaNTPDase;	35
3.7.2. Construção do modelo tridimensional da LaNTPDase:	36
3.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio:	36
3.9. Análise por Western Blotting e Dot Blot:	36
3.10. Expressão heteróloga da NTPDase-1:	37
3.11. Avaliação da expressão da LaNTPDase-1:.....	38
3.12. Ensaio de interação <i>Leishmania</i> -Macrófagos:.....	38
3.13. Análise estatística dos resultados:.....	39
4. RESULTADOS	41
4.1. Amplificação da porção central da NTPDase-1 em <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> :	41
4.2. Clonagem e sequenciamento dos produtos amplificados para a NTPDase-1 de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> :.....	43
4.3. Identificação do CDS correspondente à NTPDase-1 de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> :.....	45
4.4. Construção de árvore filogenética baseada na sequência da LaNTPDase-1:	48
4.5. Modelo Tridimensional da NTPDase-1 <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> :	50
4.6. Clonagem da rLa-NTPDase-1:	53
4.7. Indução da expressão da La-NTPDase-1:.....	56
4.8. Comportamento biológico <i>in vitro</i> das cepas IFLA/BR/1967/PH8 e MHOM/BR/1977/LTB0016:.....	59
4.9. Expressão dos genes Alfa tubulina e GAPDH para as cepas IFLA/BR/1967/PH8 e MHOM/BR/1977/LTB0016 e diferentes formas morfológica da <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> :	65
4.10. Avaliação da expressão do gene LaNTPDase-1 em promastigotas e amastigotas:	67
5. DISCUSSÃO	70
6. PERSPECTIVAS	78

7. CONCLUSÕES	79
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
9. ANEXOS.	89

Índice de Figuras

Figura 1 - Classificação de gênero <i>Leishmania</i>	4
Figura 2 - <i>Leishmania sp.</i> e suas diferentes formas.....	7
Figura 3 - Ciclo de vida do parasito do gênero <i>Leishmania</i>	8
Figura 4 - Número de casos relatados de leishmaniose tegumentar em 2014 no Brasil.....	11
Figura 5 - Distribuição das espécies de <i>Leishmania</i>	11
Figura 6 - Formas Clínicas da leishmaniose em pacientes.....	14
Figura 7 - Representação esquemática mostrando a topologia de membrana de uma subunidade do receptor P2X típico.....	20
Figura 8 - Representação hipotética da NTPDases em humanos e patógenos.....	20
Figura 9 - Esquema dos oligonucleotídeos desenhados para amplificar o gene da NTPDases em <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	33
Figura 10 - Amplificação da LaNTPDase-1 utilizando dois conjuntos de oligonucleotídeos desenhados para as regiões ACRs e para as regioes inicial do CDS e final do CDS.....	42
Figura 11 - Seleção dos clones positivos.....	44
Figura 12 - Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácido de NTPDase-1	46
Figura 13 – Dendograma estrutural das NTPDase-1	49
Figura 14 - Modelo teórico estrutural da LaNTPDase-1.....	51
Figura 15 - Resíduos de aminoácidos potencialmente envolvidos no sítio de ligação da LaNTPDase-1 nucleotideo.....	52
Figura 16 - Análise dos produtos de amplificados do gene LaNTPDase-1 com e sem o domínio de ligação à membrana da PCR.	54
Figura 17 - Análise dos produtos de amplificados do gene LaNTPDase-1 da PCR de colônia.....	55
Figura 18 - Detecção da expressão da rLaNTPDase-1 por Dot Blot.....	57
Figura 19 - Detecção da expressão da rLaNTPDase-1 por Western Blot.....	58
Figura 20 - Curva de crescimento da <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> das cepas MHOM/BR/77/LTB0016 e IFLA/BR/1967/PH8	61
Figura 21 - Infecção in vitro de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c com a cepa MHOM/BR/1977/LTB0016.....	62

Figura 22 - Infecção in vitro de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c com a cepa IFLA/BR/1967/PH8.	63
Figura 23 - Determinação do índice endocítico após 24 horas de infecção.	64
Figure 24 - Expressão dos genes Alfa tubulina e GAPDH para a cepa MHOM/BR/1977/LTB0016.	66
Figure 25- Expressão da LaNTPDase-1 durante uma curva de crescimento.	68
Figura 26 - Expressão da LaNTPDase-1 em diferentes formas evolutivas de Leishmania (Leishmania) amazonensis	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na PCR convencional.	40
Tabela 2 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a expressão heteróloga	40
Tabela 3 - Sequência dos oligonucleotídeos para a expressão gênica da NTPDase-1.....	40

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACRs - Regiões conservadas em apirases
ADP – *Adenosine diphosphate*
AMP - *Adenosine monophosphate*
AMP3' - *Adenosine monophosphate 3'*
AMP5' - *Adenosine monophosphate 5'*
ATP - *Adenosine triphosphate*
cDNA - *complementary DNA*
CDS – *Coding DNA sequence*
CD39 - *Cluster of Differentiation 39*, NTPDase humana
CT: *Cycle Threshold*
DNA – *deoxyribonucleic acid*
ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*
GAPDH: *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*
ITP – *Inosine triphosphate*
Km: Constante de *Michaelis*
LaNTPDase-1 – NTPDase-1 de *Leishmania amazonensis*
LC: Leishmaniose cutânea
LCD: Leishmaniose cutânea difusa
LDPC: Leishmaniose dérmica pós calazar
LMC: Leishmaniose mucocutânea
LTA: Leishmaniose tegumentar americana
LV: Leishmaniose visceral
NTC - *No template control*
NTPDases - *Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase*
OMS/WHO: Organização Mundial da Saúde
PB – pares e bases
PBS - *Phosphate buffered saline*
PBS-T: solução de PBS acrescido de 0,5% de Tween 20
P1 – Receptor purinérgico do tipo 1
P2 – Receptor purinérgico do tipo 2
RNA – *Ribonucleic acid*
RT-PCR: *Reverse transcription Polymerase Chain Reaction*

RT-qPCR – *Polymerase Chain Reaction*

SFB - Soro fetal bovino

SMF: Sistema mononuclear fagocitário

UDP – *Uridine diphosphate*

UTP - *Uridine-5'-triphosphate*

Vmax: Velocidade máxima

1. Introdução

A LEISHMANIOSE

1.1. Breve histórico:

As leishmanioses são um conjunto de doenças de alcance mundial. Estas doenças são primariamente infecções zoonóticas que afetam outras espécies que não o homem, o qual pode ser envolvido secundariamente, podendo ocorrer mesmo a transmissão inter-humana (revisado por Lessa et al 2007). A Leishmaniose visceral (LV) foi descrita na Grécia em 1835 quando então era denominada "ponos" ou "hapoplínakon. Em 1869, na Índia foi criado o termo "kala-jwar" que quer dizer febre negra ou "kala-azar" que significa pele negra em virtude do discreto aumento da pigmentação da pele ocorrido durante a doença (De Souza *et al.*, 1981). A primeira descrição do parasito causador da LV foi feita na Índia por Charles Donovan, do Serviço Médico Indiano em Madras, de forma independente em 1903 enquanto William Boog Leishman estava realizando sua pesquisa na Grã-Bretanha. (Dutta AK, 2008).

Na era pré colombiana relatos desta doença foram encontrados no Peru e no Equador através da reprodução em vasos de cerâmica de figuras de humanos com úlceras na pele e desfiguração no nariz e na boca devido a uta, lepra branca ou espúndia. Um dos primeiros relatos clínicos da leishmaniose cutânea foi realizado por Alexander Russel em 1756 (do Vale et al, 2005).

No Brasil, os primeiros relatos foram realizados por Moreira (1895) em indivíduos residentes no estado da Bahia, apresentando úlceras nos braços e nas pernas, ocasionado pela picada de insetos. Alguns indivíduos apresentavam lesões na boca e no nariz, sendo essas formas clínicas conhecidas na época como botão da Bahia, buba brasileira, ferida brava ou botão do Oriente (Brasil, Ministério da Saúde, 2006).

Porém, a identificação do agente etiológico foi realizada somente em 1903 por William Leishman e Charles Donovan, através de esfregaços de pacientes. Leishman realizou a identificação em esfregaços do fígado obtido de um soldado que faleceu devido a febre Dum dum, enquanto Donovan analisou o aspirado esplênico de um paciente hindu com febre (Brasil, Ministério da Saúde, 2006).

Posteriormente, o agente etiológico dessas lesões foi classificado como *Leishmania donovani* por Ross (1903), a partir de amostras de indivíduos com *kala azar*, sendo o primeiro autor a descrever o gênero *Leishmania* (NEVES 2011). Lindenberg e Carini & Paranhos (1909) observaram "corpúsculos de *Leishman-Donovan*" (formas amastigotas) em lesões cutâneas de indivíduos acometidos pela "úlceras de Baurú" no Estado de São Paulo. Gaspar Vianna (1911) clínico e parasitologista brasileiro investigaram formas amastigotas em lesões cutâneas de um paciente de Além Paraíba, em Minas Gerais, Brasil, e concluiu, que sua morfologia se diferencia das formas amastigotas de *Leishmania tropica*, denominando então, o parasito *Leishmania brasiliensis* como o agente etiológico da leishmaniose tegumentar.

Em 1922 Aragão demonstrou o papel do flebotomo *Lutzomyia intermedia* na transmissão de *Leishmania braziliensis*, ao estudar um surto ocorrido no bairro de Laranjeiras, no Rio de Janeiro. Em 1946, Convit e Lapenta descreveram uma nova forma de leishmaniose tegumentar em pacientes na Venezuela que era caracterizada por um grande número de lesões nodulares espalhadas pelo corpo e contendo uma enorme quantidade de amastigotas. Sendo então esta forma clínica denominada leishmaniose cutânea difusa (LCD) e seu agente etiológico foi posteriormente chamado de *Leishmania pifanoi*. Em 1953, Biagi identificou o agente etiológico da úlcera dos chicleros em Yucatán, Guatemala e Belize, sendo denominado *Leishmania tropica mexicana*. Até 1954 acreditava-se que todos os casos de leishmaniose tegumentar humano no país eram causados pela *Leishmania braziliensis*, até que Floch identificou o agente causador da doença na floresta, localizada na Guiana Francesa, sendo denominado *Leishmania guyanensis*.

Em 1960, as classificações dos parasitos eram baseadas no comportamento clínico dos pacientes de diferentes regiões. Atualmente, os parasitos são classificados no Sub-reino Protozoa, Ordem *Kinetoplastida* e Família *Trypanosomatidae* (Vickkerman,1976). Entre os oitos gêneros que compõe essa Família, encontra-se o gênero *Leishmania* que, por sua vez, reúne as seções

Paraleishmania e *Euleishmania* (Figura 1). A seção *Euleishmania* compreende o subgênero *Viannia* e outros dois subgêneros, *Leishmania* e *Sauroleishmania*. Somente as espécies dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* são descritas como causadoras de doença no homem, enquanto que os parasitos do subgênero *Sauroleishmania* têm relatos de ocorrência em répteis. Além disso, os parasitos do subgênero *Viannia* são reconhecidos pelo comportamento peripilárico por colonizarem a parte posterior do tubo digestivo e no intestino médio abdominal do hospedeiro. Os parasitos do subgênero *Leishmania* são reconhecidos pelo comportamento suprapilárico, por ocuparem a porção do tubo digestivo anterior ao piloro do hospedeiro invertebrado, principalmente nas regiões abdominais e torácicas do intestino médio. Já os parasitos do subgênero *Sauroleishmania* tem comportamento hipopilárico, estando seu desenvolvimento restrito ao intestino posterior dos hospedeiros invertebrados (Killick-Kendrick, 1999).

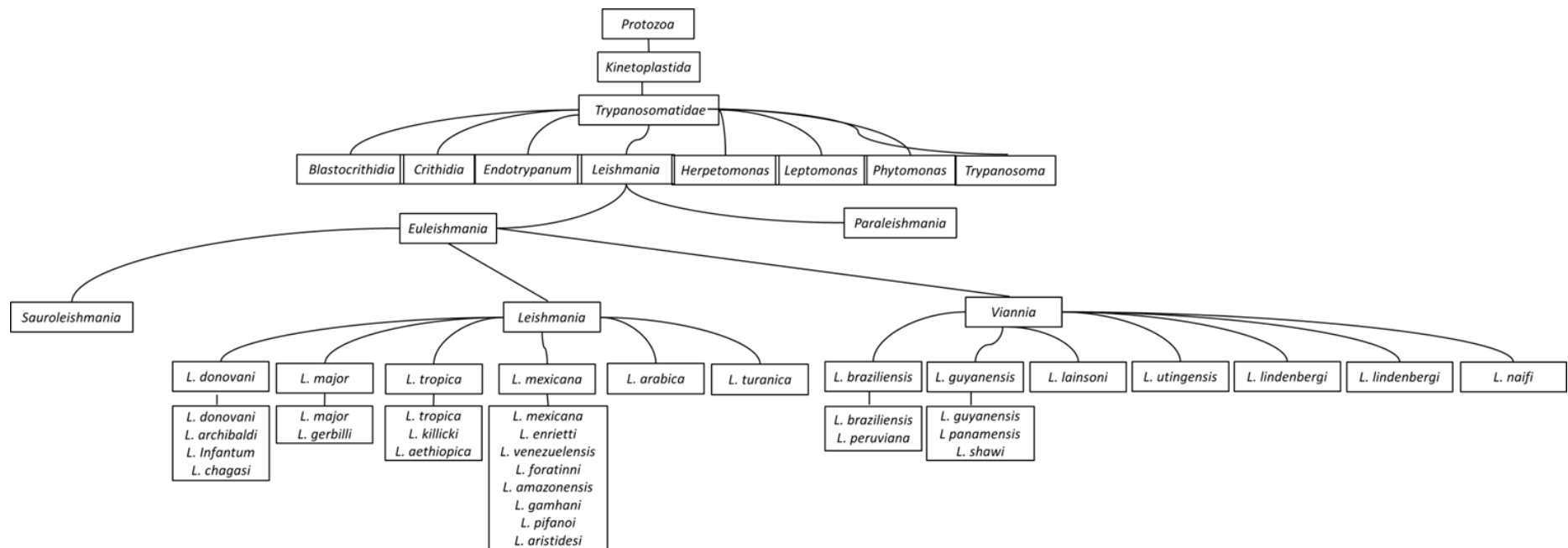


Figura 1 - Classificação de gênero *Leishmania*: subgêneros e complexos de espécies. (Adaptado de Cupolillo *et al*, 2014).

1.2. O parasito e seu ciclo biológico:

Durante o ciclo de vida da *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, assim como as demais espécies deste gênero, o parasito apresenta duas formas evolutivas: as formas promastigotas, presentes em insetos vetores e as formas amastigotas intracelulares, encontradas em hospedeiros vertebrados (Muskus & Marín-Villa, 2002). As formas amastigotas não possuem flagelo livre e apresentam morfologia arredondada, que parasitam células do SFM de mamíferos. O núcleo tem uma localização central, anterior ao cinetoplasto, que é uma parte da mitocôndria onde o DNA mitocondrial está organizado juntamente com uma matriz de fibras finas. O cinetoplasto, apresenta uma grande quantidade de ácido desoxirribonucléico (kDNA) distribuído em forma de minicírculos e maxicírculos, contendo várias cópias do genoma mitocondrial localizada em seu interior (Riou & Delain, 1969). As formas promastigotas apresentam flagelos livres e podem ser vistas em cultura e no intestino médio de insetos fêmeas da subfamília *Phlebotominae (Díptera, Psychodidae)*. A infecção do inseto ocorre no momento do repasto sanguíneo, quando flebotomíneos fêmeas adquirem a *Leishmania* em sua forma amastigota de um hospedeiro vertebrado infectado, através da presença destas formas livres no sangue e presentes no interior das células do SMF (Figura 2 B). As formas amastigotas ficam localizadas na matriz peritrófica e devido a diferenças ambientais, como temperatura e pH ocorre a transformação dos amastigotas em promastigotas. As formas promastigotas realizam a divisão binária, seguida da migração para o estômago, onde ocorre a diferenciação em promastigotas procíclicas, sendo esta forma que coloniza o estômago e a faringe do flebotomíneo. (Figura 2 A). As formas promastigotas procíclicas realizam o processo de metaciclogênese, que as torna capazes de infectar os hospedeiros mamíferos, sendo então classificadas como promastigotas metacíclicas. Neste processo, as *Leishmanias* deixam de se reproduzir e sofrem modificações na superfície, que diminuem a interação com o intestino do vetor, com isso, ocorre a migração para a probóscide. Essa nova localização facilita com que sejam transmitidas ao hospedeiro vertebrado no próximo repasto sanguíneo do inseto. (Bates, 2007)

O protozoário é transmitido ao hospedeiro vertebrado pelo inseto vetor através do repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneo infectado com formas promastigotas

metacíclicas (figura 3). As formas promastigotas metacíclicas são fagocitados por células do SMF, localizando-se em uma vesícula chamada fagossomo. Posteriormente, o fagossomo se funde com o lisossomo, formando o fagolisossomo (Russell, 1995). No interior dos fagolisossomos, dentro de 12-24h, ocorre a diferenciação das formas promastigotas em amastigota, que se reproduzem por divisão binária. (Handman e Bullen, 2002). As formas amastigotas são capazes de sobreviver neste ambiente e multiplicar-se até a ruptura da célula pelo número excessivo de parasitos em seu interior. Quando liberados, os parasitos podem infectar outras células do SMF ou o inseto vetor, dando continuidade à infecção ou levando à manutenção do ciclo (Herwaldt, 1999).

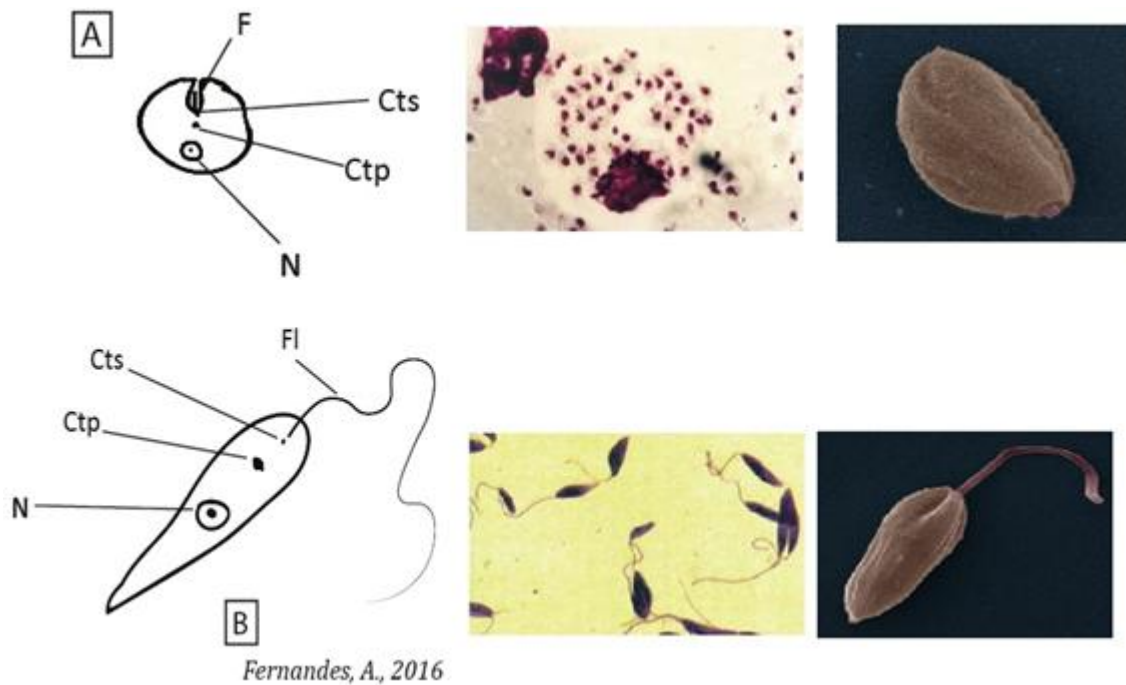


Figura 2 - *Leishmania* sp. e suas diferentes formas representadas esquematicamente e por fotos de microscopia óptica e eletrônica. A - *Leishmania* na forma amastigota. B - *Leishmania* na forma promastigota. cinetoplasto (ctp): cinetossoma (cts); flagelo (F); flagelo livre (FI); núcleo (N) F: Flagelo. Figuras adaptadas de Brasil, Ministério da Saúde, 2006 e Fernandes, A, 2016.

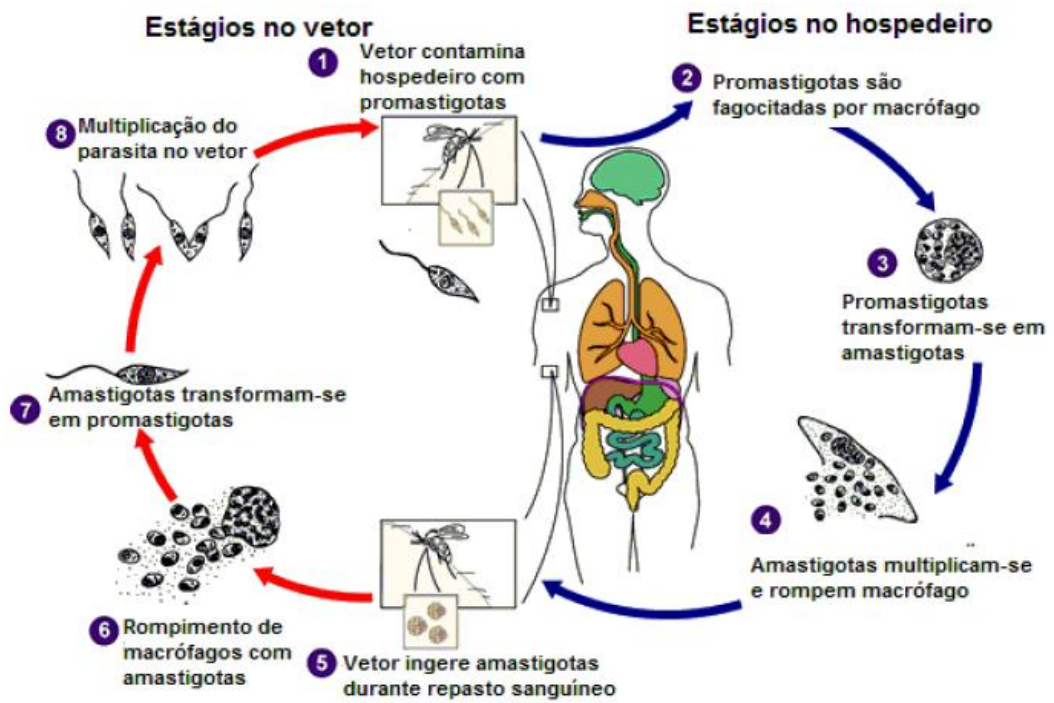


Figura 3 - Ciclo de vida do parasito do gênero *Leishmania*. Figura modificada de CDC, 2011.

1.1.1. Epidemiologia:

As leishmanioses são zoonoses com alto impacto de morbidade e mortalidade, estando presente em 98 países dos cinco continentes, ocasionando cerca de 20 mil mortes por ano (WHO, 2017). Esta doença é considerada um grande problema de saúde pública, por afetar milhões de pessoas. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que 12 milhões de pessoas estejam afetadas por esta doença, com 1 bilhão de pessoas em áreas de risco de ocorrência da leishmaniose e uma incidência anual de 1 milhão de casos, colocando-a como uma das seis doenças tropicais mais importantes (WHO, 2017).

Inicialmente, a doença era restrita aos moradores próximos às regiões florestais. Porém, ocorreu o aumento da distribuição geográfica da doença, devido à exploração desordenada da floresta e a derrubada de matas para construção de estradas e áreas residenciais. No Brasil em 2015 foram notificados 20.418 casos de leishmaniose tegumentar, sendo 19.402 casos de leishmaniose cutânea e 1.016 de casos de leishmaniose mucocutânea (figura 4 PAHO, 2017). Segundo a OMS em 2012 e 2014, nas Américas foram registrados em média 51.092 casos novos de leishmaniose tegumentar, sendo 80% dos casos presentes em quatro países: Brasil (40%), Colômbia (20%), Peru (16%) e Nicarágua (5%) (WHO, 2015).

No entanto, apesar do elevado índice mundial de incidência, prevalência e da expansão do território afetado, poucos avanços foram realizados na quimioterapia nos últimos anos, além de ainda não existir uma vacina para a doença, sendo esta classificada no grupo das doenças tropicais negligenciadas (WHO, 2010).

1.1.2. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*:

O presente estudo está focado na *Leishmania Leishmania amazonensis*, uma espécie pertencente ao complexo *Leishmania Leishmania mexicana*, que foi descrita pela primeira vez por Ralph Lainson e Jeffrey Shawn em 1972. As primeiras análises comparativas utilizando o marcador molecular kinetoplasto realizadas por Wirth, 1988 utilizando as cepas IFLA/BR/67/PH8, MHOM/BR/00/Raimundo e MHOM/BR/00/Josefa de *Leishmania Leishmania amazonensis*, revelaram uma considerável divergência entre as cepas. Não é, portanto, surpreendente que entre as cepas de uma espécie apresentem características imunopatogênicas distintas. (Cupolillo et al, 2014)

As características clínicas das leishmanioses tendem a variar entre e dentro das regiões endêmicas, onde se faz presente as diferentes espécies do parasita ou o tipo de ciclo de transmissão zoonótico ou antroponótico, além da resposta imunológica e dos determinantes genéticos de cada paciente. Os mecanismos que determinam a preferência tecidual do protozoário em ser dermatrópica (pele e mucosas) ou viscerotrópica (órgãos internos), ainda não são estabelecidos, porém sabe-se que existe uma relação entre as espécies e a forma clínica (WHO, 2010).

Esta espécie vem sido evidenciada como um importante agente etiológico da leishmaniose tegumentar americana em humanos, apresentando diversidade nas manifestações clínicas (Barral, 1991). A distribuição geográfica desta espécie no Brasil teve início na região norte predominantemente na bacia Amazônica (Lainson, 1997), no ano de 2005, o Ministério da Saúde identificou que esta espécie está em expansão geográfica, presentes nos estados do Acre, Amazonas, Rondônia, Pará, Tocantins, Maranhão, Ceará, Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Brasília, Minas Gerais, Rio de Janeiro e em Santa Catarina (figura 5).

A infecção humana com *Leishmania Leishmania amazonensis* produz lesões com bordas bastante infiltradas, caracterizando-se histopatologicamente, por um denso infiltrado dérmico de macrófagos vacuolados contendo inúmeros amastigotas. Nas infecções ocasionadas por *Leishmania Leishmania amazonensis*, segundo Silveira, Lainson e Corbett (2004), além da produção de IFN- γ , também ocorre baixa produção de IL-4, porém suficiente para diminuir a resposta Th1 nesses pacientes e responder bem ao tratamento.

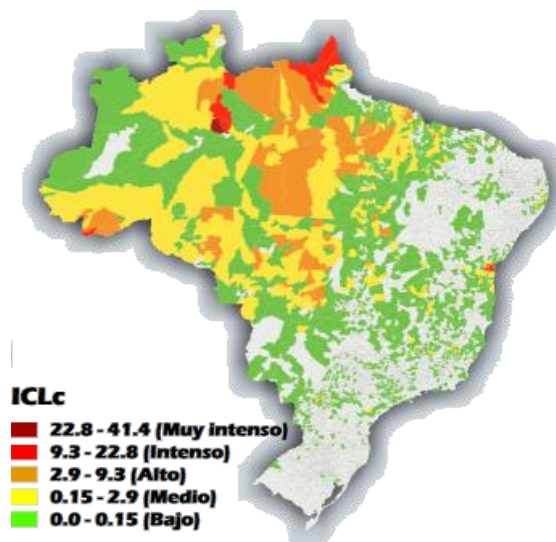


Figura 4 - Número de casos relatados de leishmaniose tegumentar em 2014 no Brasil. PAHO, 2014.

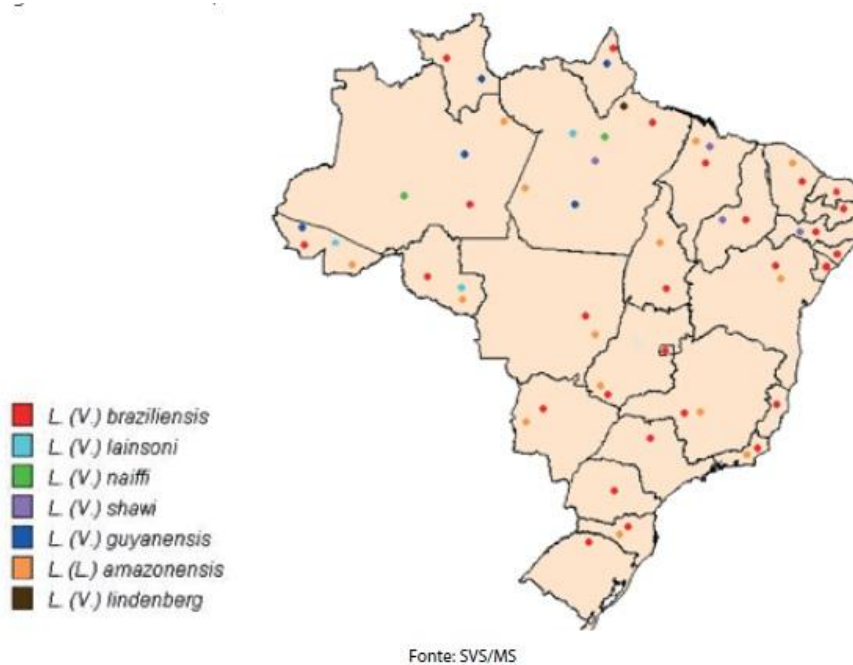


Figura 5 - Distribuição das espécies de *Leishmania* responsáveis pela leishmaniose tegumentar americana no Brasil em 2005. (Brasil, Ministério da Saúde, 2006).

1.3. Formas clínicas, diagnóstico de tratamento da leishmaniose:

O gênero *Leishmania* possui mais de 30 espécies, das quais cerca de 20 ocasionam doenças aos humanos (WHO, 2016), cujos sintomas clínicos são influenciados pelo tipo de resposta imunológica, idade e o estado nutricional do indivíduo afetado. No Brasil foram identificadas sete espécies patogênicas: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania. Viannia naiffi*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) lindenberg* (PAHO, 2017).

As leishmanioses geralmente são classificadas em duas formas clínicas principais: a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV) (Herwalt, 1999). Existe, ainda, outra classificação em cinco grupos, que se diversificam pela manifestação clínica e a localização das manifestações decorrentes da infecção por diferentes espécies do gênero *Leishmania* (Ashford, 2000):

- **Leishmaniose cutânea (LC):** apresenta-se como uma lesão única no local do repasto sanguíneo do flebotomíneo, podendo haver a formação de lesões adicionais e o aumento do tamanho da lesão. As lesões podem cicatrizar após algum tempo ou a formação das lesões ulceradas indolores, que levam à necrose do tecido (figura 6 A). Os principais agentes etiológicos desta forma clínica encontrados no Brasil são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Gontijo & de Carvalho, 2003; Marsden, 1986; Da-Cruz & Azevedo-Coutinho, 2001).

- **Leishmaniose cutânea difusa (LCD):** caracterizada pelo surgimento de um nódulo não ulcerado no local do repasto sanguíneo do flebotomíneo, seguido por múltiplos nódulos na pele que acometem várias regiões do corpo, como a face e o tronco. Em alguns casos também ocorre a manifestação clínica na mucosa (figura 6 B). Os principais agentes etiológicos desta forma clínica são: *Leishmania (Leishmania) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Brasil, Ministério da Saúde, 2006). (Convit & Kerdel-Vegas, 1965; Costa et al., 1992);

- **Leishmaniose mucocutânea (LMC):** caracterizada pelo surgimento de uma lesão no local do repasto sanguíneo do flebotomíneo, seguida do surgimento de lesões metastáticas em áreas de mucosas, como o nariz e a boca. As lesões ulceradas apresentam uma grande profundidade chegando a atingir o septo e

palato (figura 6 C). Os principais agentes etiológicos desta forma clínica são: *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Marsden, 1986; Schubach *et al.*, 1998, Da-Cruz & Azevedo-Coutinho, 2001);

- **Leishmaniose visceral (LV) ou Calazar:** caracterizada pelo surgimento da lesão no local do repasto sanguíneo do flebotomíneo, o protozoário se abriga no fígado, baço, mucosa intestinal, medula óssea e linfonodos, comprometendo o funcionamento desses órgãos. Esta é a manifestação clínica mais grave das leishmanioses, pois, quando não diagnosticada e tratada precocemente, pode causar óbito em até 90% dos casos (figura 6 D). O principal agente etiológico desta forma clínica é a *Leishmania (Leishmania) donovani* (Musa *et al.*, 2007);

- **Leishmaniose dérmica pós calazar (LDPC):** ocorrem meses ou mesmo anos após o tratamento de um quadro de leishmaniose visceral. É caracterizada pela presença de manchas ou nódulos na pele, face e tronco (figura 6 E). O agente etiológico desta forma clínica é a *Leishmania (Leishmania) donovani* (Ramesh & Mukherjee, 1995);



Figura 6 - Formas Clínicas da leishmaniose em pacientes. A - Leishmaniose Cutânea. B - Leishmaniose Difusa. C - Leishmaniose Mucocutânea. D - Leishmaniose Visceral ou Calazar. E - Leishmaniose Dérmica Pós Calazar. Brasil, Ministério da Saúde, 2007.

1.1.3. Diagnóstico e Tratamento da Leishmaniose:

O diagnóstico clínico e epidemiológico pode ser realizado se o paciente é residente de áreas endêmicas ou esteve presente em lugares onde há casos de leishmaniose, sendo este um exame complementar, onde é necessário o diagnóstico laboratorial para a confirmação. O diagnóstico por microscopia é realizado através da visualização do parasito ao microscópio óptico a partir de biópsias, esfregaços de pele ou aspirado de tecidos obtidos do paciente, onde a probabilidade de visualização do parasito é inversamente proporcional ao tempo de evolução da doença. Pode ser realizada a inoculação de material obtido por biópsias ou raspados de lesão em meios de cultura ou em animais de experimentação (Brasil, Ministério da Saúde, 2007).

A realização de testes imunológicos, como o teste da intradermoreação de Montenegro, é realizada através da obtenção de um antígeno a partir de culturas para a visualização da resposta de hipersensibilidade celular retardada, pois este teste geralmente persiste positivo após o tratamento, podendo negativar nos indivíduos com baixa resposta imunológica e nos primeiros dois meses após o surgimento da lesão. Em áreas endêmicas, este exame positivo, pode ser interpretado como leishmaniose anterior, alergia ao diluente do teste ou reação cruzada com outras doenças (doença de Chagas, esporotricose, hanseníase virchowiana, tuberculose, cromomicose, entre outras). Os testes sorológicos, como a imunofluorescência e o ensaio imuno enzimático ELISA são utilizados na detecção anticorpos *anti-Leishmania* circulantes no soro dos pacientes com títulos geralmente baixos, característico da fase crônica desta doença.

A realização de testes moleculares, como o método da PCR e a hibridização de DNA, vem sendo utilizado para fins de pesquisa, devido a sua grande sensibilidade quando comparado com os métodos parasitológicos tradicionais, porém até o momento não há nenhum kit de diagnóstico molecular sendo utilizado (Brasil, Ministério da Saúde, 2006).

De acordo com Ministério da Saúde pode-se complementar o diagnóstico clínico-epidemiológico pela intradermoreação de Montenegro positiva e pela resposta terapêutica, porém a confirmação por métodos parasitológicos é fundamental uma vez que exclui doenças que fazem diagnóstico diferencial com a LT. O diagnóstico de certeza é feito pelo encontro do parasito, ou de seus produtos

nos tecidos ou fluidos biológicos dos pacientes e pode ser feito por meio através de exames direto e indireto, como isolamento *in vitro* ou *in vivo*. Entretanto estes exames necessitam de mão de obra especializada e infraestrutura não encontrada em toda rede de saúde e por requerer procedimentos invasivos, restringe o seu uso em estudos epidemiológicos em larga escala. Estas razões fazem dos testes indiretos, como os sorológicos, de fundamental importância. Quatro testes estão disponíveis atualmente para o sorodiagnóstico: aglutinação direta, imunofluorescência indireta, ELISA e imunocromatografia. (Brasil, Ministério da Saúde 2003).

O tratamento mais recomendado para esta doença são os antimoniais pentavalentes, como o glucantime, que interferem nas vias de glicólise e na oxidação dos ácidos graxos das formas amastigotas da *Leishmania* (Brasil, Ministério da Saúde, 2007).

Os medicamentos utilizados atualmente estão associados a grandes efeitos colaterais tóxicos em células hepáticas, renal e cardíacas, ao grande custo, ao longo tempo de duração do tratamento e ao aumento da resistência do parasito a esses medicamentos. Estudos recentes demonstraram que *Leishmania donovani* pode desenvolver resistência às drogas, mesmo quando utilizados em combinação (Garcia-Hernandez et al, 2012). Portanto, apesar da existência dos quimioterápicos, dificilmente as formas de tratamento utilizadas permitirão a eliminação desta doença, e com isso, há uma grande necessidade do estudo de novos alvos. Alguns estudos sugerem como possíveis formas da produção de uma vacina: a deleção de genes relacionados à virulência; a produção de *Leishmania* geneticamente modificadas na ausência ou através da modificação de genes essenciais, e o uso de espécies de *Leishmania* não patogênicas. No entanto, os principais problemas na utilização de parasitos mortos ou modificados geneticamente são as preocupações relacionadas à segurança e a viabilidade para utilização em larga escala. Outras abordagens incluem a utilização de proteínas de superfície como antígenos candidatos a vacinas, como a vacina utilizada na veterinária, LeishTec (Kumar & Edgenda, 2014).

METABOLISMO PURINÉRGICO EM LEISHMANIA.

1.4. Purinas e Nucleotídeos Extracelulares:

As purinas possuem uma importância vital para os organismos, sendo essenciais para a síntese de nucleotídeos e ácidos nucléicos. Devido à alta taxa metabólica e de replicação apresentada pelos parasitos, estes necessitam de uma grande demanda de nucleotídeos. Os nucleotídeos podem ser sintetizados pela via da biossíntese *de novo*, que sintetiza nucleotídeos purínicos a partir de intermediários anfibólicos provenientes de reações catabólicas e anabólicas, ou a partir das bases guanina, hipoxantina e adenina. A *via alternativa*, ou comumente classificada como *via de salvação ou resgate*, utiliza componentes reciclados de nucleosídeos à nucleotídeos. Os tripanossomatídeos, como a *Leishmania*, são incapazes de realizar a biossíntese *de novo* e dependem da via de resgate para suprir suas necessidades de nucleotídeos purínicos a partir de fontes endógenas ou exógenas de purinas no hospedeiro. O transporte destas moléculas ocorre através da membrana plasmática por receptores de purina (Marr e cols, 1978).

Os nucleotídeos e os nucleosídeos extracelulares são encontrados nos tecidos devido à liberação por células. E modulam várias funções nas células, tecidos e órgãos, como a homeostase vascular, coagulação sanguínea, inflamação e resposta imune (Atkinson e cols, 2006). Eles também atuam como moléculas sinalizadoras, estimulando os receptores purinérgicos localizados na superfície celular.

Nos tecidos, os níveis de nucleotídeos tri e difosfatados são regulados por enzimas ligadas à membrana celular que hidrolisam nucleotídeos, como as NTP difosfohidrolases, impedindo a desestabilização dos receptores purinérgicos (Deaglio et al, 2007). Um desses nucleotídeos, o ATP, participa da regulação no sistema imunológico, onde as células T regulatórias apresentam receptores purinérgicos (Borsellino et al, 2007; Deaglio et al, 2007; Sansom et al, 2008). A concentração de ATP é regulada por uma NTP difosfohidrolase, que cliva o ATP em ADP e o ADP em AMP, e por uma 5' nucleotidase, que cliva o AMP em adenosina. Os parasitos do gênero *Leishmania*, também apresentam a 3' nucleotidase, que hidrolisa mononucleótidos 3' como o AMP3' a nucleosídeos, como os mononucleótidos 5' como o AMP5', que serão hidrolisados pela 5' nucleotidase

(Paletta-Silva et al, 2011). Durante o processo de apoptose, lise celular, ou quando submetidas a alguma condição patológica, as células liberam o ATP e outros nucleotídeos (Ralevic & Burnstock, 1998). Em condições de normalidade, a concentração intracelular do nucleotídeo é mais elevada que a extracelular. Porém, quando ocorre uma alta concentração de ATP no meio extracelular, o sistema imune interpreta como um “sinal perigoso” (Marques-da-Silva et al, 2008). Quando essa concentração é muito elevada, pode ocasionar a morte de algumas células (Fillippini et al, 1990). O acúmulo de adenosina extracelular é tóxico para o desenvolvimento de linfócitos, ocasionando a imunodeficiência e a ativação dos receptores P1 nas células hospedeiras, que interferem no estabelecimento da resposta imune (Marques-da-Silva et al, 2008). O produto de degradação da adenosina, a inosina, está relacionada com a resposta inflamatória pela inibição deste processo (Jijon et al, 2005).

1.5. Purinoreceptores:

Os purinoreceptores estão presentes em diversas células de mamíferos e realizam uma variedade de funções. São caracterizados como um trímero com duas hélices transmembranares por subunidade, enquanto as regiões C e N terminal estão voltadas para o meio intracelular (figura 7). Existem dois tipos de receptores purinérgicos, os receptores do tipo P1 e o do tipo P2. Os receptores P1 possuem quatro subtipos, A1, A2A, A2B e A3, que são estimulados pela adenosina, gerada pela hidrólise do ATP extracelular pela NTPDifosfohidrolase (Burnstock, 2007; Sansom et al, 2008). Os receptores P2 possuem dois subtipos, os receptores acoplados a proteína G (PY2), ou metabotrópicos, e os receptores acoplados a canais iônicos (P2X) ou ionotrópicos. Os receptores P2X são proteínas transmembranares em forma de um canal iônico que transportam diferentes íons, como o Na⁺, K⁺ (Burnstock, 2007) e são estimulados pelo ATP. Os receptores P2Y são proteínas transmembranares que possuem sete domínios hidrofóbicos acoplados à proteína G e podem ser estimulados por ATP, ADP, UTP, UDP, ITP e açúcares de nucleotídeos (Burnstock, 1972; Sansom et al, 2008).

1.6. As NTP difosfohidrolases:

As NTP difosfohidrolases hidrolisam nucleotídeos trifosfatados e difosfatados extracelulares, na presença de concentrações elevadas de cátions bivalentes, como o Ca^{+2} e o Mg^{+2} , gerando AMP e dois ânions ortofosfato (Handa & Guidotti, 1996; Robson e cols 2006; Sansom et al, 2008). Na literatura, estas enzimas apresentam diversos sinônimos, como ecto-NTPDases e apirases. Em 2001, Zimmermann propôs uma nomenclatura única para facilitar a comunicação científica, sendo então proposto a classificação para NTPDase. As NTPDases apresentam dois grupos de acordo com a sua topografia de membrana: o primeiro grupo apresenta dois domínios transmembranares, um na região amino terminal e uma região carboxi terminal, enquanto o sítio catalítico extracelular encontra-se entre esses dois domínios (Goding, 2000) (figura 8); o segundo grupo apresenta-se ancorado à membrana pela interação com um domínio hidrofóbico localizado na região amino terminal e pode conter um sinal de clivagem em sua sequência, o que permite às enzimas desse grupo apresentarem-se também na forma solúvel ou secretada (Zimmermann, 2001). A secreção dessa enzima pode ser observada em eucariotos inferiores, como no gênero *Leishmania* (Sansom et al, 2008).

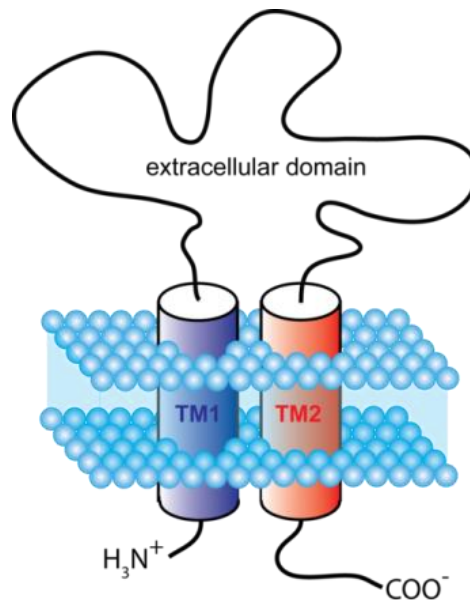


Figura 7 - Representação esquemática mostrando a topologia de membrana de uma subunidade do receptor P2X típico. O primeiro e segundo domínios transmembranares são indicados como TM1 e TM2. Figura obtida no pfam.

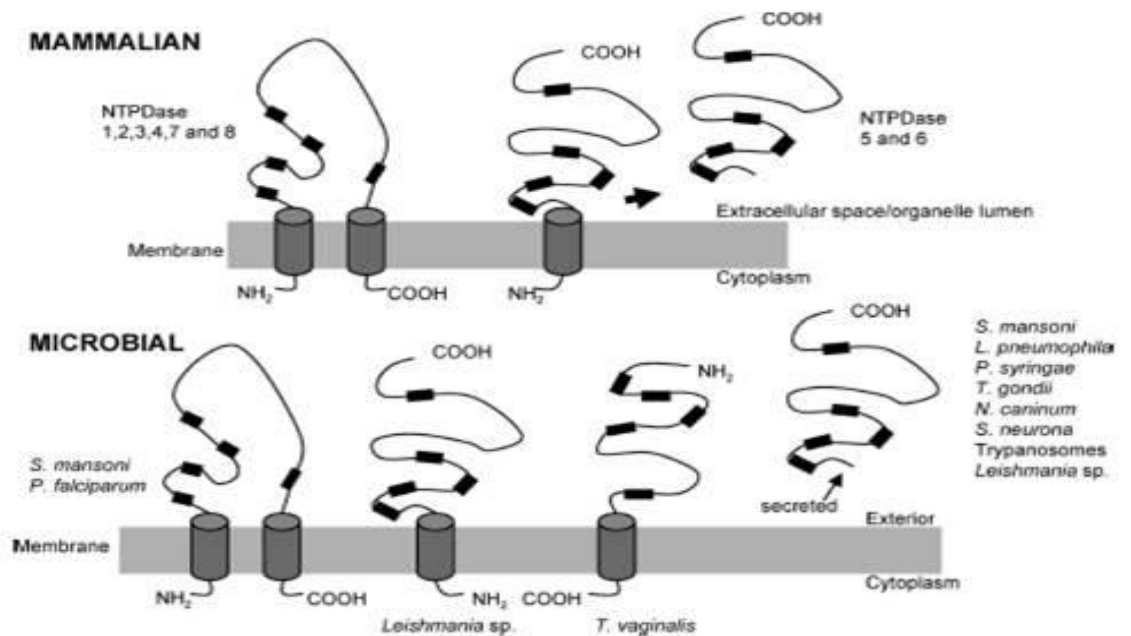


Figura 8 - Representação hipotética da NTPDases em humanos e patógenos. Cilindros representam os domínios transmembranares e os retângulos pretos representam as ACRs 1-5. (Sansom 2008).

As NTPDifosfohidrolases foram identificadas em 7 espécies do gênero *Leishmania*: *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) infantum*, *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Viannia) panamensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*. Em humanos, estudos experimentais sobre a NTPdase mostraram que a NTPDase-1 hidrolisa nucleotídeos trifosfatados e difosfatados em proporções iguais, enquanto a NTPDase-2, apresenta uma preferência por nucleotídeos trifosfatados (Robson e cols, 2006). Acredita-se que a influência sobre as propriedades catalíticas destes subtipos da enzima seja relativa a diferenças em sua estrutura tridimensional.

Todos os membros das NTPDases são classificados como apirases por apresentarem cinco ACRs, que são regiões compostas por curtas sequências de aminoácidos contendo resíduos essenciais para a função da enzima (Handa e Guidotti, 1996). A NTP difosfohidrolase já foi identificada em diversos organismos, como o *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Neosporum caninum*, *Sarcocystis neurona*, *Schistosoma mansoni*, *Trichomonas vaginalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas syringae* e *Pseudoalteromonas atlântica*, *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* (Sansom et al 2011).

1.7. Função das NTPDases em microrganismos:

As funções das NTPDases ainda não são totalmente conhecidas, sendo alvos de diversos estudos em diferentes organismos. Acredita-se que estas enzimas estejam relacionadas com a adesão celular, resgate de purinas, proteção contra os efeitos citolíticos, transdução de sinal, regulação da coagulação sanguínea, modulação do processo inflamatório e da resposta imune. Em humanos, a NTPDase mais estudada, a CD39, está presente nos endotélios. Esta enzima desempenha um importante papel na modulação inflamatória e na resposta imune através da concentração extracelular de nucleotídeos, como o ATP. Este nucleotídeo desempenha um papel de imunoestimulador do sistema imune, por meio da estimulação dos receptores P2 presentes em células do sistema imune e não imune

(Sansom *et al*, 2008). Durante as inflamações agudas, o aumento da atividade de CD39 ocasiona a diminuição da concentração de ATP extracelular, e com isso, há um aumento da ativação dos receptores P2 para estimular as defesas do hospedeiro (Robson *et al*, 2006; Sansom *et al*, 2008). Em células T regulatórias ativadas, verificou-se que a CD39 é altamente expressa e a atividade estaria relacionada com a inibição da liberação de interleucina 1 pelas células endoteliais e na diminuição da ativação de células dendríticas, portanto, a CD39 participa da modulação da imunossupressão. (Atkinson *et al*, 2006; Enyoji *et al*, 1999; Sansom *et al*, 2008).

Em 2000, Barros *et al*, mostraram que a *Entamoeba histolytica* patogênica possui uma maior atividade ecto-ATPDásica dependente de Mg⁺² que a forma não patogênica ou de vida livre. A atividade desta enzima é estimulada por mais que o dobro por D-Galactose, sendo este envolvido na adesão da *Entamoeba histolytica*, propondo que esta enzima esteja envolvida na patogenicidade desta espécie.

Em *Acanthamoeba*, foi demonstrado que o aumento da atividade da NTPDase está associadas às formas virulentas, sugerindo um papel desta enzima em interações parasito/hospedeiro. Este protozoário interage com as células endoteliais através de uma proteína de ligação à manose, a alfa-manose, que estimula a atividade da NTPDase, permitindo uma maior adesão ao hospedeiro. Esta adesão é diminuída pela inibição da atividade enzimática por suramina (Papanikolaou *et al*, 2005; Sansom *et al*, 2008).

Em *Trichomonas vaginalis*, a atividade da NTPDase é estimulada em 90% por D-Galactose, a qual está envolvida no processo de adesão às células hospedeiras, o que sugere que esta enzima pode desempenhar um papel na adesão. Neste estudo houve a comparação da atividade ecto-ATPDásica de *Trichomonas vaginalis* isolados de pacientes ou cultivadas em meio artificial, sendo a maior atividade encontrada nos parasitos isolados de pacientes, sugerindo um possível papel desta enzima na virulência (De Jesus *e cols*, 2002; Sansom *et al*, 2008).

Em *Toxoplasma gondii*, identificou-se que cepas avirulentas expressam apenas a NTPDase-2, enquanto cepas virulentas expressam a NTPDase-1 e a NTPDase-2 (Nakaar *et al*, 1998). Ao comparar a expressão da NTPDase-3 em taquizoítos e de bradizoítos dormentes de *T. gondii*, verificou-se que somente na forma de bradizoítos a NTPDase-3 é expressa, concluindo que esta enzima está envolvida na infecção crônica do hospedeiro (Nakaar *et al*, 1998). Em 2001, Kikuchi & Kojima, demonstraram que ao utilizar um anticorpo monoclonal que reconhece e

inibe as NTPDases houve uma diminuição da invasão deste protozoário em cultura de células Vero, sugerindo uma importância da atividade desta enzima na infecção.

Em *Schistosoma mansoni*, foram identificadas duas NTPDases, a NTPDase-1, localizada na superfície, e a NTPDase-2, secretada pelo parasito (DeMarco e cols, 2003; Sansom *et al* 2008). Em 1993, observou-se que a atividade de ADPásica impedia o recrutamento e a agregação de plaquetas do hospedeiro, possibilitando uma maior infecção pela inibição do sistema hemostático (Vasconcelos *et al*, 1993).

No *Trypanosoma cruzi*, a atividade enzimática da NTPDase em tripomastigota metacíclico apresentou-se 20 vezes maior do que na forma epimastigota (Bissagio e cols, 2003; Samson *et al*, 2008). No mesmo estudo, foi demonstrado que durante uma infecção *in vitro* de *T. cruzi* em macrófagos peritoniais na presença de qualquer inibidor da NTPDase, ocorre uma redução do número de parasitos que conseguem infectar este tipo celular, e quando o ATP é adicionado há aproximadamente 30% mais macrófagos infectados pelo parasito. Em *Trypanosoma brucei*, a atividade ecto-NTPDásica foi caracterizada como dependente de $MgCl_2$ ou $MnCl_2$ e modulada pela quantidade de purinas presentes no meio (de Souza *et al*, 2007), indicando que esta enzima pode ter um papel importante na aquisição de purinas do meio extracelular em culturas do parasito. Em 2006, Fonseca *et al* demonstrou uma atividade ecto-NTPDase dependente de Mg^{2+} em *Trypanosoma rangeli* e observou que esta atividade é estimulada por carboidratos, sugerindo que a atividade das NTPDases possa ter um papel na adesão deste parasito no intestino do hospedeiro invertebrado.

Em formas promastigotas virulentas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, a atividade ecto-ATPásica dependente de Mg^{+2} apresentou-se duas vezes maior do que nas formas promastigotas avirulentas (Berrêdo-Pinho *et al*, 2001). Em 2010, De Souza *et al*, avaliaram as atividades ecto-NTPDásicas em cepas virulentas e avirulentas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, observando a correlação entre as atividades ecto-nucleotídicas e a virulência do parasito, bem como a resposta imune associada à infecção por estes parasitos. Observou-se que as cepas mais virulentas apresentavam maior atividade ecto-nucleotídica e desencadeava menor resposta imune do hospedeiro vertebrado, o que facilitava a infecção. Ambos os fenômenos estariam relacionados à diminuição dos níveis de ATP no meio extracelular produzida pelas ecto-nucleotidases. Em 2006, Pinheiro *et al* analisaram a atividade ecto-ATPásica em *Leishmania*

(Leishmania) amazonensis durante as fases do crescimento, demonstrando ser mais elevada no final da fase logarítmica e observou-se também que esta atividade é aproximadamente 10 vezes maior na forma amastigota do que na forma promastigota.

Em 2011, Ennes-Vidal e cols, utilizou um inibidor reversível da atividade da ecto-ATPase, CrATP, para investigar o papel destas enzimas na infecção de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. Observou-se que a inibição da atividade da ecto-ATPase por CrATP diminui significativamente os índices endocítico e de adesão na interação promastigotas/macrófago. Além disso, quando o composto foi adicionado durante o cultivo de formas promastigotas, houve a inibição do crescimento celular, sugerindo a importância destas enzimas na infectividade e sobrevivência do parasito.

Em um estudo recente, Sansom 2014, produziu mutantes *null* de *L. major* para a LmNTPDase-1 e a LmNTPDase-2 a fim de avaliar o papel desta enzima durante uma infecção em camundongos BALB/c. O parasito mutante para a LmNTPDase-1 demonstrou um atraso no desenvolvimento da lesão, enquanto que o mutante para a LmNTPDase-2 não apresentou diferença na sua virulência.

Neste estudo, pretende-se contribuir com conhecimento a respeito do papel específico da NTPDase-1 na infectividade de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Para isso, foi realizada a clonagem e sequenciamento da LaNTPDase-1 e caracterização molecular da proteína. Foi realizada também a análise comparativa da expressão da LaNTPDase-1 entre diferentes isolados e diferentes formas evolutivas do parasito, para investigar a correlação com a infectividade do parasito.

1.8. Justificativa:

Ainda não existe uma quimioterapia segura para o tratamento da leishmaniose. Os medicamentos utilizados atualmente para esta doença apresentam diversos efeitos colaterais, alto custo, longo tempo de tratamento e possuem efeito abortivo (Kumar et al, 2014).

Devido às limitações do tratamento atual, a leishmaniose representa ainda hoje, um sério problema na saúde pública em várias partes do mundo. Nesse sentido, a busca de novos quimioterápicos para o tratamento desta doença ainda é

um grande desafio para os pesquisadores visto que os parasitos acabam desenvolvendo também, através de vários mecanismos, resistência aos quimioterápicos mais utilizados (Kumar *et al*, 2014).

Atualmente não existe nenhuma vacina efetiva contra a leishmaniose, apesar de existirem vários candidatos, ainda não foi demonstrada sua eficácia em humanos. Nesse sentido, têm-se aumentado o interesse por alvos bioquímicos das vias metabólicas da *Leishmania*, que possam responder a ação dos fármacos de forma mais vulnerável e que reduza possíveis efeitos colaterais ao hospedeiro. Dentre os alvos estudados estão as cisteíno-proteases, a glicoproteína 63, a proteína de membrana do kinetoplastídeo 11, o ativador da cinase C, a hidrolase de nucleosídeo 36, a origem de replicação, a peroxidase de tiparedoxina e o antígeno de superfície 2 de promastigotas.

A compreensão do papel das nucleotidases em tripanossomatídeos patogênicos ainda não foi completamente elucidada. Entretanto, existem fortes evidências de que elas estejam relacionadas à infectividade e virulência nos tripanossomatídeos, principalmente devido à sua contribuição na modulação da sinalização purinérgica durante a infecção. Do ponto de vista farmacológico, estas enzimas possuem uma grande vantagem por estarem localizadas na face externa da membrana plasmática do parasito, facilitando o acesso de um fármaco até elas, aumentando seu potencial como alvo a ser estudado para a quimioterapia.

2. OBJETIVO:

2.1. Objetivo Geral:

Este estudo visa a caracterização molecular da NTPDase-1 da *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, bem como analisar a modulação da expressão do gene desta enzima nas formas evolutivas e em dois isolados deste parasito.

2.2. Objetivos Específicos

1. Amplificar a região gênica completa, codificante da NTPDase-1 *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.
2. Comparar as sequências obtidas com as dos genes correspondentes à NTPDase-1 e NTPDase-2 de outras espécies do gênero *Leishmania* existentes nos bancos de dados públicos.
3. Realizar expressão heteróloga da LaNTPDase-1 *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em *Escherichia coli*.
4. Avaliar a expressão gênica da LaNTPDase-1 nas formas morfológicas e em dois isolados deste parasito: MHOM/BR/1977/LTB0016 e IFLA/BR/1967/PH8
5. Caracterizar o perfil biológico *in vitro* dos isolados MHOM/BR/1977/LTB0016 e IFLA/BR/1967/PH8 e correlacionar com a expressão gênica da LaNTPDase-1.

3. Materiais e Métodos:

3.1. Reagentes:

Acumedia (Sao Paulo): LB Broth, Miller (Luria-Bertani).

BioRad Laboratories (Califórnia, EUA): Membrana de nitrocelulose e β -mercaptoetanol.

Caltag Laboratories, (Califórnia, EUA): agarose.

Kodak (Nova Iorque, EUA): Revelador e Fixador (ECL).

Merck: Clorofórmio.

Pierce Chemical Co. (Dallas, EUA): marcador de peso molecular para eletroforese de proteínas (Prestained Protein Ladder)

Promega (São Paulo): kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System, GoTaq® Green Master Mix, kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System.

Santa Cruz Biotechnology (Texas, USA): Western Blotting Luminol Reagent.

Thermofisher (São Paulo, Brasil): Soro Fetal Bovino (Gibco), Proteinase K (Fungal) (10mg/ml), TRizol, kit Superscript III, Single Strand DNA – ssDNA kit, 10x Taq Platinum buffer, 0,2 mM dNTP, 4 mM MgCl₂, 1,25U de Taq Platinum DNA polymerase, água tratada com DEPC, kit TOPO TA Cloning, células quimicamente competentes DH5 α -T1, *Kanamycin Sulphate* 100X (canamicina), kit PureLink Quick Plasmid Miniprep, EcoRI (10 U/ μ L), kit pBAD TOPO TA Expression, Master Mix Power SYBR Green 2x.

Sigma Aldrich (St Louis, MO, EUA): meio Schneider; Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM); Etanol 96-100%, Isopropanol, kit DNase I, *Monoclonal Anti-polyHistidine antibody produced in mouse* (anti-histidina), RPMI 1640, Penicillin G sodium, Streptomycin sulfate salt, Azul de Trypan, Tris HCl, Sulfato de dodecyl de sódio (SDS), Glicerol, Azul de bromofenol, Comassie blue R-250, Persulfato de amônio (APS), Ponceau S, Triton X-100 (TX-100), Tween 20.

QIAGEN (São Paulo, Brasil): QIAamp DNA mini kit; kit RNeasy.

3.2. Animais:

Foram utilizados camundongos machos com 4 a 8 semanas de vida da linhagem BALB/c, obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (ICTB/Fiocruz). Todos os protocolos utilizados neste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fiocruz (ICTB/Fiocruz) – licença L-052/2015.

3.3. Cultivo de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*:

3.3.1. Parasitos utilizados e manutenção *in vitro* em laboratório

Neste estudo foram utilizadas duas cepas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/1977/LTB0016 e IFLA/BR/1967/PH8) que foram cedidas pela Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC). Todas as cepas utilizadas neste estudo foram obtidas após passagem em BALB/c.

O cultivo de *Leishmania* sp. para a curva de crescimento foi realizado utilizando frascos de cultura de 75 cm² contendo 50 mL de meio Schneider suplementado com 10% de SFB termodesativado a 56°C por 30 minutos e 1% de urina humana filtrada. Foram cultivados 6 frascos de cultura de 75 cm² ajustando-se a concentração inicial para 10⁶ parasitos/mL, a cada dia, uma garrafa era recolhida e centrifugada a 3000xg por 10 minutos a 4°C e contadas utilizando a câmara de Neubauer. Este procedimento foi realizado com as duas cepas em estudo. As amostras foram cultivadas a 26°C.

3.3.2. Manutenção *in vivo* dos parasitos e obtenção de amastigotas

Para a infecção de BALB/c com as cepas em estudo, uma suspensão de formas promastigotas em PBS, foi inoculada (concentração de 5 x 10⁷/mL) por via subcutânea no coxim plantar das patas posteriores de 10 camundongos (adultas fêmeas). Ao longo da infecção, os animais foram alojados em gaiolas com comida e água *ad libitum*. Os animais foram observados semanalmente e eutanasiados por

indução em câmara de CO₂ para retirada das lesões e isolamento das formas promastigotas, conforme descrito por Cysne-Filkenstein e cols. 1998,

As lesões foram retiradas assepticamente. O tecido foi colocado em um tubo para centrifugação de 50 mL contendo meio Schneider. O tecido foi macerado utilizando um triturador de tecidos automático. O homogeneizado foi transferido para um tubo de centrífuga e centrifugado a 1000 xg por 5 minutos a 4°C. O sedimento contendo eritrócitos e outras células foram descartadas e o sobrenadante foi centrifugado a 3000xg por 5 minutos a 4°C para obtenção do pellet contendo amastigotas. Em uma garrafa de cultura, o pellet foi ressuspensão em meio Schneider e adicionou-se 10% de SFB termodesativado. As amostras foram mantidas em estufa a 26°C.

3.3.3. Estratégia para diferenciação dos promastigotas e amastigotas *in vitro*:

Para a obtenção das formas amastigotas axênicas, foram cultivados 2,5x10⁵ células/mL e 5x10⁵ células/mL de formas promastigotas em dois frascos de cultura de 25 cm² contendo 5 mL de meio Schneider pH 5,5 suplementado com 20% (v/v) de SFB termodesativado e 1% de urina humana filtrada por três dias a 26°C. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 1000xg por três vezes, ressuspensas em PBS e contadas utilizando a câmara de Neubauer. As mesmas concentrações de células foram cultivadas em dois frascos de cultura de 25 cm² contendo 5 mL de meio Schneider pH 5,5 suplementado com 20% (v/v) de SFB termodesativado e 1% de urina humana filtrada por quatro dias a 32°C.

3.3.4. Obtenção de *in vitro* das formas amastigotas de macrófagos:

As formas amastigotas de macrófago foram obtidas através de infecção experimental em cultura de macrófagos da linhagem J774-G8, cedidas gentilmente pelo Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia. A interação *Leishmania*-macrófagos foi realizada através do plaqueamento de 10⁵ células/mL em placas de cultivo celular de 6 poços mantidos por 2 horas a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. As células não aderidas foram coletadas através da retirada do sobrenadante e lavadas

com PBS. Para a infecção dos macrófagos J774 com as cepas em estudo, uma suspensão de formas promastigotas em DEMEM suplementado com 10% (v/v) de SFB, foi adicionada (concentração de 5×10^5 /mL) nos 6 poços da placa de cultivo e mantidos por 24 horas a 37°C, em atmosfera de CO₂ 5%. As formas amastigotas foram coletadas no sobrenadante após as placas serem mantidas a 27°C por 24 horas.

3.4. Extração de ácidos nucléicos e síntese de cDNA:

DNA e RNA foram extraídos de formas promastigotas, amastigotas axênicas, amastigotas de macrófagos e amastigotas de lesão de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

O DNA foi extraído a partir de 10^8 células utilizando o QIAamp DNA mini kit, seguindo as instruções do fabricante, sendo alterado somente, a adição de . 20µL de proteinase K (10mg/ml) em 200µL ao lisado de células e mantido a 56°C por 30 minutos antes da extração. As amostras foram armazenadas em eppendorf de 1,5 mL a -20°C até o momento da sua utilização.

O RNA foi extraído a partir de 10^8 células, utilizando 1mL do reagente TRizol e o kit RNeasy. Inicialmente a proteinase K (10 mg/ml) foi pré aquecida por 10 minutos a 37 °C e foi adicionado 40 uL ao lisado de células e mantido a 56°C por 30 minutos para a desnaturação de RNases. As amostras foram mantidas a 25°C por 5 minutos, para que houvesse a dissociação do complexo nucleoprotéico. Em seguida, foram adicionados 200 µl de clorofórmio e mantidos 25°C por 5 minutos. Centrifugou-se a 10000 xg por 18 minutos a 4°C. O sobrenadante (fase aquosa superior) foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL, no qual foram adicionados 600 µL de isopropanol. Posteriormente, 700 µL da amostra foi transferido para uma coluna RNeasy, previamente acoplada a um tubo coletor de 2 mL e centrifugado a 6000 xg por 30 segundos. Após a centrifugação, foram adicionados 700 µL do tampão RW1 à coluna e centrifugado a 6000 xg por 30 segundos para lavar a coluna. Em seguida, foram adicionados 500 µL de tampão RPE à coluna e centrifugado a 6000 xg por 30 segundos, sendo este processo repetido com a centrifugação de 6000 xg por 2 minutos. As amostras foram eluídas com a adição de 30 µL de Nuclease-free water à coluna e centrifugado a 6000 xg por 1 minuto. As

amostras foram armazenadas em eppendorf de 1,5 mL a -70°C até o momento da sua utilização.

Todas as etapas de incubação foram realizadas em banho-seco modelo K-30 (Lab1000). O rendimento de ácidos nucleicos e a pureza foram estimados através de espectrofotometria em 230/260/280nm, usando o Pico 200 Spectrophotometer (Picodrop).

O RNA foi tratado utilizando o kit DNase I em um volume final de reação de 12 µL. Inicialmente foram misturados 5µg de RNA em solução aquosa com 1µL Buffer 10x, 2µL de DNase I 1unit/µL e mantidos por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 1 µL de solução STOP (EDTA) para quelar os ions Cálcio e Magnésio e para inativar a DNase I e aquecido a 70 °C por 10 minutos no thermoblock para desnaturar tanto a DNase I quanto o RNA.

O cDNA foi sintetizado em um volume final de reação de 20 µL, a partir de do RNA, previamente tratado utilizando o kit Superscript III. Inicialmente foi feito o mix RNA/Primer, composto por 5µg de RNA em solução aquosa com 50 µM de Oligo (dT)20 e 10 mM de mistura dNTP, sendo aquecido no thermoblock a 65 °C por 5 minutos. Em seguida, foi feito o mix de síntese de cDNA, composto por 10X RT buffer, 25mM de MgCl₂, 0,1M de DTT, 40 U/µL de RNaseOUT e 200 U/µL Superscript III RT. Esta mistura foi pré aquecida no thermoblock a 55°C por 2 minutos e adicionada ao mix RNA/Primer, sendo mantida no thermoblock a 50 °C por 50 minutos. Após essa etapa, a mistura foi mantida no thermoblock 85 °C por 5 minutos, seguida da adição 1 µL de RNase H e mantido a 20 minutos a 37 °C. Como controle negativo, em paralelo, a transcrição reversa foi realizada na ausência de enzima transcriptase reversa (controle MOCK). A quantificação do cDNA foi realizada através de fluorescência, utilizando o Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies), com o kit para ssDNA (Single Strand DNA).

3.5. Construção dos oligonucleotídeos e PCR Convencional:

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram desenhados pares de oligonucleotídeos para a amplificação, separadamente, da porção central, inicial e terminal do CDS correspondente ao gene da NTPDase-1 (Tabela 1), desenhados a partir do alinhamento das sequências de NTPDases-1 de *Leishmania (Leishmania)*

major (GI: 157866723), *Leishmania (Leishmania) infantum* (GI: 146081774) e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (GI: 154334409) pelo software BLAST (Altschul e cols 1990). A estratégia para as ampliações das distintas regiões e posterior montagem da sequência completa do CDS correspondente ao gene NTPDase-1 de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* é apresentada na figura 9. Em paralelo, um par de oligonucleotídeos para o gene alfa tubulina de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Pereira *et al.*, 2012) foi utilizado como controle interno da reação de PCR. Como controle negativo da reação (branco), foram adicionados os reagentes da PCR na ausência do DNA e do cDNA, e o volume foi completado com água.

As PCRs foram realizadas no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) em um volume final de 50µL, contendo 5 µL de DNA ou cDNA de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, 5 µL de 10x Taq Platinum buffer, 0,2 mM dNTP, 4 mM MgCl₂, 1,25 U de Taq Platinum DNA polymerase e 300nM de cada oligonucleotídeo. As condições da PCR foram: 94 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 63 °C por 1 min e 72 °C por 1 min 30 s, com a extensão adicional de 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram visualizados em um gel de agarose 1% (p/v) e os que apresentaram uma única banda de 1086, 462 e 424bp foram selecionados para a clonagem.

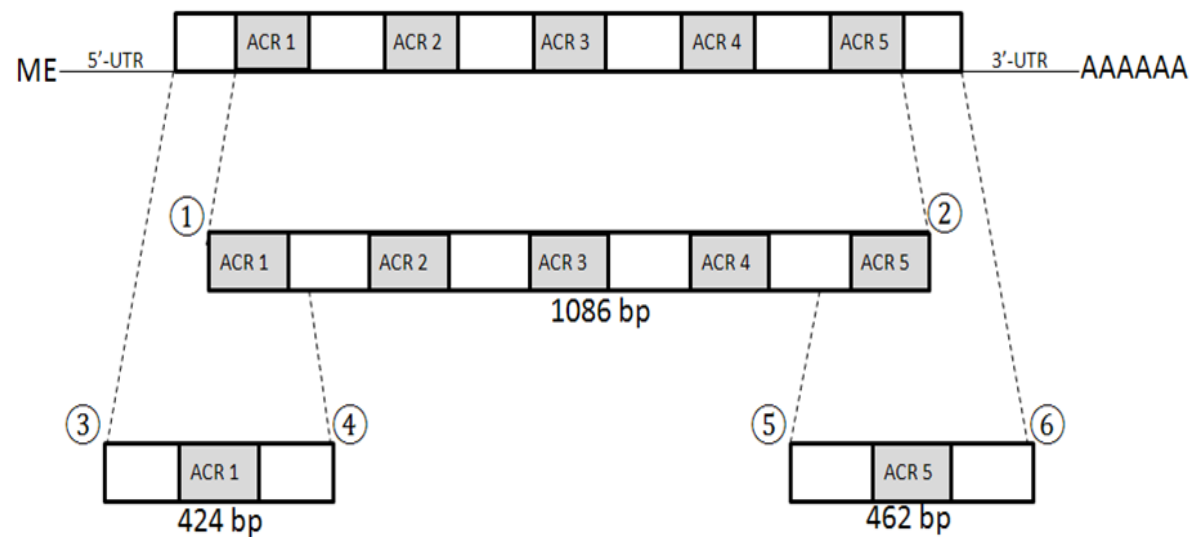


Figura 9 - Esquema dos oligonucleotídeos desenhados para amplificar o gene da NTPDases em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. 1-2: Amplificação da região ACR, 3-4: Amplificação da região inicial do CDS, 5-6: Amplificação da região final do CDS.

3.6. Clonagem e sequenciamento do gene LaNTPDase:

Os três produtos obtidos através da RT-PCR foram purificados utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System. As bandas foram retiradas e pesadas utilizando uma balança analítica (M124A - Bell Photonics). Em seguida, foram adicionados membrane binding solution na razão de 10 µL de solução para cada 10 mg de gel de agarose e mantido a 65°C por 10 minutos. Posteriormente, a amostra foi transferida para a minicoluna SV, previamente acoplada a um tubo coletor de 2 mL e centrifugado a 3000 xg por 1 minuto. Após a centrifugação, foram adicionados 700 µL da solução Membrane wash solution à coluna e centrifugado a 3000 xg por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 500 µL de da mesma solução à coluna e centrifugado a 3000 xg por 5 minutos, sendo este processo repetido com a centrifugação de 3000 xg por 1 minuto. As amostras foram eluídas com a adição de 25 µL de tampão de Nuclease-free water à coluna e centrifugado a 3000 xg por 1 minuto. As amostras foram armazenadas em eppendorf de 1,5 mL a -4°C até o momento da sua utilização.

A clonagem foi realizada utilizando o kit TOPO TA Cloning, onde 3 µL do produto purificado foi ligado ao vetor pCR 4-TOPO, seguindo as instruções do fabricante. As células quimicamente competentes DH5α-T1, foram transformadas por diferença de temperatura (“choque térmico”) e os clones foram cultivados em meio S.O.C (Invitrogen) no homogenizador shaker a 100xg, overnight. As células transformadas foram plaqueadas em placas de Petri contendo LB ágar (Luria-Bertani) na presença de 50µg/mL de canamicina a 37°C, overnight.

As colônias foram isoladas e cultivadas em meio LB (Luria-Bertani) na presença de 50µg/mL de canamicina no shaker a 37°C, overnight. O DNA Plasmidial foi purificado utilizando o kit PureLink Quick Plasmid Miniprep seguindo as instruções do fabricante, a partir do precipitado das culturas das bactérias. A eficiência de clonagem foi confirmada pela digestão do plasmídeo purificado com a enzima EcoRI, seguida pela visualização da eletroforese em um gel de agarose 0,8% observando as bandas correspondentes ao inserto e ao plasmídeo.

Dez clones positivos contendo DNA plasmidial com insertos de 1086, 424 e 462pb foram selecionados para o sequenciamento de DNA em um sequenciador de automatizado Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer, da Plataforma de

Sequenciamento de DNA (PDTIS-Fiocruz) utilizando o kit ABI PRISM BigDye® Terminator 146 v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division), seguindo as instruções do fabricante e utilizando 3,2pmol dos oligonucleotídeos (Forward e Reverse) utilizados neste projeto.

3.7. Estudos *in silico*:

3.7.1. Análise comparativa entre sequências de primária da LaNTPDase;

A sequência de aminoácidos predita obtida da NTPDase-1 de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (AFJ75402.2) foi alinhada com as sequências correspondentes das NTPDases-1, utilizando o software MEGA 4.0 e o BLAST (Altschul e cols 1990). As sequências das NTPDases-1 utilizadas foram: *Leishmania (Leishmania) mexicana* (CBZ25018), *Leishmania (Leishmania) infantum* (XP_001464341.1), *Leishmania (Leishmania) donovani* (CBZ32820), *Leishmania (Leishmania) major* (XP_001681917.1), *Leishmania (Viannia) braziliensis* (XP_001562178.1), *Rattus norvegicus* (NP_955426.1), *Homo sapiens* (NP001767))

Para a construção do dendograma, a sequência predita de aminoácidos da NTPDase-1 de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (AFJ75402.2) foi alinhada com as sequências correspondentes das NTPDases-1 utilizadas anteriormente e das NTPDases-2 de outras espécies de *Leishmania* e de humano. As sequências foram alinhadas utilizando o programa Clustal X e uma árvore filogenética foram construídas utilizando o software MEGA 4.0 e o algoritmo Neighbor-Joining, usando 1,000 repetições de bootstrap. As sequências das NTPDases-2 utilizadas foram: *Leishmania (Leishmania) mexicana* (CBZ24328), *Leishmania (Leishmania) infantum* (XP_001463665.1), *Leishmania (Leishmania) donovani* (CBZ32136), *Leishmania (Leishmania) major* (XP_001681345.1), *Leishmania (Viannia) braziliensis* (XP_001562788.1), *Homo sapiens* (NP001237)).

3.7.2. Construção do modelo tridimensional da LaNTPDase:

A sequência de aminoácidos da LaNTPDase-1 foi submetido no banco de dados PDB (base de dados de proteína), a comparação das estruturas secundárias da proteína foi realizado através da comparação pelo BLAST e pelo servidor Hhpred. A modelagem comparativa foi construída pelo programa v.9.4 MODELER usando o alinhamento múltiplo de sequências das NTPDases-1 de *Rattus norvegicus* (3ZX3.pdb) e de *Legionella pneumophila* (4BRA.pdb) como modelos. O domínio de hélice transmembranar foi previsto utilizando TMHMM. A partir de 50 modelos resultantes, o mais adequado foi selecionado, com base na função de densidade baixa probabilidade (PDF) de energia total e a orientação adequada das ACRs foram escolhidas para o processo de refinamento. O modelo final foi avaliado pela pontuação do VERIFY3D e ERRAT, através da análise estrutural e servidor de verificação (SAVES). A validação do modelo em determinado ambiente 3D foi verificada por Verify Protein (Profiles-3D). O software PyMOL foi utilizado para localizar as ACRs entre o modelo selecionado e estruturas cristalizadas da NTPDase-1.

3.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio:

Os ensaios de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE) foram realizados em condições desnaturantes. As amostras de proteínas foram previamente tratadas com tampão de amostra (80mM Tris HCl pH 6.8, 2% SDS (p/v), 12% de glicerol (v/v), 5% β -mercaptoetanol (v/v) e 0,05% azul de bromofenol (p/v) e fervidas por 10 minutos a 100°C.

3.9. Análise por Western Blotting e Dot Blot:

A proteína recombinante (10 μ L) foi analisada por SDS-PAGE. Após a eletroforese a 100V a 10mA o gel de poliacrilamida foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (0.2 μ m). A proteína recombinante foi analisada por dot blot (20 μ L) utilizando o The 96-well Bio-Dot (BioRad) com uma membrana de nitrocelulose (0.2 μ m).

Após a confirmação da transferência das proteínas com solução de Ponceau S (0,1% de Ponceau S e 0,1% (v/v) de ácido acético), as membranas foram lavadas com água corrente e incubadas *overnight* a 4°C em solução de PBS acrescido de 0,5% de Tween 20 (PBS-T) e 5% (p/v) de leite desnatado em pó (molico). Em seguida, as membranas foram incubadas a 4°C por 2 horas com o anticorpo anti-cauda de histinida produzido em camundongo (1:5000) em PBS-T e lavadas (3 vezes por 5 minutos) com PBS-T e incubadas a 4°C por 2 horas com o anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (1:1000) em PBS-T. Posteriormente as membranas foram lavadas (3 vezes por 5 minutos) com PBS-T e o complexo imune formado foi revelado por quimioluminescência, usando ECL.

3.10. Expressão heteróloga da NTPDase-1:

A região correspondente ao CDS da LaNTPDase-1 foi amplificada por PCR, utilizando os oligonucleotídeos apresentados na (Tabela 2). A PCR foi realizada no termociclador Verity (Applied Biosystems) em um volume final de 50µL, contendo 5 µL de cDNA de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, 25µL Go Taq Green 2x e 200nM de cada oligonucleotídeo. As condições da PCR foram: 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos, com a extensão adicional de 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System.

A clonagem foi realizada utilizando o kit pBAD TOPO TA Expression, o produto purificado foi ligado no vetor pBAD-TOPO, conforme instruções do fabricante. As células quimicamente competentes (TOP10) foram transformadas por choque térmico e os clones serão cultivados em meio S.O.C, sob agitação a 200RPM, *overnight* a 37°C. As células transformadas foram plaqueadas em placas de Petri contendo LB ágar (Luria-Bertani) na presença de 100µg/mL de ampicilina, a 37°C, *overnight*. As colônias positivas foram isoladas e cultivadas em meio LB (Luria-Bertani) líquido, na presença de 100µg/mL de ampicilina. Para avaliar a expressão da LaNTPDase-1 recombinante em nível de proteína nos clones positivos, foram realizados western blots utilizando o anticorpo anti-histidina, de acordo com a orientação do fabricante.

3.11. Avaliação da expressão da LaNTPDase-1:

A expressão da LaNTPDase-1 foi realizada através de quantificação relativa por PCR em Tempo Real, utilizando o fluoróforo SYBR Green. Os oligonucleotídeos utilizados para esses ensaios estão representados na tabela 3. A PCR foi realizada no termociclador Viia 7 (Life Technologies, EUA), na Plataforma Fiocruz de PCR em Tempo Real RPT-09A em um volume final de 20µL, contendo 2 µL de cDNA de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, 10µL de Master Mix Power SYBR Green 2x e 300nM de cada oligonucleotídeo. As condições da PCR foram: 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 63°C por 1 minuto.

A quantidade relativa de produtos amplificados foi calculada pelo método de Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$) (Livak & Schmittgen, 2001) e os resultados foram expressos como Fold Change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). As amostras foram normalizados pelos 2 genes endógenos apresentados na tabela 3, sendo a amostra de referência da curva de crescimento a amostra do primeiro dia, na análise das formas evolutivas, a amostra de referência utilizada foi a promastigota.

3.12. Ensaios de interação *Leishmania*-Macrófagos:

A interação *Leishmania* e macrófagos foi realizada utilizando macrófago peritonais de camundongos BALB/c obtidos a partir do lavado peritoneal com 5 mL de meio RPMI 1640, suplementado com 200 UI/mL de penicilina e 200 µg/mL de estreptomicina, mantido em banho de gelo. O lavado peritoneal dos animais foi centrifugado a 1800 g por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensão em meio RPMI 1640, sem soro fetal bovino. As células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando como corante azul de tripan a 0,1% em solução tamponada com fosfatos, sendo ajustadas para uma concentração de 8×10^5 /mL.

Para determinação da taxa de infecção de macrófagos, o cultivo dos mesmos foi feito em placas de 24 poços com lamínulas redondas. Foi adicionado à placa meio RPMI 1640 com 10% de SFB e as células foram mantidas em estufa a 37°C, atmosfera de 5% de CO₂, por duas horas. Após esse período, as placas de cultura foram lavadas com PBS a 37°C para retirar as células não aderentes. Promastigotas recém isoladas de lesão cutânea de camundongos (cepas

MHOM/BR/1977/LTB0016 e IFLA/BR/1967/PH8), e em fase estacionária de cultivo, foram coletados e lavados em PBS, (24×10^5 cells/mL) e adicionados à cultura de macrófagos (na proporção *Leishmania*:macrófago de 3:1. Após 2 horas de interação, os parasitos não internalizados foram removidos por lavagem com PBS e incubada com DEMEM contendo 10% de SFB. Para posterior quantificação da infecção por microscopia ótica, as lâminas dos tempos de infecção de 2 e 24 horas foram lavadas em PBS a 37°C, fixadas e coradas com o kit pnótico.

Após a coloração, o número de amastigotas no interior dos macrófagos foi quantificado por observação através de microscopia ótica (100x, Axioskop, Carl Zeiss International) em três poços. Trezentas células em três poços foram examinadas para a determinação do número médio de parasitos intracelulares por 100 células por poço, e da porcentagem de macrófagos infectados (taxa de infecção). O índice endocítico foi obtido pela multiplicação da porcentagem de macrófagos infectados pelo número médio de amastigotas por macrófago.

3.13. Análise estatística dos resultados:

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa Prism 6 (GraphPad software, San Diego, CA, USA), utilizando-se o teste t de student ou Mann-Whitney Rank Sum, de acordo com a distribuição paramétrica ou não paramétrica dos resultados, respectivamente. O nível de significância adotado foi $p \leq 0,05$. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos três vezes para a validação. Todos os resultados gerados foram apresentados com os valores de média e desvio padrão obtidos pelo programa Prism 6.

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos para a NTPDase-1 de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e alfa-tubulina utilizados na PCR convencional.

Primers	Sequência	Tamanho do produto amplificado (pb)
ACR	Fw: 5'-TMA TCG ACG CYG GCA GYA-3' Rv: 5'-GAG AGS AGC CWA GAG ACC AG-3'	1086
Início do CDS	Fw: 5'-ATG CGW CCG TAC TCC TCR GTG-3' Rv: 5' -CGG ACT CAG GTA GGA GCC GAA G -3'	424
Final do CDS	Fw: 5'-TAC GAA ACA CCT GAA CGA CGT GA -3' Rv: 5'- TCA TTC CAT CTT GAG CAS GAA GGA -3'	462
Alfa tubulina	Fw: 5'- TCA AGT GCG GCA TCA ACT AC -3' Rv: 5'- GAG TTG GCA ATC ATG CAC AC -3'	91

Tabela 2 - Sequência dos oligonucleotídeos para a expressão heteróloga da NTPDase-1 com a hélice transmembranar de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* utilizados na PCR convencional.

Primers	Sequência	Tamanho do produto amplificado (pb)
rLaNTPDase	Fw: 5'- ATGCGWCCGTACTCCTCRGTG -3' Rv: 5'- TCATTCCATCTTGAGCASGAAGGA -3'	1278

Tabela 3 - Sequência dos oligonucleotídeos para a expressão gênica da NTPDase-1 de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* utilizados na RT-qPCR.

Primers	Sequência	Tamanho do produto amplificado (pb)
LaNTPDase	Fw: 5'- CGC TTT GCT GAT GAG GTG GTCC -3' Rv: 5'- ACG GAG ATG CGT TGA GTG CCT G -3'	145
Alfa tubulina	Fw: 5'- TCA AGT GCG GCA TCA ACT AC -3' Rv: 5'- GAG TTG GCA ATC ATG CAC AC -3'	91
GAPDH	Fw: 5'-CCT CAT CGG CAA GGA GAT CG-3' Rv: 5'-TGC ACC GTG TCG TAC TTC AT-3'	93

4. Resultados

4.1. Amplificação da porção central da NTPDase-1 em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*:

Para realizar a clonagem e o sequenciamento da CDS correspondente à NTPDase-1 em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, inicialmente foi realizada uma RT-PCR com os oligonucleotídeos desenhados para a região compreendida entre as ACRs 1 – 5, seguida da visualização do resultado em um gel de agarose 1%, apresentando uma única banda de 1086 nucleotídeos, ao se utilizar DNA e cDNA de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Figura 10 A), demonstrando a amplificação positiva da região das ACRs e dos controles utilizados. Além disso, também foi utilizado o controle da transcrição reversa (Mock), para confirmar que o cDNA não apresentava contaminação por DNA genômico.

Com o objetivo de identificar a sequência completa do gene da NTPDase-1 de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, as PCRs foram realizadas sob as condições descritas na metodologia, utilizando dois conjuntos de oligonucleotídeos desenhados para a região inicial do CDS e para a região final do CDS. O resultado obtido foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 2% (Figura 10 B) apresentando uma única banda de 424 nucleotídeos para o início da sequência codificante e 462 nucleotídeos para o final da sequência codificante, quando se utilizou DNA ou cDNA de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, demonstrando a amplificação positiva da região do início e final do CDS. O controle utilizado nesta reação da transcrição reversa (Mock), não amplificou, mostrando que o cDNA não apresentava contaminação por DNA genômico.

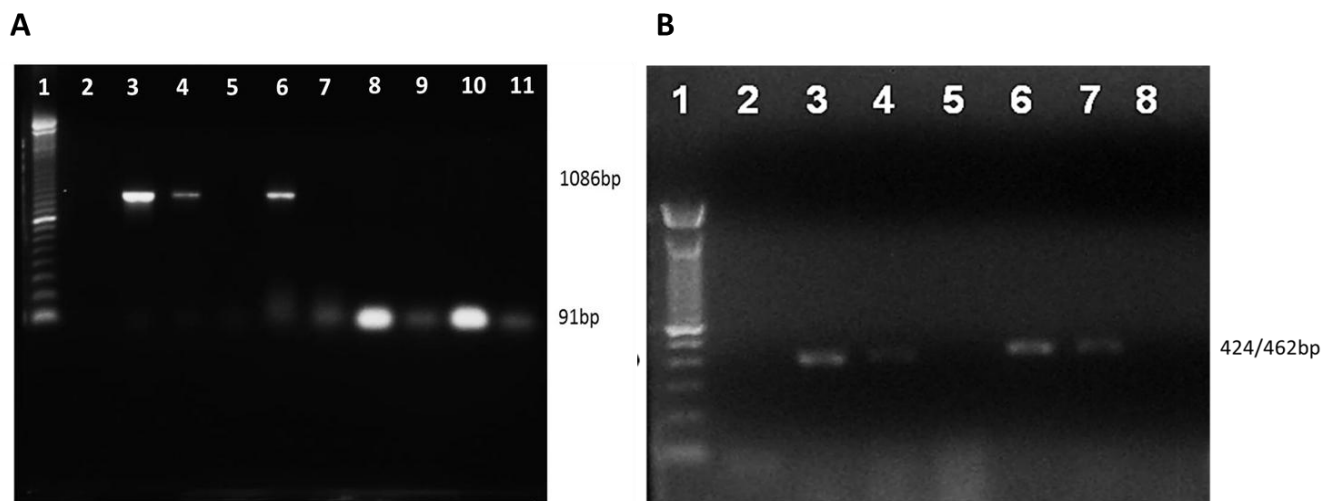


Figura 10 - Amplificação da LaNTPDase-1 utilizando dois conjuntos de oligonucleotídeos desenhados para as regiões ACRs e para as regiões inicial do CDS e final do CDS. A: Gel de Agarose 1%, mostrando a amplificação da LaNTPDase-1 em *Leishmania (Leishmania) amazonensis* para os oligonucleotídeos desenhados para as regiões compreendida entre as ACRs 1 - 5, 1- PM 100 pb, 2- Branco, 3- DNA utilizando oligonucleotídeos para a ACRs, 4- cDNA utilizando oligonucleotídeos para a ACRs, 5- cDNA MOCK utilizando oligonucleotídeos para a ACRs, 6- cDNA utilizando oligonucleotídeos para a ACRs, 7- cDNA MOCK utilizando oligonucleotídeos para tubulina, 8- cDNA utilizando oligonucleotídeos para tubulina, 9- cDNA MOCK utilizando oligonucleotídeos para tubulina, 10- cDNA utilizando oligonucleotídeos para tubulina, 11- cDNA MOCK utilizando oligonucleotídeos para a tubulina B: Gel de Agarose 2% mostrando a amplificação da NTPDase-1 a partir de DNA e cDNA de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, para os oligonucleotídeos desenhados para as regiões inicial e final do CDS, 1 - PM 100pb, 2 - NTC - 3 DNA amplificado para a porção inicial do CDS, 4 - cDNA amplificado para a porção inicial do CDS, 5 - cDNA MOCK para a porção inicial do CDS, 6 - DNA amplificado para a porção final do CDS, 7 - amplificado para a porção final do CDS, 8 - cDNA MOCK da porção inicial do CDS.

4.2. Clonagem e sequenciamento dos produtos amplificados para a NTPDase-1 de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*:

Os três produtos de PCR purificados, correspondentes à DNA e ao cDNA para a região das ACRs da NTPDase-1 foram clonados. A eficiência de clonagem foi confirmada pela digestão do plasmídeo purificado com a enzima de restrição EcoRI, seguida da visualização das bandas em um gel de agarose 0,8% (Figura 11 A). Foi possível observar duas bandas: uma correspondente ao vetor (superior) e a outra correspondente ao inserto (inferior), indicando que a ligação do vetor com o inserto foi realizada. Todos os clones positivos foram selecionados para o sequenciamento de DNA, que foi realizado conforme descrito na metodologia, na Plataforma-DNA de Sequenciamento de DNA (PDTIS-Fiocruz).

Os 6 produtos de PCR purificados, correspondentes ao DNA e cDNA para as porções inicial e terminal do CDS da NTPDase-1 foram clonados. A eficiência de clonagem foi confirmada pela digestão do plasmídeo purificado com a enzima de restrição EcoRI, seguida da visualização das bandas em um gel de agarose 0,8% (Figura 11 B). Todos os clones positivos foram selecionados para o sequenciamento de DNA, que foi realizado conforme descrito na metodologia, na Plataforma-DNA de Sequenciamento de DNA (PDTIS-Fiocruz).

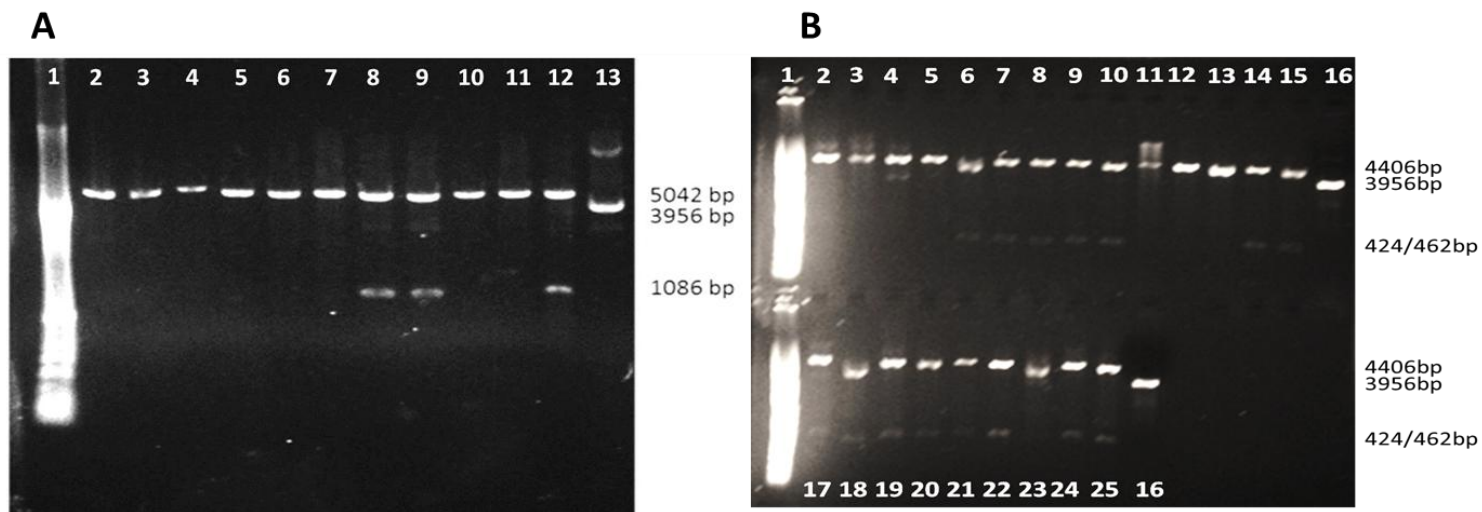


Figura 11 - Seleção dos clones positivos. A: Gel de Agarose 0,8% dos plasmídeos purificados tratados com EcoRI (ACRs), 1- PM 100pb, 2-12- Colônias positivas isoladas contendo o inserto ACR 1-5, 13- Vetor com o plasmídeo vazio. B: Gel de Agarose 0,8% dos plasmídeos purificados tratados com EcoRI, (porção inicial e final CDS): 1 - PM 1kb, 2-5 - clones positivos contendo (DNA), 6-10 – clones positivos contendo o inserto do final CDS (DNA), 11-13 – clones positivos contendo o inserto do início CDS (cDNA), 14-15 – clones positivos contendo o inserto do final CDS (cDNA), 16- vetor de plasmídeo vazio, 17-19 – clones positivos contendo o inserto do início CDS(cDNA), 20-25- clones positivos contendo o inserto do final CDS (cDNA).

4.3. Identificação do CDS correspondente à NTPDase-1 de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*:

As sequências de DNA obtidas (porção central compreendida entre as ACRs 1 a 5, e porções inicial e final da CDS) foram alinhadas utilizando o software MEGA versão 4.0. Com isso, foi possível identificar a sequência codificante completa, do transcrito correspondente ao gene, e a sequência predita de aminoácidos para a LaNTPDase-1 (Figura 12). O alinhamento da sequência de aminoácidos predita com as NTPDases-1 com outras espécies do gênero *Leishmania* (Tabela 4) apresentou 98% de similaridade e 88% de identidade com *Leishmania (Leishmania) mexicana*, 93% de similaridade e 88% de identidade com *Leishmania (Leishmania) infantum*, 93% de similaridade e 88% de identidade com *Leishmania (Leishmania) donovani*, 92% de similaridade e 87% de identidade com *Leishmania (Leishmania) major* e 88% de similaridade e 80% de identidade com *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Tabela 4).

A sequência completa de DNA da NTPDase-1 de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* obtida foi depositada no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), com o número de acesso: JQ697233, GI:400381332.

```

1
L. amazonensis MRPYSSVRRMTQQSKRLRVAGTLVLSALVLFVGFVYVYHKSPLFSPCDSAYANVDIVIDAGSTGSRVHVHFQ          ACR1          70
L. mexicana MRPYSSVRRMTQQSKRLRVAGTLVLSVLFVGFVYVYHKSPLFSPCDSAYANVDIVIDAGSTGSRVHVHFQ
L. infantum MRPYSSVRRMTQQSKRLRIAGTLVLSALVIFGFLVYVYQSPLLSPCDSAYANVDVVIDAGSTGSRVHVHFQ
L. donovani MRPYSSVRRMTQQSKRLRIAGTLVLSALVIFGFLVYVYQSPLLSPCDSAYANVDVVIDAGSTGSRVHVHFQ
L. major MRPYSSVRRMTQQSKRLRVASTLVLSALVIFGFLVYVYQSPLLSPCDSAYANVDVVIDAGSTGSRVHVHFQ
L. braziliensis MRPYSSVRRMTQQSNRLRVIGVVLVLSAFVLFVGFVIYSESPWFSPCNSPYSNVYDIVIDAGSTGSRVHVHFQ
***** **
71
L. amazonensis YERSRTGVVLLKERFKRIEPLGSSFATDPDGAKESLTGLLRFADEVVPESYQRCSTSVTLKATAGLRLLPE          ACR2          140
L. mexicana YERSRTGVVLLKERFKRIEPLGSSFTTDPDGAKESLTGLLRFADEVVPESYQRCSTSVTLKATAGLRLLPE
L. infantum YERGRTGLVLLRERFKRVEPGLSSFATDPDGAKESLAGLLRFADKVPVQSYQKCTFVTLKATAGLRLLPE
L. donovani YERGRTGLVLLRERFKRVEPGLSSFATDPDGAKESLAGLLRFADKVPVQSYQKCTFVTLKATAGLRLLPE
L. major YERGRTGFVLLRERFKRAEPDLSSFATDLDGAKASLEGLLRFADTVPVQSYQKCTSVTLKATAGLRLLPE
L. braziliensis YERSSTGVILLRERFKRIEPLGSSFATDPDGAKQSLAGLLRFAEKAVPRSYQRCSTSVTLKATAGLRLLPE
*** **
141
L. amazonensis SDQQVMLDAAQQALNASPFQSRGASIISSGAQEGVYGWLTNVYLLDRLDDTDVAT IATIDMGGASTQVVFET          ACR3          ACR4          210
L. mexicana SDQQVLLDAAQQALNASPFQSRGASIISSGAQEGVYGWLTNVYLLDRLDDTDVAT IATIDMGGASTQVVFET
L. infantum SVQQVLLDAAQH TLNASPFQSRGASIISSGAQEGVYGWLTNVYLLNRLD TDVATVATIDMGGASTQVVFET
L. donovani SVQQVLLDAAQH TLNASPFQSRGASIISSGAQEGVYGWLTNVYLLNRLD TDVATVATIDMGGASTQVVFET
L. major SAQQALLDVAQH TLNASPFQSRGASIISSGAQEGVYGWLTNVYLLDRLDDTDVATVATIDMGGASTQVVFET
L. braziliensis ADQQVLLDAAQQ TLKAFPQSRGASIVSSGAQEGVYGWLTNVYLLNRLDKEGATVATIDMGGASTQVVFET
** **
211
L. amazonensis TPTS GEWLPFNYAHQLRILKRTISVYQHSYLG LGMNEAKKLM TLF AEANGTSSFP CFPRGYTKHLNDVK          280
L. mexicana TPTS GEWLPFNYAHQLRI PKRTISVYQHSYLG LGMNEAKKLM TLF AEANGTSSFP CFPRGYTKHLNGVE
L. infantum TPTS GEWLPFNYAHQLRTPKRTITMYQH SYLG LGMNEAKKLMMSFAEANGTSSFP CFPRGYAKRLNDVE
L. donovani TPTS GEWLPFNYAHQLRTPKRTITMYQH SYLG LGMNEAKKLMMSFAEANGTSSFP CFPRGYAKRLNDVE
L. major TPTS GEWLPFNYA YQLRTPKRTIAMYQH SYLG LGMNEAKKRLM TLF AEANGTSSFP CFPRGYTKRVNGVE
L. braziliensis KPTS GEWLPFNYAHQLRTPKRTIAMYQH SYLG LGLNEAKKLM TLF FAKVNGTSSFP CFP RHTEHLNGVE
***** **
281
L. amazonensis LRNSDATDFDACVGLF REHVIT TSTCRFDACGARGVPQPLFPSRRHPVYAFSYFYDRLYHFHKEGRPVYV          350
L. mexicana LRNSDATDFDACVGLF REHVIT TATCRFDACGARGVPQPLFPSRRHPVYAFSYFYDRLYHFHKEGRPVYV
L. infantum LRNSDATDFDACAGL F REHVITKTCKFDACGARGVPQPLFPSRRHLIYAFSYFYDRLYHF SKEGSPVYV
L. donovani LRNSDATDFDACAGL F HEHVITKTCKFDACGARGVPQPLFPSRRHLIYAFSYFYDRLYHF SKEGSPVYV
L. major LRNSDATDFNACAGL F REHVIT TSTCKFDACGARGVPQPLFPSRRHPIYAFSYFYNRLYDFLKEG SQVYV
L. braziliensis LRNGDSTDFV CVNLF REHVITKPICRFDACGARGVPQPPLPSKQHP IYAFSYFYDRLYHF RSEGF PVYV
*** *
351
L. amazonensis SLYKEVGKEVCHRESASRATTPEETACMELAYLYSFL TNGLG L GDDTALTVP IRIAGMSVSWSLGSSLSF          ACR5          420
L. mexicana SLYKEVGKEVCHRESASRATTPEETACMELAYLYSFL TNGLG L GDDTALTVP NR IAGMSVSWSLGSSLSF
L. infantum SSYKEVGQEVCHRESARRTTAPETACMELAYMYSFL TYG L G L SDA TALTP NR IEGMAVSWSLGSSLSF
L. donovani SSYKEVGQEVCHRESARRTTAPETACMELAYMYSFL TYG L G L SDA TALTP NR IEGMAVSWSLGSSLSF
L. major SSYKEVGQEVCHRESARRTTAPETACMELAYMYSFL TYG L G L SDA TVLTVP NR IEGMAVSWSLGSSLSF
L. braziliensis SSYKELGREVC QRESADHTTTPKETTCEMELAYLYSFL THG L G L SDDRTLEV PNRIEGIAVSWSLGSSLSF
* *
421 425
L. amazonensis LLKME
L. mexicana LLKME
L. infantum LLKME
L. donovani LLKME
L. major LLKME
L. braziliensis VLKME
****

```

Figura 12 - Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácido de NTPDase-1. A sequência predita da NTPDase-1 de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* foi comparada com as sequências de outras espécies de *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) infantum*, *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) major* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*) depositadas no banco de dados usando o algoritmo BLAST. Os asteriscos representam a identidade entre os aminoácidos e em destaque estão as regiões conservadas em apirase (ACRs).

Tabela 4 - Valores de similaridade e identidade obtidos através do alinhamento realizado no BLAST com a sequência de aminoácidos da NTPDase-1 de diferentes espécies de *Leishmania* em relação a de *Leishmania*.

Espécie	Número de Acesso	Similaridade	Identidade
<i>Leishmania (L.) mexicana</i>	CBZ25018	98%	98%
<i>Leishmania (L.) infantum</i>	XP_001464341.1	93%	88%
<i>Leishmania (L.) donovani</i>	CBZ32820	93%	88%
<i>Leishmania (L.) major</i>	XP_001681917.1	92%	87%
<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	154334410	88%	80%
<i>Rattus norvegicus</i>	NP_955426.1	48%	32%
<i>Homo sapiens</i>	NP_001767.3	44%	28%

4.4. Construção de árvore filogenética baseada na sequência da LaNTPDase-1 e LaNTPDase-2:

Com base no alinhamento das sequências de aminoácidos para as NTPDase-1 e para a NTPDase-2 de seis espécies do gênero *Leishmania*, sendo 5 espécies presentes no subgênero *Leishmania*: *Leishmania (Leishmania) donovani* (CBZ32820 e CBZ32136); *Leishmania (Leishmania) infantum* (XP_001464341.1 e XP_001463665.1); *Leishmania (Leishmania) major* (XP_001681917.1 e XP_001681345.1); *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (JQ697233.2); *Leishmania (Leishmania) mexicana* (CBZ25018 e CBZ24328); e uma espécie presente no subgênero *Viannia*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* (XP_001562178.1 e XP_001562788.1) uma árvore filogenética foi construído (Figura 13) mostrando que a sequência da NTPDase obtida de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* pode ser classificada como NTPDase-1 e, como esperado, esta sequência está mais próximo de espécies do subgênero *Leishmania*. Além disso, como um grupo controle, foram utilizadas as sequências de NTPDase-1 e NTPDase-2 de *Homo sapiens*. Conforme esperado, estas duas sequências ficaram reunidas em um ramo completamente separado dos demais, devido à menor similaridade que possuem com as enzimas do gênero *Leishmania*.

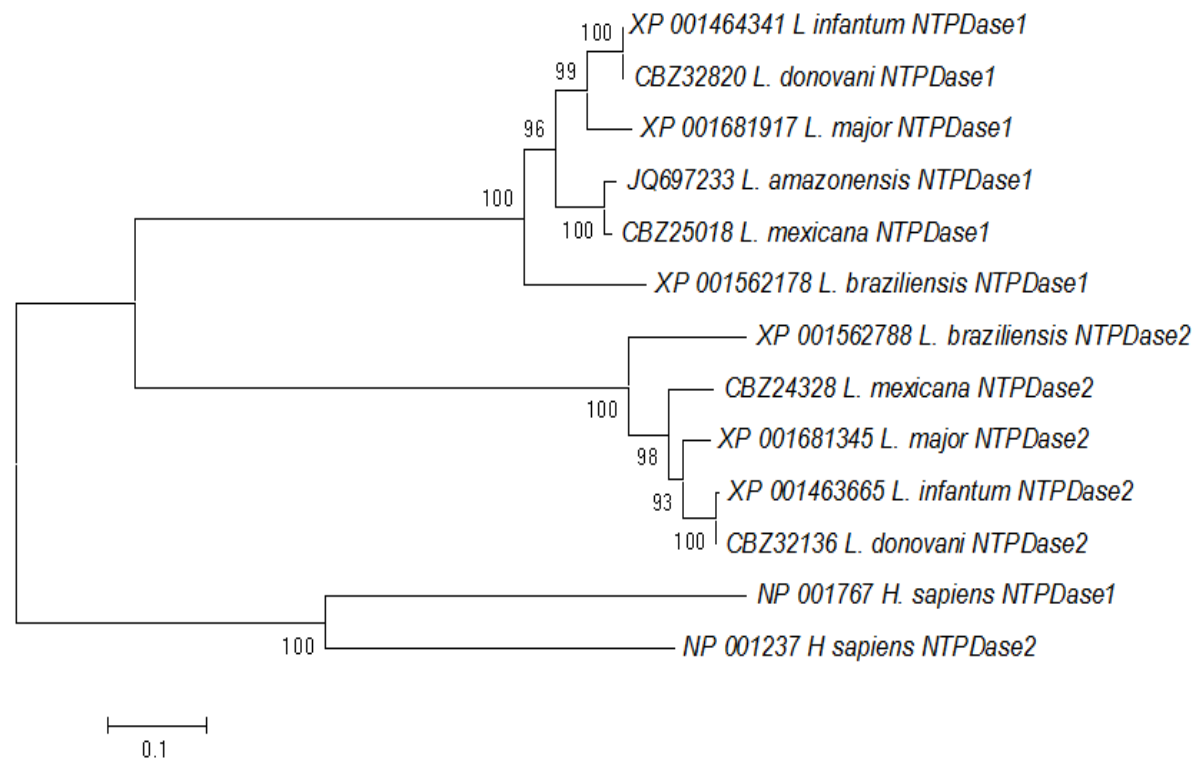


Figura 13 – Dendrograma estrutural das NTPDase-1. Os dois grandes grupos de relação resultam da homologia entre as sequências de proteínas humanas (NP001767 e NP001237) e de *Leishmania* spp (*Leishmania (Leishmania) donovani* (CBZ32820 e CBZ32136); *Leishmania (Leishmania) infantum* (XP_001464341.1 e XP_001463665.1); *Leishmania (Leishmania) major* (XP_001681917.1 e XP_001681345.1); *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (JQ697233.2); *Leishmania (Leishmania) mexicana* (CBZ25018 e CBZ24328); *Leishmania (Viannia) braziliensis* (XP_001562178.1 e XP_001562788.1). Os agrupamentos associados às linhas verticais do dendrograma representam o grau de homologia entre as proteínas.

4.5. Modelo Tridimensional da NTPDase-1 *Leishmania (Leishmania) amazonensis*:

A partir da sequência de aminoácidos da LaNTPDase-1 (JQ697233.2), a estrutura secundária da NTPDases-1 foi prevista utilizando o servidor PSIPRED (Figura 14 A). A existência de um único domínio hélice transmembranar foi previsto pelo software TMHMM, na região N-terminal, indicando que a LaNTPDase-1 pode ser delimitada para a membrana plasmática. Com base nas estruturas de proteínas terciárias obtidos a partir de enzimas cristalizadas de *Rattus norvegicus* e *Legionella pneumophila*, um modelo de comparação entre a LaNTPDase-1 (Figura 14 B) foi construído com RMSD Å 0,63 e 2,12 Å, respectivamente. Observou-se que o sítio ativo é formado por uma bolsa localizada na região do núcleo da proteína, rodeado por aminoácidos que pertencem as 5 ACRs. Além disso, na estrutura de *R. norvegicus*, observou-se uma hélice alfa (a partir de Asn291 a Phe313) perto do local de ligação de nucleotídeos, o qual poderia atuar como uma aba durante a interação com o substrato. Os aminoácidos envolvidos na interação com o nucleotídeo foi avaliado através da a interação da La-NTPDase com de Mg⁺² e AMPPNP, um análogo de ATP não hidrolisável, indicando uma distância raio de 5Å (Figura 15). Através desta interação foi possível observar a presença dos aminoácidos das 5 ACRs no sítio ativo da LaNTPDase-1. A ACR5 é a região conservada mais distante do sítio ativo, contribuindo com apenas um aminoácido (Trp412). O alinhamento estrutural de aminoácidos assinala que três resíduos da ACR1 (THR 62, Gli 63 e Arg65) e uma da ACR 4 (Met199) são distintos entre *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *R. norvegicus*, o que poderia resultar em uma diferença significativa para o substrato de ligação e catálise entre os mamíferos e tripanosomatídeos.

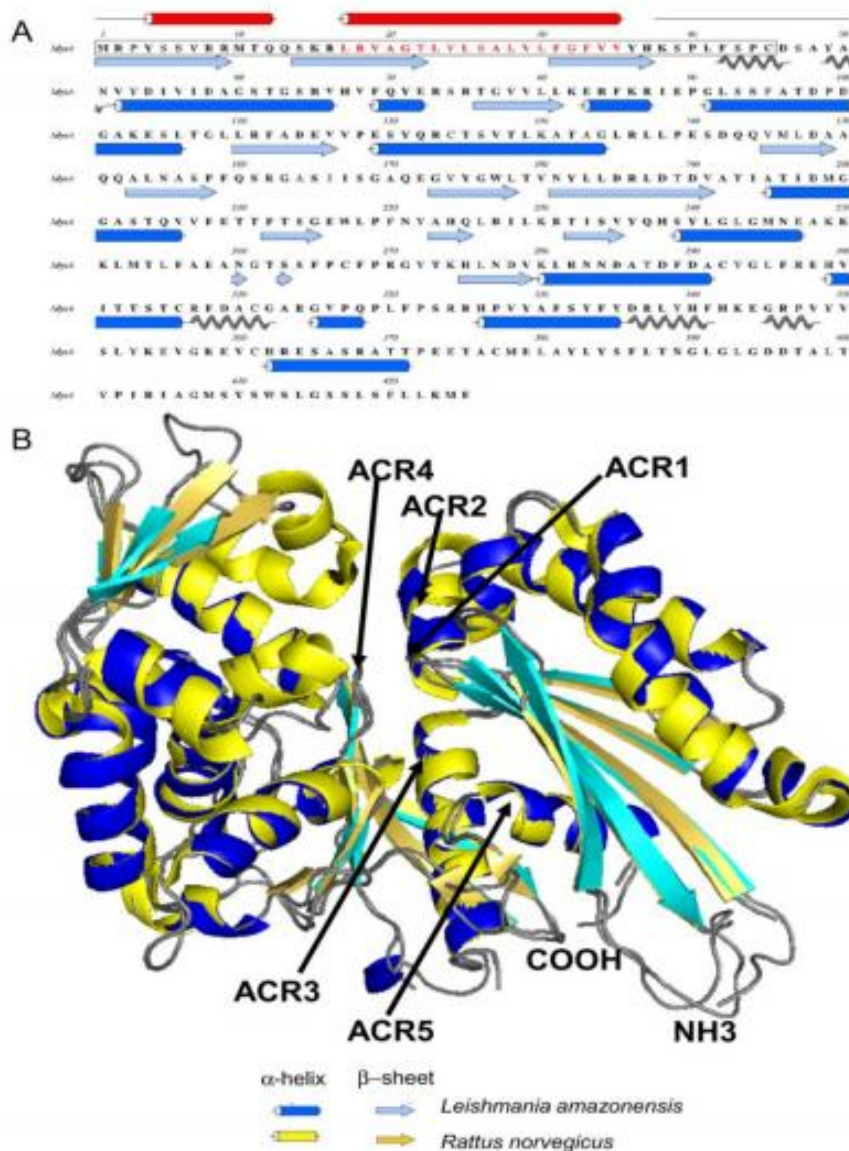


Figura 14 - Modelo teórico estrutural da LaNTPDase-1. Em (A) representação dos cálculos de predição da estrutura secundária da LaNTPDase-1. Em vermelho os aminoácidos correspondentes à alfa hélice transmembranar predito por TMHMM e PCISS. Em (B). Sobreposição da estrutura tridimensional da LaNTPDase-1 e *Rattus norvegicus* ecto-NTPdase-1. As ACRs são indicadas pelas setas, em azul a estrutura tridimensional da LaNTPDase-1, em amarelo o modelo de *Rattus norvegicus*.

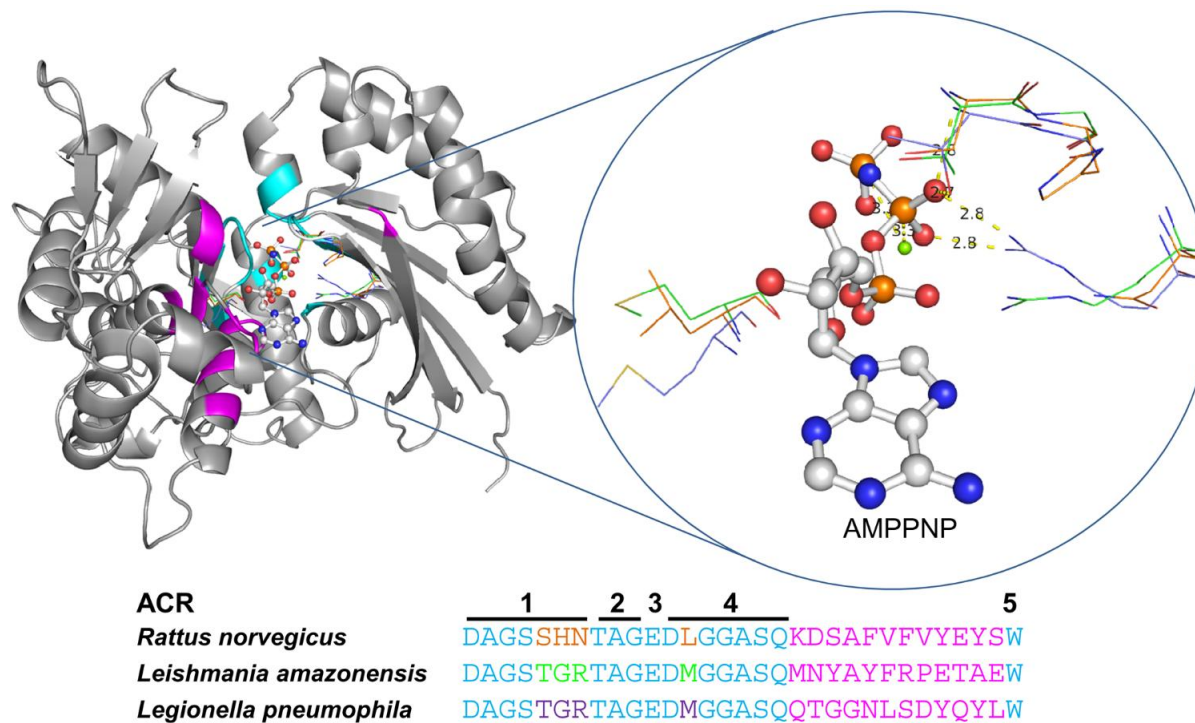


Figura 15 - Resíduos de aminoácidos potencialmente envolvidos no sítio de ligação da LaNTPDase-1 nucleotideo. A partir do alinhamento estrutural dos aminoácidos da região de Å-radius em torno do sítio de ligação do AMPPNP (a partir da cristalização de *L. pneumophila* NTPDase-1). Os aminoácidos estão representados com as ACRs. Em azul os aminoácidos conservados dentre as três estruturas. Em rosa é demonstrado uma região de alta variação. As ACRs 1 e 4, nas cores laranja, verde e roxo representam os aminoácidos entre essas espécies. O AMPPNP é representado por bastão e bola e os resíduos de aminoácidos estão representados por bastões. As esferas verdes representam a ligação entre o íon Mg²⁺ e o AMPPNP.

4.6. Clonagem da rLa-NTPDase-1:

Para realizar a clonagem da NTPDase-1 recombinante foi realizada uma PCR utilizando os oligonucleotídeos desenhados para amplificar o gene da NTPDase-1 de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* na presença e na ausência do domínio de ligação à membrana (hélice transmembranar), que foi identificado previamente através da análise da estrutura predita. Em seguida, visualizou-se o resultado em um gel de agarose 1% (Figura 16), que apresentou uma única banda de 1278 nucleotídeos representando a sequência nucleotídica completa desta enzima e outra banda de 1122 nucleotídeos representando a sequência nucleotídica sem o domínio de ligação à membrana. Os controles utilizados nesta reação (tubulina e NTC) foram positivos através da observação da amplificação do gene correspondente à alfa-tubulina. Além disso, também foi utilizado o controle negativo (NTC) e o controle da transcrição reversa (Mock), para confirmar que o cDNA não apresentava contaminação por DNA genômico.

As bandas foram cortadas e purificadas utilizando o kit GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma) seguindo as instruções do fabricante. A eficiência de clonagem foi confirmada utilizando a PCR colônia com os oligonucleotídeos desenhados para a NTPDase com o domínio transmembranar (Figura 17 A) e um par de oligonucleotídeos que amplificam a região central do gene, utilizado também nos experimentos de RT-qPCR (Figura 17 B). Os produtos foram visualizados em um gel de agarose 1%, observando as bandas correspondentes ao inserto e ao plasmídeo. Todos os clones positivos foram selecionados para o sequenciamento de DNA, que foi realizado conforme descrito na metodologia, na Plataforma de Sequenciamento de DNA (PDTIS-Fiocruz). Os produtos sequenciados foram alinhados através do software MEGA e comparados com a sequência depositada.

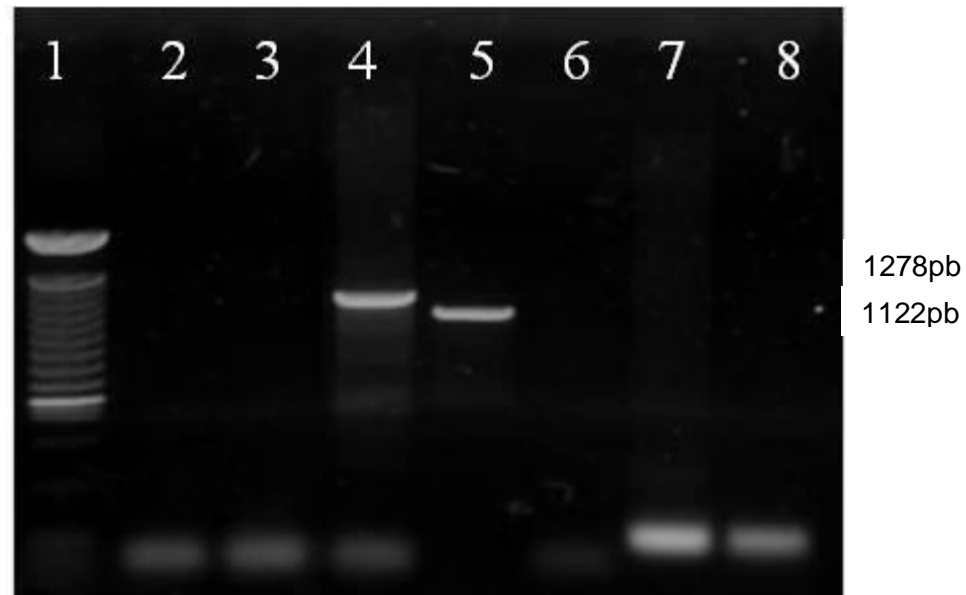


Figura 16 - Análise dos produtos de amplificadores do gene LaNTPDase-1 com e sem o domínio de ligação à membrana da PCR. 1. MW 100bp, 2. C-, 3. MOCK, 4. NTPDase-1 (o domínio de ligação à membrana), 5. NTPDase-1 (sem o domínio de ligação à membrana), 6. NTC, 7-8. cDNA de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amplificado para o alvo da alfa tubulina.

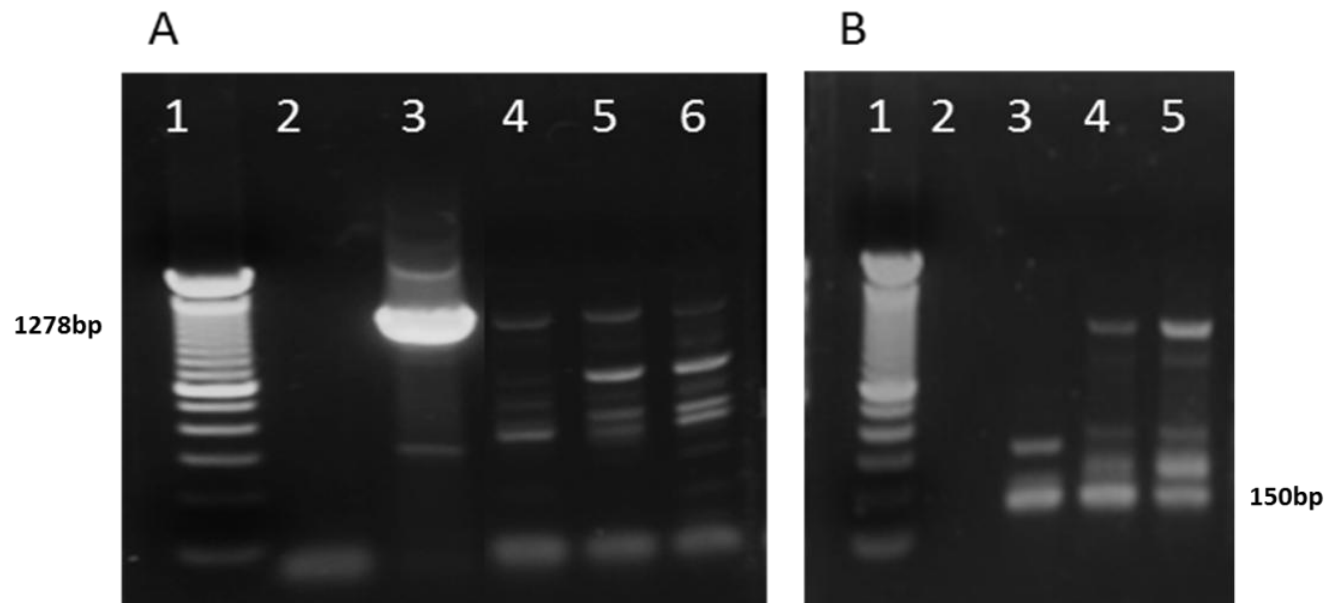


Figura 17 - Análise dos produtos de amplificadas do gene LaNTPDase-1 da PCR de colônia. A - PCR colônia realizada com os oligonucleotídeos com o domínio de ligação à membrana. 1. PM 100bp, 2. NTC, 3. DNA de *L. amazonensis*, 4. Clone B5, 5. Clone B8, 6. Clone B9. B - PCR colônia realizada com os oligonucleotídeos para RT-qPCR. 1. PM 100bp, 2. NTC, 3. DNA de *L. amazonensis*, 4. Clone B1, 5. Clone B2.

4.7. Indução da expressão da La-NTPDase-1:

A indução da expressão da NTPDase-1 foi avaliada por Dot Blot para os 4 clones selecionados utilizando o anticorpo anti histidina, onde foi possível observar em apenas dois clones o aumento da expressão de proteína após 4 e 5 horas (Figura 18). Para confirmar a expressão da NTPDase-1, através do peso molecular da proteína expressa, foi realizado um western blot utilizando as amostras após 4 horas de indução e na concentração de 2%, sendo possível observar nos 4 clones as bandas correspondente ao tamanho esperado (Figura 19 A). Também foi avaliado a expressão da NTPDase-1 com o uso de um tampão de lise, para verificar se a proteína estaria localizada na fração solúvel ou ligada à membrana plasmática. Foi realizado um western blot dos clones positivos após a indução, sendo possível observar que a proteína se encontra ligada à membrana plasmática em maiores proporções e em menores proporções na fração solúvel (Figura 19 B).

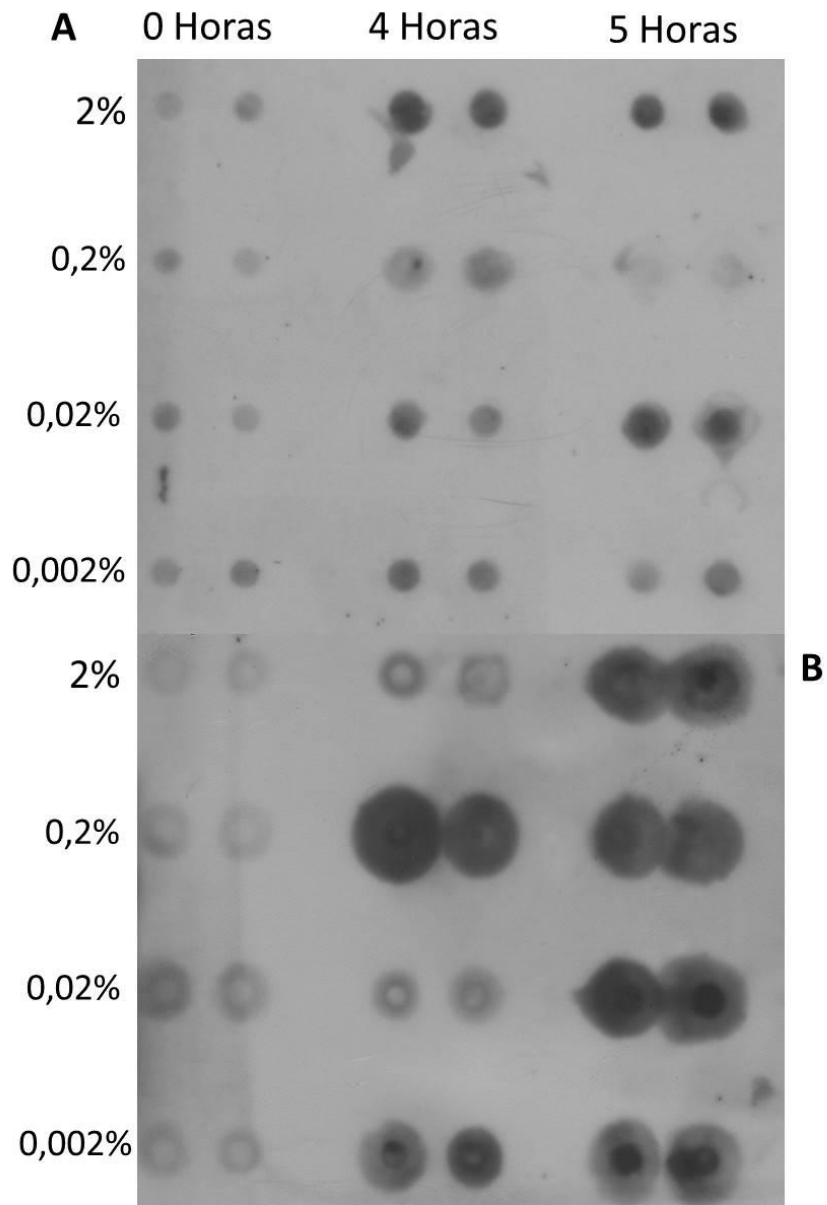


Figura 18 - Detecção da expressão da rLaNTPDase-1 por Dot Blot dos clones B8(A) e B1(B) utilizando o anticorpo para histidina. A indução da expressão da rLaNTPDase-1 foi avaliada com diferentes concentrações de arabinose (2%, 0,2%, 0,02% e 0,002%) e durante o crescimento após 0, 4 e 5 horas de indução.

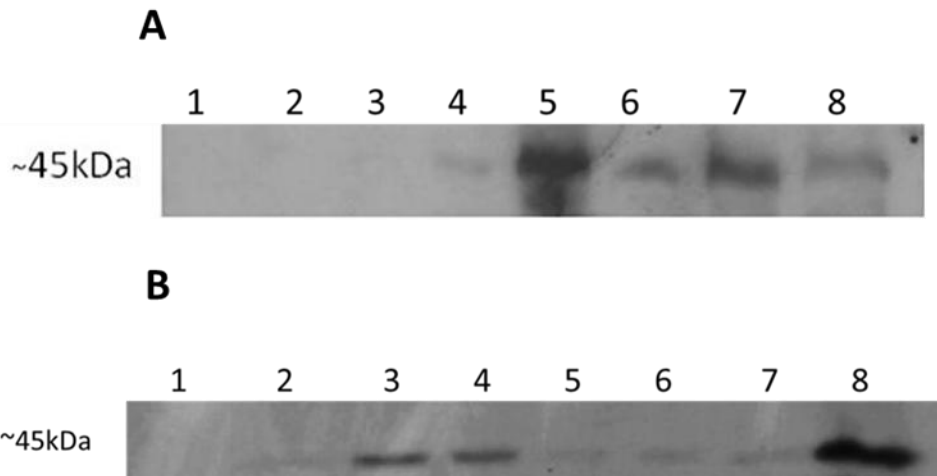


Figura 19 - Detecção da expressão da rLaNTPDase-1 por Western Blot (A) dos clones B8, B9, B1 e B2 utilizando o anticorpo anti-histidina. 1. Clone B8 0 horas, 2. Clone B9 0 horas, 3. Clone B1 0 horas, 4. Clone B2 0 horas, 5. Clone B8 4 horas, 6. Clone B9 4 horas, 7. Clone B1 4 horas, 8. Clone B2 4 horas. B. Detecção da expressão da LaNTPDase-1 nos clones tratados com tampão de lise por Western Blot dos clones B8, B9, B1 e B2 utilizando o anticorpo anti-histidina. 1. Clone B1 fração citoplasmática, 2. Clone B2 fração citoplasmática, 3. Clone B8 fração citoplasmática, 4. Clone B9 fração citoplasmática, 5. Clone B1 fração de membrana, 6. Clone B2 fração de membrana, 7. Clone B8 fração de membrana, 8. Clone B9 fração de membrana.

4.8. Comportamento biológico *in vitro* das cepas IFLA/BR/1967/PH8 e MHOM/BR/1977/LTB0016:

Os perfis das curvas de crescimento dos promastigotas das cepas IFLA/BR/1967/PH8 e MHOM/BR/1977/LTB0016 foram estabelecidos em meio Schneider. As análises das curvas de crescimento das duas cepas estudadas indicaram perfis diferentes das fases logarítmica e estacionárias de crescimento *in vitro*. A cepa MHOM/BR/1977/LTB0016, mostrou uma fase de crescimento logarítmica com intervalo de três dias de cultura, atingindo a fase estacionária no quarto dia de cultivo. A cepa IFLA/BR/1967/PH8 apresentou uma fase de crescimento logarítmica com intervalo de dois dias de cultura, atingindo a fase estacionária no terceiro dia de cultivo (Figura 20). Interessantemente, a análise da expressão gênica da LaNTPDase-1 na cepa MHOM/BR/1977/LTB0016 entre os diferentes dias de cultivo (Figura 20), não apresentou nenhuma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao primeiro dia de cultivo. Por outro lado, foi observado na cepa IFLA/BR/1967/PH8 um aumento significativo ($p < 0,05$) da expressão deste gene no dia quarto dia cultivo ($4,3 \pm 2$), em relação ao primeiro dia.

A suscetibilidade dos macrófagos às diferentes cepas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* foi avaliada por meio da determinação da taxa de infecção de macrófagos infectados com as cepas em estudo. Primeiramente, realizou-se um ensaio preliminar com o objetivo de determinar a melhor proporção de *Leishmania*/macrófagos para os ensaios de infecção. Desse modo, macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram isolados e infectados com promastigotas em fase estacionária de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/1977/LTB0016 e IFLA/BR/1967/PH8) nas proporções de infecção de 5:1 e de 3:1 parasitos por macrófagos nos tempos de infecção de 2 e 24 horas. O número de amastigotas intracelulares foi quantificado por microscopia óptica. A proporção de 3:1 foi escolhida visto que, na proporção 5:1 não foi possível determinar as taxas de infecção, devido à superinfecção que destruiu todos os macrófagos (não sendo possível, portanto, realizar a quantificação – dados não mostrados).

Imagens das infecções para cada cepa no tempo de cultivo de 24 horas são representadas na figura 21 B e figura 22 B. A quantificação da infecção foi realizada através de microscopia ótica, que permitiu observar macrófagos reativos contendo vacúolos parasitóforos, contendo formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no seu citoplasma. A partir da microscopia, verificou-se que as células infectadas pela cepa IFLA/BR/1967/PH8 de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Figura 22 A) possuem vacúolos parasitóforos maiores contendo maior número de parasitos do que os macrófagos infectados com a cepa MHOM/BR/1977/LTB0016 (Figura 21 A).

A porcentagem de infecção de macrófagos para a cepa MHOM/BR/1977/LTB0016 foi bastante variável entre as duas condições de tempo testadas (Figura 21 C). Observou-se que a infecção realizada em 2 horas apresentou uma taxa de infecção de macrófagos mais baixa ($9,5\% \pm 5,8$) quando comparada com a infecção realizada no tempo de 24 horas ($18,1\% \pm 5,2$). O mesmo não foi observado quando foi avaliado o número de amastigotas em relação ao número de células infectadas (Figura 21 D), não havendo diferença estatística no tempo de 2 horas ($1,3 \pm 0,2$) e 24 horas ($1,5 \pm 0,2$).

A porcentagem de infecção de macrófagos para a cepa IFLA/BR/1967/PH8 foi bastante variável entre as duas condições de tempo testadas (Figura 22 CB). Observou-se que a infecção realizada em 2 horas apresentou uma taxa de infecção de macrófagos mais baixa ($10,6\% \pm 3,7$) quando comparada com a infecção realizada no tempo de 24 horas ($30,9\% \pm 6,2$). O mesmo não foi observado quando foi avaliado o número de amastigotas em relação ao número de células infectadas (Figura 22 D), não havendo diferença estatística no tempo de 2 horas ($1,3 \pm 0,2$) e 24 horas ($1,4 \pm 0,1$).

O índice endocítico foi calculado através da multiplicação da porcentagem de macrófagos infectados pelo número médio de amastigotas por macrófago. O índice endocítico em 24 horas foi bastante variável entre as duas cepas (Figura 23). Observou-se que a cepa IFLA/BR/1967/PH8 apresentou um índice de $46,667 \pm 13,489$, quase o dobro do valor obtido para a cepa MHOM/BR/1977/LTB0016 ($27,5 \pm 7,5$). Ao fazermos as análises estatísticas desses valores pelo método do teste não paramétrico de Mann-Whitney Rank Sum $p < 0,05$, indicando que a infectividade, avaliada através do índice endocítico, foi significativamente maior para a cepa IFLA/BR/1967/PH8.

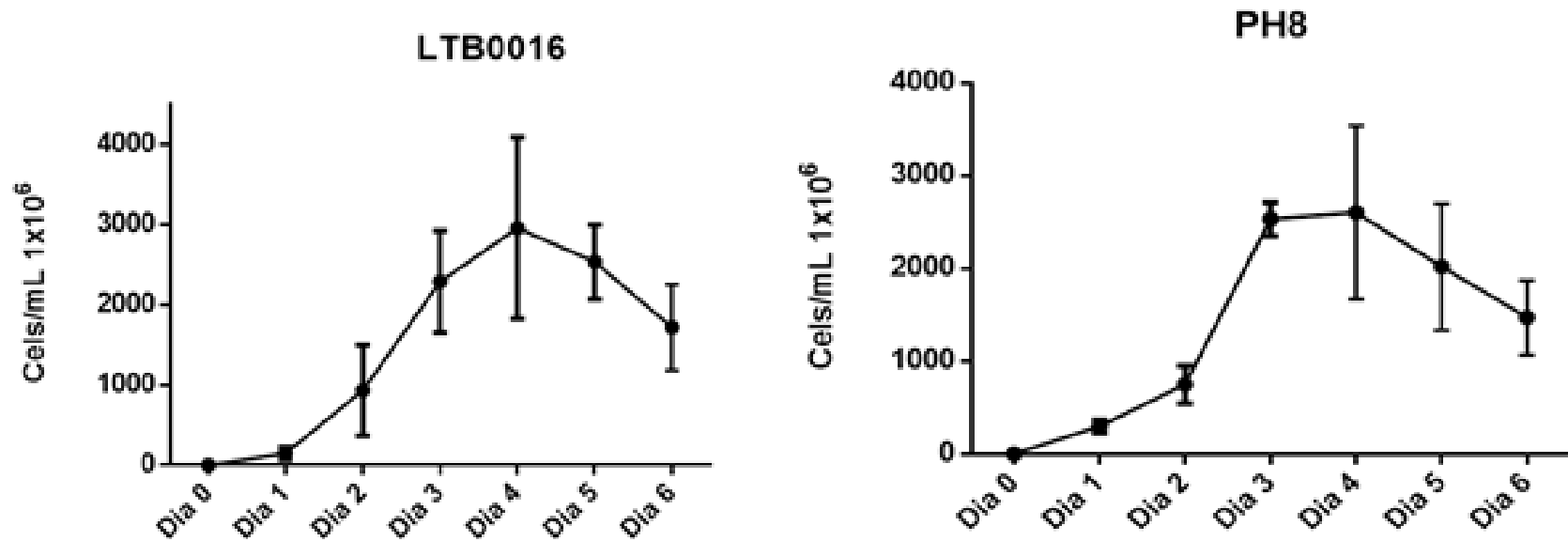


Figura 20 - Curva de crescimento da *Leishmania (Leishmania) amazonensis* das cepas MHOM/BR/77/LTB0016 e IFLA/BR/1967/PH8, formas promastigotas 1×10^6 células/mL foram cultivadas e contadas a cada dia de cultivo. Dados representam a média dos resultados de três experimentos independentes \pm desvio padrão. Análise estatística foi realizada utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney Rank Sum.* $p < 0.05$ (versus dia 1).

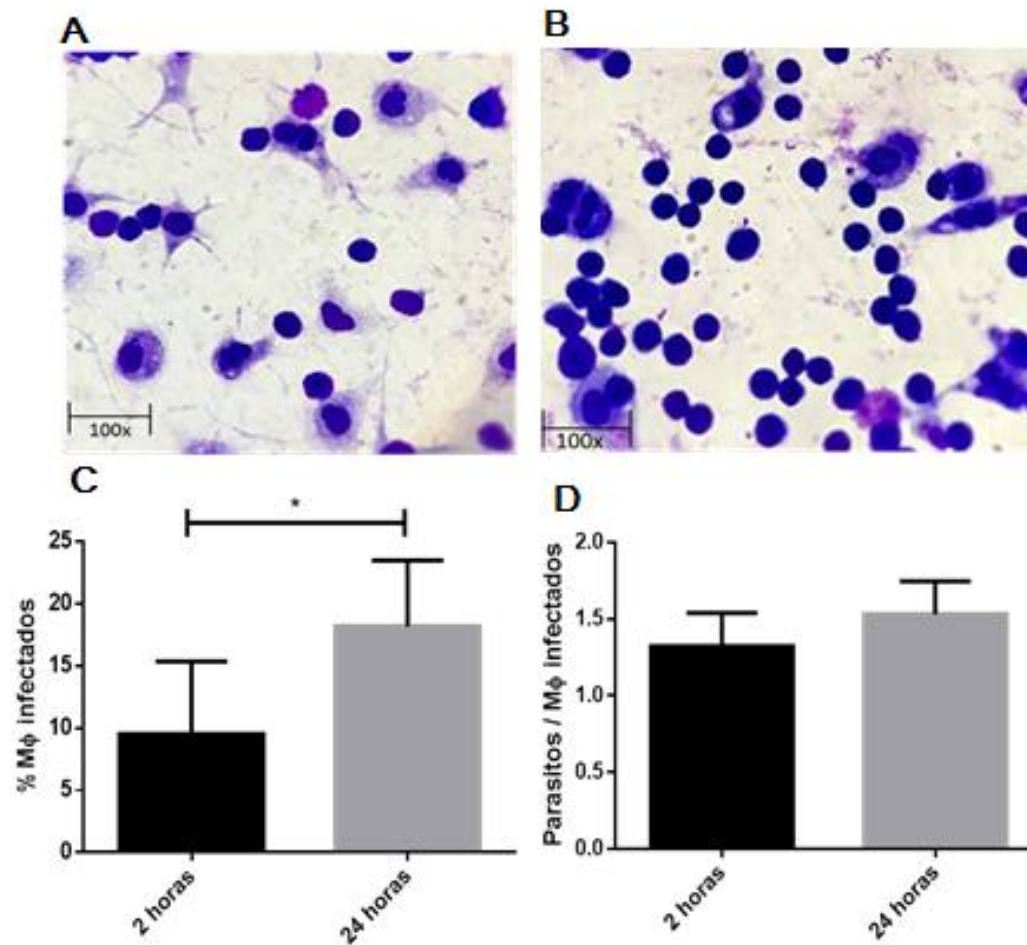


Figura 21 - Infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c com a cepa MHOM/BR/1977/LTB0016. As infecções foram realizadas na proporção de 3 parasitos por macrófago. Após os tempos de incubação as células foram coradas por panótico e contadas por microscopia ótica (A – imagem representativa do tempo de 2 horas). (B – imagem representativa do tempo de 24 horas). Os valores expressam a porcentagem de macrófagos infectados (C) e o número de parasitos por macrófagos infectados (D) em 2 e 24h de infecção. * $p < 0.05$ (versus 2 horas de infecção).

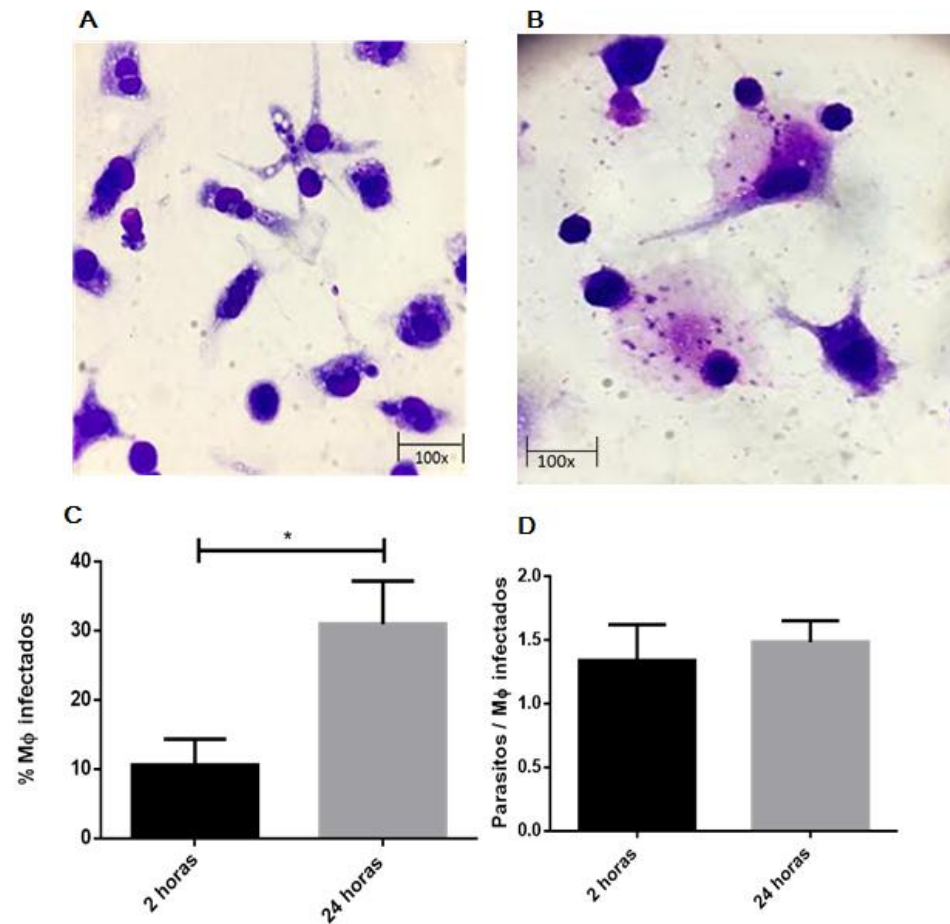


Figura 22 - Infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c com a cepa IFLA/BR/1967/PH8. As infecções foram realizadas na proporção de 3 parasitos por macrófago. Após os tempos de incubação as células foram coradas por panótico e contadas por microscopia ótica (A – imagem representativa do tempo de 2 horas). (B – imagem representativa do tempo de 24 horas). Os valores expressam a porcentagem de macrófagos infectados (C) e o número de parasitos por macrófagos infectados (D) em 2 e 24h de infecção. *p<0.05 (versus 2 horas de infecção).

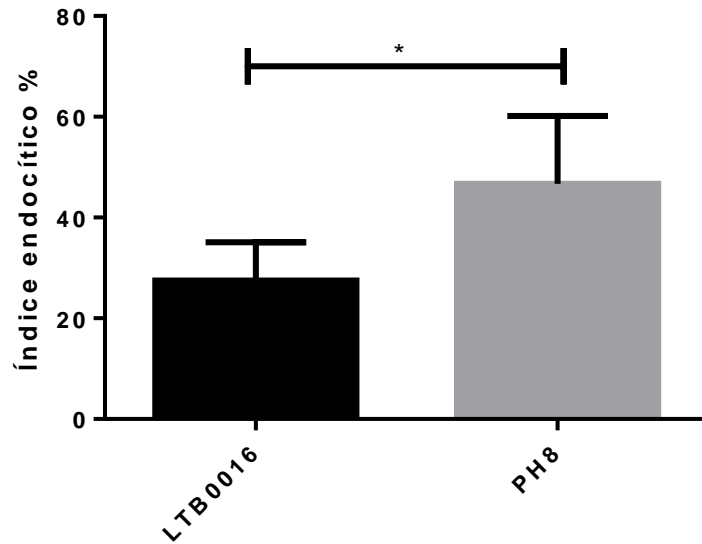


Figura 23 - Determinação do índice endocítico após 24 horas de infecção das cepas MHOM/BR/1977/LTB0016 e IFLA/BR/1967/PH8. * $p < 0.05$ (versus LTB0016). Índice endocítico = % de macrófagos infectados \times média de amastigotas/macrófago infectado.

4.9. Expressão dos genes Alfa tubulina e GAPDH para as cepas IFLA/BR/1967/PH8 e MHOM/BR/1977/LTB0016 e diferentes formas morfológica da *Leishmania (Leishmania) amazonensis*:

No sentido de avaliar se os genes escolhidos para a realização deste estudo, alfa-tubulina e GAPDH, seriam bons alvos para normalização dos nossos ensaios de RT-PCR em Tempo Real, apresentando uma expressão constitutiva entre as diferentes cepas e formas morfológicas da *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, avaliamos os valores de CTs obtidos na curva de amplificação para todos os alvos (Figura 24 A, C e E) e a curva de Melting obtida nos experimentos realizados (Figura 24 B, D e F). Realizamos também um gráfico baseado nos valores de CT obtidos por estes alvos, para cada uma das amostras testadas (Figura 24 G).

Observamos que ambos os genes testados foram bons candidatos a genes de referência, pois apresentaram uma pequenas variações entre as diferentes formas morfológicas observadas na curva de amplificação e através dos valores de Cts obtidos (Figura 24).

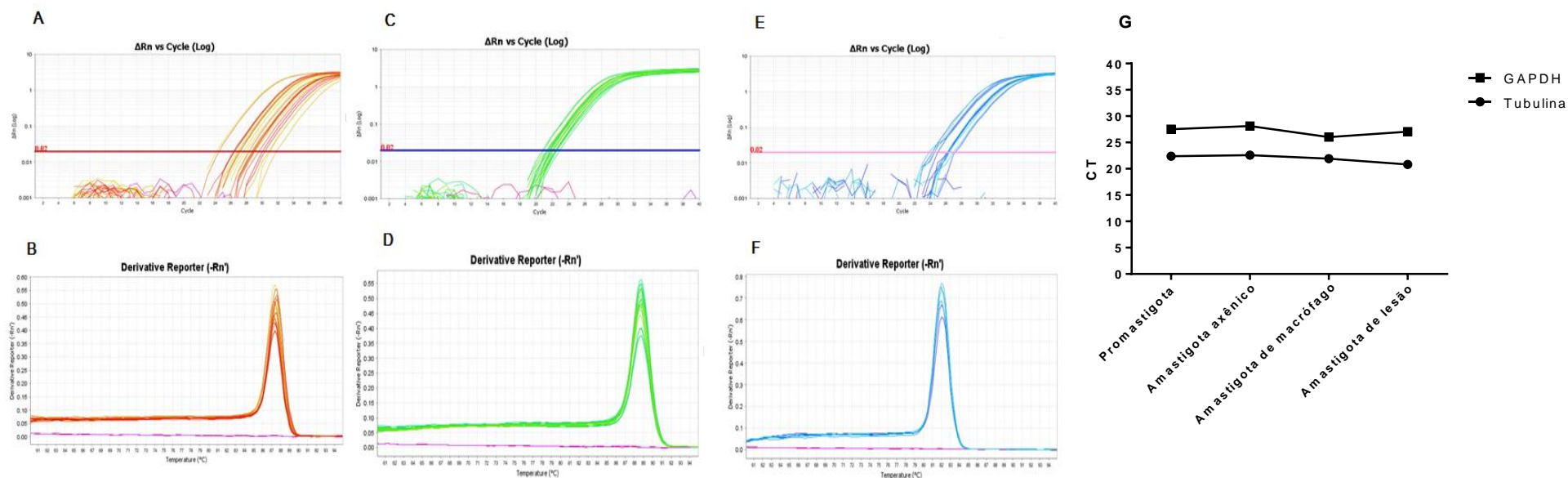


Figure 24 - Expressão dos genes alfa tubulina e GAPDH para a cepa MHOM/BR/1977/LTB0016. Em (A) Curva de amplificação da RT-qPCR para o gene da LaNTPDase-1. (B) Curva de Melting da RT-qPCR para o gene da LaNTPDase-1. (C) Curva de amplificação da RT-qPCR para o alfa tubulina. Em (D) Curva de Melting da RT-qPCR para o gene alfa tubulina. Em (E) Curva de amplificação da RT-qPCR para o gene GAPDH. Em (F) Curva de Melting da RT-qPCR para o gene GAPDH. Em (D) avaliação dos valores de CT obtidos nos experimentos de RT-qPCR para os alvos alfa-tubulina e GAPDH com diferentes formas morfológicas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

4.10. Avaliação da expressão do gene LaNTPDase-1 em promastigotas e amastigotas:

Alguns autores como Berrêdo-Pinho *et al*, 2001, Ennes-Vidal *et al*, 2011 e De Souza *et al* 2010 demonstraram que a atividade ecto-ATPásica estaria relacionada à infecção do parasito. Desse modo, avaliamos a expressão da LaNTPDase-1 em durante o crescimento de formas promastigotas e entre as diferentes formas morfológicas: formas promastigotas e amastigotas obtidas *in vitro* ou através de infecções *in vitro* em macrófagos da linhagem J774 e de lesões. Com base na sequência codificante obtida anteriormente neste trabalho, desenvolvemos um ensaio de RT-qPCR para detectar a expressão da LaNTPDase-1, a fim de avaliar a modulação deste gene em formas promastigotas e amastigotas.

A análise da expressão gênica da cepa MHOM/BR/1977/LTB0016 (Figura 25), entre os diferentes dias de cultivo não apresentou nenhuma diferença significativa em relação ao primeiro dia de cultivo.

A análise da expressão gênica da cepa IFLA/BR/1967/PH8 (Figura 25), entre os diferentes dias de cultivo foi observado um aumento na expressão desta enzima no dia 4 de cultivo de $4,3 \pm 2$ em relação ao primeiro dia.

A análise da expressão gênica da LaNTPDase-1 entre as formas promastigotas e amastigotas da cepa IFLA/BR/1967/PH8 foi bastante variável, porém estatisticamente significativa, entre as formas amastigota axênica $5,2 \pm 0,8$, amastigota derivado de macrófago $7,3 \pm 1,1$ e amastigota derivado de lesão $6,7 \pm 1,4$ quando comparados com as formas promastigotas (Figura 26 A).

A análise da expressão gênica da LaNTPDase-1 entre as formas promastigotas e amastigotas da cepa MHOM/BR/77/LTB0016 apresentou um aumento entre as formas amastigota axênica $0,8 \pm 0,47$, amastigota derivado de macrófago $2,3 \pm 0,65$ e amastigota derivado de lesão $1,0 \pm 0,55$ quando comparados com as formas promastigotas (Figura 26 B).

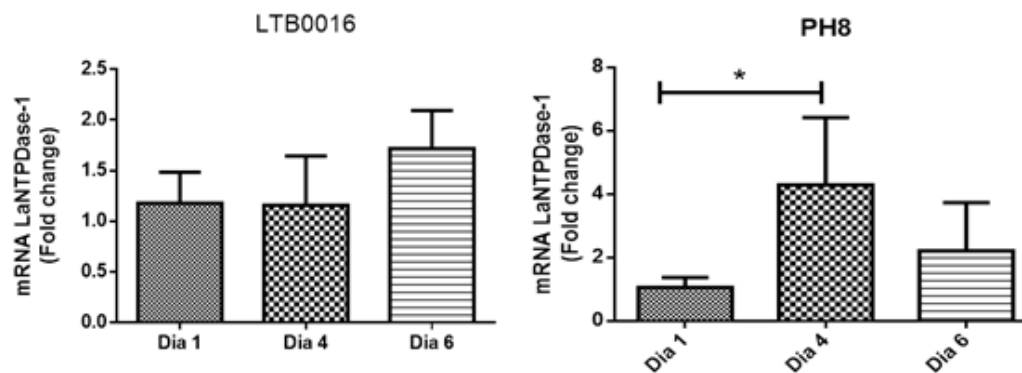


Figure 25- Expressão da LaNTPDase-1 durante uma curva de crescimento de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* das cepas MHOM/BR/77/LTB0016 e IFLA/BR/1967/PH8. A expressão do gene da LaNTPDase-1 foi estimado por RT-qPCR. Dados representam a média dos resultados de três experimentos independentes \pm desvio padrão. Análise estatística foi realizada utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney Rank Sum.* $p < 0.05$ (versus forma promastigota).

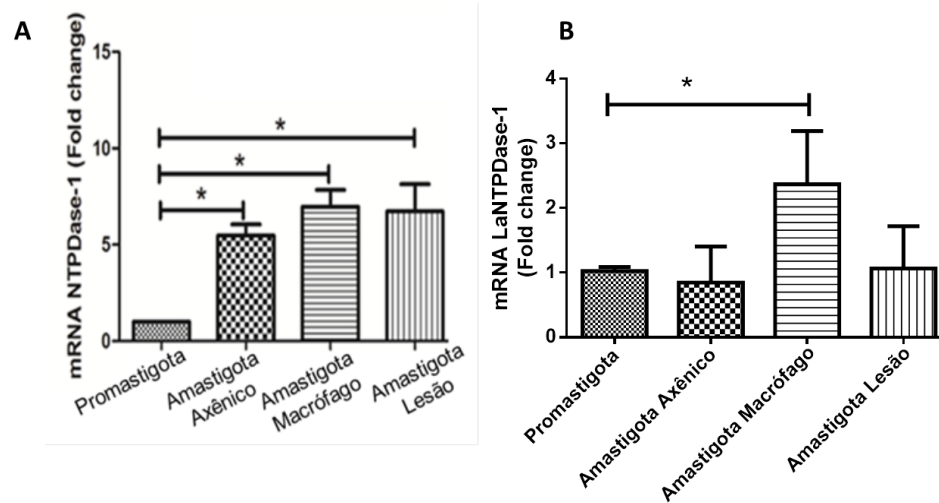


Figura 26 - Expressão da LaNTPDase-1 em diferentes formas evolutivas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* da cepa IFLA/BR/1967/PH8 (A) e da cepa MHOM/BR/77/LTB0016 (B). O RNA foi extraído das formas promastigotas, amastigotas axênicas, amastigotas derivadas de macrófago e amastigotas derivadas de lesão. A expressão do gene da LaNTPDase-1 foi estimado por RT-qPCR. Dados representam a média dos resultados de três experimentos independentes \pm desvio padrão. Análise estatística foi realizada utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney Rank Sum.* $p < 0.05$ (versus forma promastigota).

5. Discussão

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por várias espécies do gênero *Leishmania*. No Brasil, a espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* é o agente etiológico com mais ampla distribuição (de Araújo *et al*, 2014). Apesar de esta espécie ser responsável pela leishmaniose tegumentar americana (LTA) (Camara *et al*, 2011), também causa infecção com características imunopatogênicas contrastantes. Devido às limitações do tratamento atual, a leishmaniose representa ainda hoje, um sério problema na saúde pública em várias partes do mundo. Nesse sentido, a busca de novos quimioterápicos para o tratamento desta doença ainda é um grande desafio para os pesquisadores, visto que os parasitos acabam desenvolvendo também, através de vários mecanismos, resistência aos quimioterápicos mais utilizados (Kumar *et al*, 2014). A *Leishmania (Leishmania) amazonensis* atua inibindo a resposta pró-inflamatória anti-*Leishmania*, conduzindo a infecção para o pólo anérgico do espectro imunopatológico, representado pela leishmaniose cutânea difusa e uma resposta imune marcante do tipo 2 ou reguladora (Silveira *et al*, 2009).

As funções das NTPDases ainda não são totalmente conhecidas, sendo alvos de diversos estudos em diferentes organismos. Acredita-se que estas enzimas estejam relacionadas com a adesão celular, resgate de purinas, proteção contra os efeitos citolíticos, transdução de sinal, regulação da coagulação sanguínea, modulação do processo inflamatório e da resposta imune. A sinalização purinérgica envolve nucleotídeos trifosfato (NTP) e difosfato (NDP) como mensageiros extracelulares, em conjunto com receptores purinérgicos do tipo 1 (P1) e do tipo 2 (P2) (Burnstock, 2007). Em eucariotos superiores acredita-se que esta sinalização pode estar relacionada com a modulação da inflamação e da resposta imunológica (Rayah e cols, 2012; Di Virgilio, 2007). A superfície celular contém várias nucleotidases capazes de hidrolisar estes nucleotídeos extracelulares (Zimmermann, 2001). Em tripanosomatídeos, as ecto-NTPDases têm um importante papel na aquisição de purinas, na modulação da infecção parasitária e na adesão celular (De Souza *et al*, 2010; Santos *et al*, 2009; Coimbra *et al*, 2008; Meyer-Fernandes *et al*, 2004). Estudos anteriores descreveram uma atividade ecto-NTPDásica sobre a superfície externa de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, sensível aos inibidores

extracelulares tais como DIDS, Suramina e CrATP (Berrêdo-Pinho *et al*, 2001; Burnstock, 2007; Moreira *et al*, 2009). Na ausência de Mg²⁺, as células intactas são capazes de hidrolisar tanto ATP e ADP, enquanto o Mg²⁺ estimula apenas a hidrólise de ATP, o que sugere que a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* possui tanto uma dependência quanto uma independência de Mg²⁺ na atividade da ecto-NTPase. Em um trabalho anterior do nosso grupo (Ennes-Vidal *et al*, 2011), foi demonstrado que a inibição da atividade da ecto-ATPase por CrATP reduz significativamente os índices de adesão e endocítico sobre a interação de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* com o macrófago, ressaltando a importância dessas enzimas para a infectividade do parasito.

Assim, este trabalho teve como objetivo utilizar métodos moleculares para identificar a NTPDase-1 de *Leishmania Leishmania amazonensis*, a fim de contribuir com o conhecimento desta enzima para compreender seu papel no metabolismo do parasito e caracterizar as diferenças no perfil de infectividade/virulência macrófagos murinos infectados *in vitro* e por macrófago de linhagem.

Para iniciar este estudo, na ausência da anotação genoma de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, os oligonucleotídeos utilizados neste projeto, para a obtenção da sequência da NTPDase-1 em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, foram desenhados a partir do alinhamento da sequência nucleotídica desta enzima descritas em *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Figura 12), como descrito na metodologia.

A partir da CDS completa, identificamos as cinco ACRs na sequência prevista de aminoácidos, confirmando que esta enzima é uma apirase. O alinhamento da sequência identificada em *Leishmania (Leishmania) amazonensis* com as NTPDases-1 identificadas em outras espécies do gênero *Leishmania* mostrou uma elevada identidade entre eles. No entanto, para confirmar se a sequência obtida corresponde a uma NTPDase-1, um dendograma foi construída a partir das sequências de aminoácidos das NTPDases-1 e das NTPDases-2 (figura 13). Assim, observamos que a NTPDase-2, descrita apenas para a *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) infantum*, *Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*, até o momento, foi organizada em um ramo separado, indicando que a sequência estudada da *Leishmania (Leishmania) amazonensis* pertence à família da NTPDase-1. Além disso, o dendograma indicou um distanciamento importante entre as

sequências das NTPDases de diferentes subgêneros e de espécies de interesse, sugerindo um potencial para o gene da LaNTPDase-1 também na genotipagem de *Leishmania*. Entretanto, estudos mais aprofundados, e com maior número de sequências a serem alinhadas, devem ainda ser realizados para sustentar esta premissa.

A partir da sequência de aminoácidos avaliamos a estrutura tridimensional desta enzima *in silico* através de métodos comparativos, onde observamos primeiramente que a enzima em questão se trata de uma NTPDase-1, por apresentar um domínio de ligação à membrana. Observamos também que a região do sítio ativo é composto pelas 5 ACRs. Ao compararmos a estrutura da LaNTPDase-1 com o modelo de *R. norvegicus* observamos diferenças importantes, especialmente na região de ligação ao nucleotídeo. A diferença observada de quatro aminoácidos pertencentes a ACRs pode levantar a possibilidade ao projeto racional de moléculas para se ligar especificamente à enzima do parasito. A partir desta caracterização, investigações futuras utilizando mutagênese sítio-dirigida e abordagens de knockout de genes em modelos recombinantes podem contribuir para uma maior compreensão do papel desta enzima para a fisiologia do parasito, mesmo para explorar o seu potencial uso como alvo quimioterapêutico.

A expressão heteróloga da LaNTPDase-1 foi realizada utilizando dois conjuntos de oligonucleotídeos desenhados para o CDS completo desta enzima e para a sequência sem o domínio de ligação à membrana. Neste estudo, trabalhamos com o CDS completo desta enzima a fim de minimizar os efeitos da remodelagem no modelo procarioto. Portanto, avaliamos as melhores condições da indução desta enzima recombinante, a concentração da arabinose e o tempo de crescimento para obter a maior concentração desta enzima na purificação. Decidimos investir na produção da enzima recombinante para futuramente produzir um anticorpo anti-NTPDase-1 de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Isto se faz necessário devido a ausência de um anticorpo comercial específico para esta enzima, o que dificulta a realização de experimentos de imunolocalização e a dosagem específica da LaNTPDase-1 traduzida. Atualmente, utilizamos o anticorpo anti-CD39 humana, que possibilita uma reação cruzada com amostras de *Leishmania*. Porém, com o desenvolvimento de ensaios utilizando camundongos, macrófagos peritoniais e de linhagem, a utilização do mesmo se torna inviável, devido à falta de especificidade no reconhecimento das NTPDases do parasito e do hospedeiro.

As análises envolvendo as NTPDases em *Leishmania* têm sido realizadas através da medida da atividade ecto-ATPásica e ecto-ADPásica, através da dosagem de fosfato extracelular, proveniente da hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados adicionados à reação. Entretanto, estudos anteriores já demonstraram que as NTPDases não estão localizadas apenas na membrana plasmática (Samson *et al*, 2014; Fietto *et al*, 2004), mas também na membrana de diversas organelas e no citoplasma. Assim, a utilização de uma enzima purificada é necessária para uma completa caracterização molecular, como a determinação de parâmetros cinéticos de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m , sensibilidade e especificidade a inibidores etc. Devido à pequena quantidade destas enzimas nas membranas celulares do parasito, o que dificultaria a purificação da enzima nativa, a produção de uma NTPDase recombinante se torna uma alternativa promissora. Neste trabalho, avançamos com a expressão heteróloga da LaNTPDase-1, obtendo clones de *E. coli* que expressam a enzima recombinante em quantidades elevadas. Porém, a purificação da mesma será realizada futuramente.

Além disso, as duas cepas utilizadas no estudo foram cedidas pela CLIOC e esta não possui controle sobre o número de passagens *in vitro* das cepas, não havendo, portanto manutenção da virulência. De acordo com MACHADO 2014 repetidas séries de passagens *in vitro* modificam o desenvolvimento das promastigotas, alterando, por exemplo, as propriedades de virulência e diminuindo a proporção de promastigotas metacíclicas. Desse modo, antes do início dos ensaios da curva de crescimento, de infecção e a avaliação da expressão gênica foi necessário fazer uma passagem das cepas em camundongos BALB/c, na tentativa de garantir o sucesso do isolamento e homogeneização da virulência das cepas em estudo.

A observação da curva de crescimento das duas cepas de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* utilizadas neste estudo se fez necessária, pois permitiu acompanhar o perfil de cada cepa, determinando as fases exponencial e estacionária de crescimento da *Leishmania* no sistema de cultivo utilizado (Cysne-Finkelstein *et al*, 1998). Além disso, a determinação da fase estacionária, na qual predominam as promastigotas metacíclicas, era necessária, visto que esta fase possui maior potencial infectante do que o estágio de promastigotas procíclicas ou crescimento logarítmico, permitindo a infecção das células pelas cepas em estudo. A análise da curva de crescimento *in vitro* (Figuras 20) mostrou similaridade no curso temporal do crescimento de formas promastigotas das duas cepas de *Leishmania*

(Leishmania) amazonensis, que atingiram a fase estacionária no 3º dia de cultivo para a cepa IFLA/BR/1967/PH8 e o 4º dia de cultivo para a cepa MHOM/BR/1977/LTB0016, indicando uma pequena diferença quanto ao tempo de replicação celular em cultivo *in vitro*, com a cepa IFLA/BR/1967/PH8 se multiplicando mais rapidamente em meio Schneider.

Neste estudo, foi observado também o aumento da expressão da LaNTPDase-1 durante o crescimento celular da cepa IFLA/BR/1967/PH8, que foi cerca de 4 vezes maior no quarto dia de cultivo, o que corresponde à fase estacionária da curva. O mesmo não foi observado para a cepa MHOM/BR/77/LTB0016. Em 2006, Pinheiro *et al* analisaram a atividade ecto-ATPásica em *Leishmania (Leishmania) amazonensis* durante as fases do crescimento, demonstrando ser mais elevada no final da fase logarítmica e observou-se também que esta atividade é aproximadamente 10 vezes maior na forma amastigota do que na forma promastigota. Resultados semelhantes foram observados por Frasson *et al*; para o parasito *Trichomonas vaginalis*, que também é incapaz de fazer síntese de purinas *de novo*. Quando cultivado numa condição limitada de suplementação de soro, o parasito aumentou significativamente a expressão do gene. Em 2010, De Souza *et al*, avaliaram as atividades ecto-NTPDásicas em cepas virulentas e avirulentas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, observando a correlação entre as atividades ecto-nucleotidásicas e a virulência do parasito, bem como a resposta imune associada à infecção por estes parasitos. Observou-se que as cepas mais virulentas apresentavam maior atividade ecto-nucleotidásica e desencadeavam menor resposta imune do hospedeiro vertebrado, o que facilitava a infecção. Ambos os fenômenos estariam relacionados à diminuição dos níveis de ATP no meio extracelular produzida pelas ecto-nucleotidases.

Na comparação da expressão da LaNTPDase-1 entre os dois isolados avaliados nesse estudo, constatou-se uma maior variação com a cepa IFLA/BR/1967/PH8 (Figura 24 A), foi bastante variável, entre as formas amastigota axênica $5,2 \pm 0,8$, amastigota derivado de macrófago $7,3 \pm 1,1$ e amastigota derivado de lesão $6,7 \pm 1,4$ quando comparados com as formas promastigotas. Ao avaliarmos a cepa MHOM/BR/1977/LTB0016, observamos o aumento da expressão somente das formas amastigotas obtidas de macrófagos da linhagem J774. Mesmo assim, este aumento foi menos pronunciado do que na cepa IFLA/BR/1967/PH8. A importância de NTPDase-1 para a infectividade do parasito foi descrita por Ennes-Vidal *et al*,

2011 utilizando um inibidor reversível da atividade da ecto-ATPase, o CrATP. Observou-se que a inibição da atividade da ecto-ATPase por CrATP diminuiu significativamente os índices endocítico e de adesão na interação promastigotas/macrófago. Além disso, quando o composto foi adicionado durante o cultivo de formas promastigotas, houve a inibição do crescimento celular.

O mesmo perfil foi observado por *Gomes et al.*, 2015 que avaliou a adição de adenosina ao meio de cultura, ocasionando na diminuição da atividade enzimática dos promastigotas metacíclicos em relação aos nucleotídeos extracelulares, especialmente ATP. Além disso, foi observada uma diminuição de 10 vezes nas lesões e na carga de parasitária tecidual.

As imagens de microscopia óptica dos macrófagos infectados com as cepas em estudo mostram claras diferenças entre as cepas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Figura 22). Os macrófagos infectados com a cepa IFLA/BR/1967/PH8 possuem vacúolos parasitóforos grandes e bem visíveis, contendo um maior número de formas amastigotas, enquanto células infectadas pela cepa MHOM/BR/1977/LTB0016 possuem vacúolos parasitóforos menores, por vezes de difícil visualização. Quanto à determinação da porcentagem de infecção de macrófagos e o número de amastigotas intracelulares, verificou-se que houve diferença estatística para a cepa MHOM/BR/1977/LTB0016 entre 2 e 24 horas de infecção. O mesmo foi observado para a cepa IFLA/BR/1967/PH8 entre 2 e 24 horas de infecção. A contagem de amastigotas intracelulares não apresentou diferença significativa para as duas cepas avaliadas neste estudo (Figura 25 C e 26 C), talvez devido a difícil visualização das formas amastigotas.

Na comparação da porcentagem de infecção em 24 horas entre as duas cepas avaliadas nesse estudo, observou-se que a cepa IFLA/BR/1967/PH8 apresentou uma taxa de infecção de macrófagos (30,9%), quase o dobro do valor obtido para a cepa MHOM/BR/1977/LTB0016 (18,1%). Embora as duas cepas tenham sido utilizadas no presente trabalho sob as mesmas condições experimentais, as mesmas não apresentaram diferenças no número de amastigotas intracelulares. Em estudos anteriores realizados com a cepa IFLA/BR/1967/PH8 (de Souza, 2010) foram observados elevados percentuais de infecção de macrófagos e números de amastigotas/100 células, sendo esta cepa considerada a que possui maior infectividade. O mesmo perfil foi observado neste estudo, a cepa IFLA/BR/1967/PH8 e a cepa MHOM/BR/1977/LTB0016 de *Leishmania (Leishmania)*

amazonensis podem ser caracterizadas por apresentar distintos perfis de infectividade em macrófago de camundongo BALB/c, uma vez que a taxa de infecção nos macrófagos nas primeiras horas de infecção *in vitro* é maior para cepa IFLA/BR/1967/PH8 quando comparada com a cepa MHOM/BR/1977/LTB0016. Em estudos anteriores realizados com as cepas MHOM/BR/1977/LTB0016 (Bertho *et al.*, 1992; Matta *et al.*, 2010) e IFLA/BR/1967/PH8 foram observados elevados percentuais de infecção de macrófagos e números de amastigotas/100 células (MACHADO, 2014)

Em outro estudo, Gomes *et al.*, 2015 comparou o perfil de infectividade da cepa IFLA/BR/1967/PH8 e do clone 1IIIId considerado avirulento, onde foi observado que as lesões ocasionadas pelo clone 1IIIId foram pequenas e continham menos parasitas quando comparadas as lesões obtidas pela cepa IFLA/BR/1967/PH8. Ao comparar a infecção em os macrófagos da linhagem J774, a porcentagem de macrófagos infectados pelo clone 1IIIId foi significativamente menor que a observada pela cepa IFLA/BR/1967/PH8. Esses dados revelam que os macrófagos infectados não foram capazes de eliminar o parasita, como foi observado neste estudo com as cepas IFLA/BR/1967/PH8 e a cepa MHOM/BR/1977/LTB0016.

Além disso, na análise da expressão gênica durante curva de crescimento foi possível observar o mesmo perfil, onde a cepa IFLA/BR/1967/PH8 (Figura 25) apresentou um aumento na expressão no dia 4 de cultivo em relação ao primeiro dia.

A análise da expressão gênica das formas amastigotas foi bastante variável onde todas as formas amastigotas apresentaram um aumento na expressão deste gene quando comparados com as formas promastigotas (Figura 26). Ao avaliarmos o índice endocítico em 24 horas de infecção foi possível observar que esta cepa apresentou um índice de $46,6 \pm 13,4$, quase o dobro do valor obtido para a cepa MHOM/BR/1977/LTB0016, corroborando com o perfil de maior infectividade desta cepa. Em 2010, De Souza *et al.*, demonstraram que promastigotas metacíclicos cultivados por 15 passagens, apresentavam cerca de 4 vezes mais a atividade ATPásica e 5 vezes mais a atividade ADPásica quando comparado com promastigotas metacíclicos cultivados por 100 passagens no mesmo meio. Neste mesmo estudo, também foi demonstrado que camundongos inoculados com promastigotas metacíclicos cultivados por 15 passagens apresentavam uma lesão maior quando comparados com promastigotas metacíclicos cultivados por 100

passagens, reforçando a hipótese de que a ecto-NTPDase em promastigotas metacíclicos de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* pode estar relacionada com a virulência. O aumento da expressão da NTPDase observado neste projeto entre as diferentes formas morfológicas da *Leishmania* reforça a importância desta enzima na infectividade do hospedeiro vertebrado, visto que o aumento da expressão ocorre em formas amastigotas que estão presentes no hospedeiro vertebrado, como o humano.

A compreensão do papel das NTPDases em parasitos ainda possui muitas lacunas. No entanto, existem fortes evidências de que elas estejam relacionadas aos processos de infectividade e virulência dos tripanossomatídeos, sugerindo que estas enzimas possam ser bons alvos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose, uma vez que a enzima deste estudo está localizada na superfície externa das células dos parasitos (não sendo necessário que o fármaco transpasse muitas barreiras para chegar ao seu alvo), estas se mostram implicadas na sobrevivência dos parasitos, e são amplamente distribuídas entre os diferentes patógenos eucariotos de humanos, o que torna estas enzimas alvos bastante interessantes (SANSOM *et al*, 2008). No presente estudo, a caracterização molecular e análise da expressão da LaNTPDase-1 em duas cepas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, mostrou através de diferentes abordagens, a obtenção do CDS completo da LaNTPDase-1, partindo desta sequência, realizamos a modelagem tridimensional desta enzima e avaliamos o sítio ativo. Ao realizarmos a comparação da expressão gênica e a infecção em macrófagos murinos de duas cepas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, podemos observar que esta enzima desempenha um papel no metabolismo do parasito durante uma curva de crescimento e um importante papel nas formas amastigotas. O conhecimento gerado neste trabalho, em conjunto outros estudos sobre o papel das NTPDases na infectividade e virulência de parasitos, sugerem esta enzima como candidata a alvo na quimioterapia anti-leishmaniose.

6. Perspectivas

Como perspectiva deste projeto, pretendemos aprofundar o conhecimento sobre o papel da LaNTPDase-1 na infectividade de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e seu potencial na genotipagem do parasito. Para isso pretendemos purificar a LaNTPDase-1 recombinante e realizar a caracterização molecular da enzima, através da determinação dos valores de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m , especificidade de substratos nucleotídicos trifosfatados e difosfatados e sensibilidade a inibidores enzimáticos. Realizar a imunolocalização da LaNTPDase-1 em formas promastigotas e amastigotas. Realizar a superexpressão da LaNTPDase-1 em *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e avaliar a infectividade do parasito mutante em macrófagos murinos de linhagem J774.

7. Conclusões

A partir dos resultados expostos neste trabalho, podemos concluir que o parasito *Leishmania (Leishmania) amazonensis* possui o gene correspondente a uma NTPDase-1, composto por 1.278 nucleotídeos, que codifica uma proteína de 45 kDa cuja massa molecular foi confirmada com obtenção da rNTPDase-1. A partir da sequência obtida, foi possível observar a presença de 5 regiões conservadas de apirase e, devido a isso, é possível classificá-la como uma apirase. Ao comparar a sequência da NTPDase-1 de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* com a NTPDase-1 de outras espécies do gênero *Leishmania*, como *Leishmania mexicana*, *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani*, *Leishmania major* e *Leishmania braziliensis*, foi observada uma alta similaridade e identidade com estas espécies, mostrando a confiabilidade da sequência obtida e a conservação desta sequência entre as espécies deste gênero. Os ensaios *in silico* permitiram inferir que a NTPDase-1 pode estar associada à membrana plasmática do parasito por um domínio transmembranar além de apresentar particularidades importantes na região de ligação ao nucleotídeo. A cepa IFLA/BR/1967/PH8 e a cepa MHOM/BR/1977/LTB0016 *Leishmania (Leishmania) amazonensis* podem ser caracterizadas por apresentar distintos perfis de infectividade em macrófago de camundongo BALB/c, uma vez que a taxa de infecção nos macrófagos nas primeiras horas de infecção *in vitro* é maior para cepa IFLA/BR/1967/PH8 quando comparada com a cepa MHOM/BR/1977/LTB0016. Os promastigotas de ambas as cepas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, IFLA/BR/1967/PH8 e MHOM/BR/1977/LTB0016, são capazes de expressar a NTPDase-1 em cultivo *in vitro*, no entanto a expressão desta enzima é quantitativamente maior na cepa IFLA/BR/1967/PH8 que foi mais infectiva para macrófago de camundongo BALB/c. O conhecimento gerado neste trabalho, em conjunto com o que foi demonstrado em outros estudos, sugerem um potencial a ser avaliado para esta enzima como candidata a alvo na quimioterapia para tratamento da leishmaniose.

8. Referências Bibliográficas

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990, nº215, pp:403-410.

Ashford, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 2000, nº 30, pp: 12–13.

Atkinson, B., K. Dwyer, K. Enyoji, and S. C. Robson. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: potential as therapeutic targets. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 2006, nº36, pp: 217-222.

Barros, F. S.; De Menezes, L. F.; Pinheiro, A. A.; Silva, E. F.; Lopes, A. H.; De Souza, W.; Meyer-Fernandes, J. R. Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in *Entamoeba histolytica*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000, nº 15;375(2), pp:304-14.

Bates, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*. 2007, nº 37, pp: 1097–1106.

Berrêdo-Pinho, M.; Peres-Sampaio, C. E.; Chrispim, P. P.; Belmont-Firpo, R.; Lemos, A. P.; Martiny, A.; Vannier-Santos, M. A.; Meyer-Fernandes, JR. A Mg-dependent ec-to-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2001, nº 1;391(1), pp:16-24.

Bertho AL, Cysne L, Coutinho SG. Flow cytometry in the study of the interaction between murine macrophages and the protozoan parasite *Leishmania amazonensis*. *J Parasitol*. 1992 Aug; 78(4):666-71

Bissaggio, D. F.; Peres-Sampaio, C. E.; Meyer-Fernandes, J. R.; Souto-Pradón, T. Ecto-ATPase activity on the surface of *Trypanosoma cruzi* and its possible role in the para-site-host cell interaction. *Parasitology Research*, 2003, nº 91(4), pp:273-82.

Borsellino, G., M. Kleinewiefeld, D. Di Mitri, A. Sternjak, A. Diamantini, R. Giometto, S. Hopner, D. Centonze, G. Bernardi, M. L. Dell'Acqua, P. M. Rossini, L. Battistini, O. Rotzschke, and K. Falk. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3 Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007, nº 110, pp:1225–1232.

Brasil.; Atlas de leishmaniose tegumentar americana diagnóstico clínico e diferencial. Ministério da Saúde, 2006.

Brasil. Manual de Leishmaniose Tegumentar Americana, 2ª Edição, Ministério da Saúde, 2007.

Brasil. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Secretaria de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde. 2003

Burnstock, G. Purine and pyrimidine receptors. Cellular and Molecular Life Scienc-es, 2007, nº64, pp:1471–1483.

Burnstock, G. Purinergic nerves. Pharmacology. 1972, nº 24, pp:509–581.

Camara CL, Paes M, Guerra JA, Barbosa MG, Coelho C, Lima B, Brito ME, Brandão Filho SP. Characterization of *Leishmania spp.* causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. Parasitology Research, 2011, nº 108, pp: 671-7.

Cysne- Finkelstein L, Temporal RM, Alves FA, Leon LL. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of pro-mastigotes. Experimental Parasitology. 1998, nº 89(1), pp:58-62.

Coimbra ES, Gonçalves-da-Costa SC, Costa BL, Giarola NL, Rezende-Soares FA, et al. A *Leishmania (L.) amazonensis* ATP diphosphohydrolase isoform and potato apy-rase share epitopes: antigenicity and correlation with disease progression. Parasitology. 2008 v 135, nº3, pp: 327-35.

Convit J, Kerdel-Vegas f. Disseminated cutaneous leishmaniasis; inoculation to laboratory animals, electron microscopy and fluorescent antibodies studies. Arch dermatol. 1965 may;91:439-47.

Cupolillo, E.; Boite, M. C. ; Porrozzi, r. . Considerações sobre a Taxonomia do Gênero *Leishmania*. In: Fatima da Conceição Silva; Carlos Roberto Alves. (Org.). Leishmanioses do continente americano. 1ed.: Editora Fiocruz, 2014, v. , p. 25-37.

da Costa CA, Afonso LC, Toledo VP, Guimaraes TM, Nascimento E, Tavares CA, Mayrink W. Immune responses and protection induced in mice by an industrialized vaccine against American cutaneous leishmaniasis. Parassitologia. 1992 Dec;34(1-3):45-51.

Da-Cruz AM, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Coutinho Z, Machado ES, Coutinho SG. Cellular immune responses to *Leishmania braziliensis* in patients with AIDS-

associated American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000 Sep-Oct;94(5):569-71.

Deaglio, S., K. M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J. F. Chen, K. Enjyoji, J. Linden, M. Oukka, V. K. Kuchroo, T. B. Strom, and S. C. Robson. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of Experimental Medicine.* 2007, n° 204, pp:1257–1265.

de Araújo CF, Silva VM, Cronemberger-Andrade A, Aragão-França LS, Rocha VC, Santos PS, Pontes-de-Carvalho L. *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* amastigote extracts differ in their enhancement effect on *Leishmania* infection when injected intradermally. *BMC Research Notes.* 2014, n° 7(1), pp:70.

de Jesus, J. B.; de Sá Pinheiro, A. A.; Lopes, A. H, Meyer-Fernandes, J. R. An ectonucleotide ATP-diphosphohydrolase activity in *Trichomonas vaginalis* stimulated by galactose and its possible role in virulence. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung,* 2002, n° 57(9-10), pp:890-6.

DeMarco, R.; Kowaltowski, A. T.; Mortara, R. A.; and Verjovski-Almeida, S. Molecular characterization and immunolocalization of *Schistosoma mansoni* ATP-diphosphohydrolase. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 2003, n° 307, pp: 831–838.

De Souza Leite, M.; Thomaz, R.; Fonseca, F. V.; Panizzutti, R.; Vercasi, A. E.; Meyer—Fernandes, J. R. *Trypanosoma brucei*: biochemical characterization of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. *Experimental Parasitology,* 2007, n° 115(4), pp:315-23.

De Souza MA, Sabroza PC, Marzochi MC, Coutinho SG, De Souza WJ. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. 1. *Phlebotomineae* from an endemic area of indigenous human cases. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1981, Apr-Jun;76(2):161-8.

De Souza MC, De Assis E. A, Gomes R. S, Marques da Silva E. A, Melo M. N, Fietto JL, Afonso LC. The influence of ecto-nucleotidases on *Leishmania amazonensis* infection and immune response in C57B/6 mice. *Acta Tropica,* 2010, n° 115, pp: 262–269.

Di Virgilio F. Purinergic signalling in the immune system. A brief update. *Purinergic Signal,* 2007, n° 3(1-2), pp:1-3.

do Vale, E. C. S.; Furtado, T.; Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. *Anais Brasileiros De Dermatologia E Sifilografia*. 2005, nº 80(4), pp:421-8.

Dutta AK. Pursuit of medical knowledge: Charles Donovan (1863-1951) on kala-azar in India. *J Med Biogr*. 2008 May;16(2):72-6.

Enjyoji, K. J.; Sevigny, Y.; Lin, P. S.; Frenette, P. D.; Christie, J. S. Esch, and, M.; Imai, J. M.; Edelberg, H.; Rayburn, M.; Lech, D. L.; Beeler, E.; Csizmadia, D. D.; Wagner, S. C.; Robson and Rosenberg, R. D. Targeted disruption of CD39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nature Medicine*. 1999, nº 5, pp: 1010-1017.

Ennes-Vidal, V.; Castro, R. O. S.; Britto, C.; Barrabin, H.; D'ávila-Levy, C. M and Moreira, O. C. CrATP interferes in the promastigota-macrophage interaction in *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitology*. 2011, nº 138(8), pp:960-8.

Fietto, JLR, DeMarco, R, Nascimento, IP, Castro, IM, Carvalho, TMU, De Souza, W, Bahia, MT, Alves, MJM, Verjovski-Almeida, S: Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004, 316: 454–460.

Fillippini, A., R. E. Taffs, T. Agui and M. V. Sitkovsky. Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. Protection from the cytolytic effects of extracellular ATP. *The Journal of Biological Chemistry*. 1990, nº 265(1), pp: 334-40.

Fonseca, F. V.; Fonseca de Souza, A. L.; Mariano, A. C.; Entringer, P. F.; Gondim, K. C.; and Meyer-Fernandes, J. R.; *Trypanosoma rangeli*: characterization of a Mg-dependent ecto ATP-diphosphohydrolase activity. *Experimental Parasitology*. 2006, nº 112, pp:76–84.

Gachet, C. Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2006, nº 46, pp: 277-300.

Garcia-Hernandez R, Manzano JI, Castanys S, Gamarro F. *Leishmania donovani* develops resistance to drug combinations. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2012, v6 | nº 12, e1974.

Goding, J. W.; Ecto-enzymes: physiology meets pathology. *Journal of Leukocyte Biology*. 2000, nº 67(3), pp:285-311.

Gontijo B, de Carvalho Mde L. American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003 Jan-Feb;36(1):71-80.

Gomes R. S.; de Carvalho, L. C. F.; Vasconcellos R. S.; Juliana Lopes Rangel Fietto J. L. R.; Crocco-Afonso L. C. E-NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) of *Leishmania amazonensis* inhibits macrophage activation. *Microbes and Infection*, 2015 1-9.

Handa, M.; Guidotti, G.; Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996, nº 26;218(3), pp:916-23.

Handman, E., Bullen, D.V.R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology*. 2002, nº 18, pp: 332–334.

Herwaldt, B. L. Leishmaniasis. *The Lancet*. 1999, nº 354, pp: 1191–1199.

Jijon H. B.; Walker J.; Hoentjen, F.; Diaz, H.; Ewaschuk, J.; Jobin, C.; Madsen, K. L. Adenosine is a negative regulator of NF-kappaB and MAPK signaling in human intestinal epithelial cells. *Cellular Immunology*. 2005, nº 237(2), pp:86-95.

Kikuchi, T.; Furuta, T.; and Kojima, S. Membrane localization and demonstration of isoforms of nucleoside triphosphate hydrolase from *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*. 2001, nº 122, pp:15–23.

Killick-Kencrick, R. and M. Killick-Kendrick: Biology of sandy fly vectors of mediterranean canine leishmaniasis. In: Killick-Kendrick, R. (ed.): canine leishmaniasis an update. *Proc. Int. Can. Leishm. Forum, Barcelona, Spain, Intervet Int.* 1999;26-31.

Kumar R. and Engwerda C. Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clinical & Translational Immunology*. 2014, nº 3, e13.

Lainson, R.. *Leishmania* e leishmaniose com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Revista Paraense de Medicina*. 1997, nº 11, pp: 29-40.

Lainson, R., Shaw, J. J. Evolution, classification and geographic distribution. *Biology and epidemiology*. 1987, pp. 1-120.

Lainson, R., Shaw, J. J. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. *British Medical Bulletin*. 1972, nº 28, pp: 44-48.

Lessa MM, Lessa HA, Castro TW, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, Carvalho EM. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2007, Nov-Dec;73(6):843-7.

Machado, Michelle Menezes. Análise de diferentes cepas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* quanto a infectividade/virulência e perfil de citocinas e quimiocinas produzidas por macrófagos

murinos infectados. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária). FIOCRUZ. Rio de Janeiro. 2014

Marsden PD, Netto EM, Badaró R, Cuba CA, Costa JL, Barreto AC. Apparent cure of a difficult treatment problem in a patient with mucosal leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1986 Mar;35(2):449.

Marr, J. J.; Berens, R. L.; Nelson, D. J. Purine metabolism in *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis*. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1978, nº 1;544(2), pp:360-71.

Marques-da-Silva, E. A, Oliveira, J. C, Figueiredo, A. B, Lima Junior, D. S, Carneiro, C. M., Fietto, J. L. R, Afonso, L. C. C. Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. *Microbes and Infection.* 2008, v. 10, p. 850-857.

Matta NE, Cysne-Finkelstein L, Machado GMC, Da-Cruz AM, Leon L. Differences in the antigenic profile and infectivity of murine macrophages of *Leishmania* (Viannia) parasites. *J. Parasitol.* 2010 Jun; 96(3):509-15.

Meyer-Fernandes JR, Saad-Nehme, J Peres-Sampaio CE, Belmont-Firpo R, Bisaggio DF et al. A Mg-dependent ecto-ATPase is increased in the infective stages of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research.* 2004, nº 93, pp:41–50.

Moreira OC, Rios PF, Esteves F.F, Meyer-Fernandes JR and Barrabin H. CrATP as a new inhibitor of ecto-ATPases of trypanosomatids. *Parasitology.* 2009, nº 136, pp:5–44.

Musa AM, Khalil EA, Mahgoub FA, Elgawi SH, Modabber F, Elkadaru AE, Aboud MH, Noazin S, Ghalib HW, El-Hassan AM; Leishmaniasis Research Group/Sudan. Immunochemotherapy of persistent post-kala-azar dermal leishmaniasis: a novel approach to treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008 Jan;102(1):58-63.

Muskus CE, Marín Villa M. Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*. *Biomedica.* 2002 Jun;22(2):167-77.

Nakaar, V.; Beckers, C. J.; Polotsky, V.; Joiner, K. A. Basis for substrate specificity of the *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 1998, nº 97, pp: 209-20.

Nakaar, V., D. Bermudes, K. R. Peck, and K. A. Joiner. Upstream elements required for expression of nucleoside triphosphate hydrolase genes of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 1998, nº 92, pp:229–239.

Paletta-Silva, R.; Vieira, D. P.; Vieira-Bernardo, R.; Majerowicz, D.; Gondim, K. C.; Vannier-Santos, M. A.; Lopes, A. H.; Meyer-Fernandes, J. R. *Leishmania amazonensis*: Characterization of an ecto-3'-nucleotidase activity and its possible role in virulence. *Experimental Parasitology*. 2011, v:129 fasc:3 pp:277-283.

Papanikolaou, A.; Papafotika, A.; Murphy, C.; Papamarcaki, T.; Tsolas, O.; Drab, M.; Kurzchalia, T. V.; Kasper, M.; Christoforidis, S. Cholesterol-dependent lipid assemblies regulate the activity of the ecto-nucleotidase CD39. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005, nº15;280(28), pp:26406-14.

Penido, M. L. O; Resende, D. M; Vianello, M. A ; da Silveira Bordin, F. H; Jacinto, A. A.; Dias, W. D; Montesano, M. A; Nelson, D. L; Coelho, P. M. Z; Vasconcelos, E. G. A new series of schistosomicide drugs, the alkylaminoalkanethiosulfuric acids, partially inhibit the activity of *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. *European Journal of Pharmacology*. 2007, nº 10;570(1-3), pp:10-7.

Pereira, B. A, Britto, C, Alves, C. R. Expression of infection-related genes in parasites and host during murine experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Microbial Pathogenesis*. 2012, nº 52(2), pp:101-8.

Pinheiro C. M.; Martins-Duarte, E. S.; Ferraro, R. B.; Fonseca de Souza, A. L.; Gomes, M. T.; Lopes, A. H.; Vannier-Santos, M. A.; Santos, A. L.; Meyer-Fernandes, J. R. *Leishmania amazonensis*: Biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. *Experimental Parasitology*. 2006, nº114(1), pp:16-25.

Ralevic, V. e G. Burnstock. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews*. 1998, v50, n.3, pp: 413-492.

Ralph Lainson. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia, *Rev Pan-Amaz Saude*. 2010, v.1 n.2 Ananin-deua jun.

Ramesh V1, Mukherjee A. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Int J Dermatol*. 1995 Feb;34(2):85-91.

Rayah A, Kanellopoulos JM, Di Virgilio F. P2 receptors and immunity. *Microbes and Infection*. 2012, v 14, nº14, pp:1254-62.

REY; LUÍS. Bases da Parasitologia Médica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1992.

Riou, G.; Delain, E.. Electron microscopy of the circular kinetoplastic DNA from *Trypanosoma cruzi*: occurrence of catenated forms. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1969, nº62, pp: 210-217,

Robson, S. C., J. Sevigny, and H. Zimmermann. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. Purinergic Signalling. 2006, pp: 2409-430.

Santos RF, Pôssa MA., Bastos MS, Guedes PM, Almeida MR, et al. Influence of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase Activity on *Trypanosoma cruzi* Infectivity and Virulence. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2009, v 3, nº 3, pp:387.

Fiona M. Sansom, Simon C. Robson, and Elizabeth L. Hartland. Possible Effects of Microbial Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolases on Host-Pathogen Interactions. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2008, nº 72(4), pp: 765–781.

Sansom, F.M, Ralton, J.E, Sernee, M.F, Cohen, A.M, Hooker, D.J, Hartland, E.L, Naderer, T, McConville, M.J. 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. 2014, Volume 8, Issue 12, e3402.

Schubach A, Marzochi MC, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Araujo ML, Oliveira AL, Pacheco RS, Momen H, Conceicao-Silva F, Coutinho SG, Marzochi KB. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. Am J Trop Med Hyg. 1998 Jun;58(6):824-7.

Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2004, v 99,nº3, pp:239-51.

Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2004; 99(3):239-51.

Tamura K, Dudley, J, Nei, M and Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genet-ics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution. 2007, nº 24, pp: 1596-1599.

Vasconcelos, E. G.; Nascimento, P. S.; Meirelles, M. N.; Verjovski-Almeida, S.; Ferreira, S. T. Characterization and localization of an ATP-diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1993, nº 58(2), pp:205-14.

Vasconcellos RDS, Mariotini-Moura C, Gomes RS, Serafim TD, Firmino RC, Bastos MS, de Castro FF, de Oliveira CM, Borges-Pereira L, de Souza ACA, de Souza RF, Gómez GAT, Pinheiro AC, Maciel TEF, Silva-Júnior A, Bressan GC, Almeida MR, Baqui MMA, Afonso LCC, Fietto JLR. *Leishmania infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 is an Apyrase Involved in Macrophage Infection and Expressed in Infected Dogs. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2014, Volume 8, Issue 11, e3309.

World Health Organization – WHO Leishmaniasis. Disponível em: < <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> >. Acesso em: Acesso em 15 jul. 2014.

Zimmermann, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Development Research*. 2001, nº 52, pp:44–56.

9. ANEXOS.



Instituto Oswaldo Cruz

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/ IOC

LICENÇA

L-052/2015

Certificamos que o protocolo (CEUA/IOC-045/2015), intitulado "Estudos imunológicos e de quimioterapia na infecção experimental por *Leishmania* sp", sob a responsabilidade de CARLOS ROBERTO ALVES atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 01/01/2020 e inclui o uso total de:

Camundongo (*Mus musculus*), cepa:

BALB/c – 2245 animais fêmeas – 5-7 semanas – (\pm 20g)

CBA – 585 animais fêmeas – 5-7 semanas – (\pm 20g)

Coelho, cepa:

Oryctolagus cuniculus – 6 animais machos – 12-16 semanas – (3500g)

Hamster, cepa:

Golden Hamster – 60 animais machos – 10-15 semanas – (100 - 200g)

Observação: Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

Rio de Janeiro, 30 de novembro de 2015.

Flávio Alves Lara

Coordenador Adjunto da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz

Fundação Oswaldo Cruz

FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz/IOC-Instituto Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4305 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil
CEP- 21060-300 Tel (21) 2463.1044