

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM IMUNOLOGIA / GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Fabília Aparecida Rezende Soares

**ATP DIFOSFOHIDROLASE EM FORMAS PROMASTIGOTAS DE
Leishmania (Viannia) braziliensis: CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE
DE DOMÍNIOS COMPARTILHADOS COM A APIRASE DE *Solanum
tuberosum***

Juiz de Fora, MG

2007

FABRÍCIA APARECIDA REZENDE SOARES

**ATP DIFOSFOHIDROLASE EM FORMAS PROMASTIGOTAS DE
Leishmania (Viannia) braziliensis: CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE
DE DOMÍNIOS COMPARTILHADOS COM A APIRASE DE *Solanum
tuberosum***

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de concentração em Imunologia.

Orientadora: Dra. Eveline Gomes Vasconcelos

Co-orientador: Dr. Marcos José Marques

Juiz de Fora, MG

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

REZENDE-SOARES, Fabrícia Aparecida

ATP DIFOSFOHIDROLASE EM FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania (Viannia) braziliensis*: CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DE DOMÍNIOS COMPARTILHADOS COM A APIRASE DE *Solanum tuberosum*. Juiz de Fora/ Minas Gerais, 2007.

91 páginas.

Dissertação de Mestrado - Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).
Orientadora: Dra. Vasconcelos, Eveline Gomes

Palavras-chaves: ATP difosfohidrolase, *L. braziliensis*, apirase de batata.

**ATP DIFOSFOHIDROLASE EM FORMAS PROMASTIGOTAS DE
Leishmania (Viannia) braziliensis: CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE
DE DOMÍNIOS COMPARTILHADOS COM A APIRASE DE *Solanum
tuberosum***

FABRÍCIA APARECIDA REZENDE SOARES

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso Pós-graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ____/____/____.

Banca examinadora:

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

Profa. Dra. Carla Mônica Pinheiro
Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ
(Membro externo)

Profa. Dra. Elaine Soares Coimbra
Universidade Federal de Juiz de Fora
(Membro interno)

**Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode
começar agora e fazer um novo fim.**

“Chico Xavier”

Dedico:

**Ao meu marido, Leonardo;
aos meus pais, Ana e Joaquim;
e aos meus irmãos, Fábio e Flávio.**

Amo vocês!

Agradeço:

A Deus, por toda força, sabedoria e conforto nas horas mais difíceis e necessárias;

A minha família: meu marido Leonardo; meus pais **Ana e Joaquim** e meus irmãos **Fábio e Flávio**; meus maiores incentivadores;

A minha segunda família, **Manoel, Fátima, Geny e Dinha**, pelo apoio em tudo que eu precisasse;

A minha orientadora e amiga, **Dra. Eveline Gomes Vasconcelos**, pela oportunidade, compreensão, ajuda incondicional e confiança depositada em mim;

Ao prof. **Dr. Marcos José Marques** pelas colaborações na elaboração dessa tese;

Ao prof. **Dr. Octávio Luiz Franco** pela ajuda nos trabalhos de modelagem molecular;

Aos membros da minha banca de qualificação, **Dra. Maria Aparecida de Souza** e **Dra. Ana Paula Ferreira** pelas valiosas sugestões;

A prof. **Dra. Carla Mônica Pinheiro** pelas “aulas particulares de bioquímica” e pela amizade;

Aos **professores e técnicos do Departamento de Bioquímica**, sempre dispostos a ajudar;

Aos **amigos da primeira turma do mestrado em Ciências Biológicas**, em especial à **Liliane** pela amizade;

Aos **amigos do Laboratório de Bioquímica**, em especial à **Gabriane**, pela ajuda em diversos experimentos;

As amigas **Aline e Eveline**, pelos divertidos momentos de descontração;

E todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização dessa dissertação!

RESUMO

Uma ATP difosfohidrolase foi identificada em promastigotas de *Leishmania braziliensis*, e resultado similar foi encontrado em outra cepa de Leishmania, pertencente ao Complexo *Leishmania braziliensis*. Hidrólise de nucleosídeos di- e trifosfatados sob estímulo de íons bivalentes, associada à inibição por azida sódica, sugeriram que atividade ATP difosfohidrolásica está presente em promastigotas. Western blots desenvolvidos com anticorpos anti-apirase de batata produzidos em coelho revelaram bandas de 48 e 43 kDa, possivelmente sub-unidades da mesma proteína. Estes anticorpos imobilizados em Proteína A-Sepharose depletaram aproximadamente 85% da atividade ATPásica ou ADPásica da ATP difosfohidrolase solubilizada em C₁₂E₉. O complexo imunoprecipitado (resina-anticorpo-antígeno) foi separado por SDS-PAGE. Através de western blots desenvolvidos com anticorpos anti-apirase de batata produzidos em camundongos, a mesma banda de 48 kDa foi identificada nas duas cepas, confirmando que as proteínas do parasito e da batata compartilham epítomos. Além disso, o peso molecular coincidente sugeriu que esta ATP difosfohidrolase corresponde a um nucleosídeo difosfatase identificada no genoma de *L. braziliensis* como pertencente à família das NTPDases. Estreita relação estrutural e evolucionária foram então demonstradas entre a apirase de batata e a NDPase de *L. braziliensis* por cladograma, alinhamento de seqüências de aminoácidos, predição de epítomos e modelagem molecular. Domínios específicos parecem estar potencialmente envolvidos na resposta imune do hospedeiro, conservados entre estes diferentes organismos. Devido a esta imunoreatividade cruzada observada entre a apirase de batata e a ATP difosfohidrolase de *L. braziliensis*, também sugerido por análises *in silico*, western blots foram desenvolvidos com soros de pacientes com LTA, e os resultados sugeriram que estes epítomos compartilhados são antigênicos para o humano. Os níveis de anticorpos contra a proteína vegetal ou contra o homogeneizado de *L. braziliensis* foram então analisados em 21 amostras de soros de pacientes com LTA. Aproximadamente 84% deles têm soropositividade de IgG para Lb ou apirase de batata. Correlação positiva foi observada entre os níveis de IgG e os níveis elevados dos subtipos IgG1 e IgG3 contra Lb, ambos com 76% de soropositividade em pacientes com LTA. Interessantemente, aumentos significativos dos níveis de IgG1 (71% de soropositividade) e IgG3 (43% soropositividade) contra a apirase de batata

foram também observados. Elevada soropositividade de IgG4 para Lb (62%) e apirase de batata (48%), mas não de IgG2 (<24%), evidenciaram que a ATP difosfohidrolase do parasito é também capaz de estimular este subtipo de IgG. Soropositividade de IgA para Lb ou apirase de batata foi de 62% e 14%, respectivamente, enquanto para IgM ou IgE foi baixa em ambas preparações (<14%). Estes resultados sugerem que os domínios compartilhados entre a apirase de batata e a ATP difosfohidrolase de *L. braziliensis* contribuem com a elevação de IgG contra antígenos de promastigota, associada a maior produção de IgG1, IgG3 e IgG4. Esta é a primeira demonstração de uma ATP difosfohidrolase ativa em promastigotas de *L. braziliensis*, de sua imunoreatividade cruzada com anticorpos anti-apirase de batata, e de propriedades antigênicas dos domínios conservados entre elas em pacientes com LTA. Estudos destes domínios compartilhados poderão levar ao desenvolvimento de novas drogas, marcadores moleculares ou vacinas.

Palavras – chave: ATP difosfohidrolase, *L. braziliensis*, Leishmaniose Tegumentar Americana.

ABSTRACT

ATP diphosphohydrolase was identified in *Leishmania braziliensis* promastigote, and similar result was found in other *Leishmania* strain, typified as belonging to the *Leishmania braziliensis* Complex. The significant hydrolysis of di- or triphosphate nucleosides upon bivalent metal ion stimulus, associated to the inhibition promoted by sodium azide, suggested strongly that ATP diphosphohydrolase activity is present in promastigote preparations. Western blots developed with rabbit polyclonal anti-potato apyrase revealed bands of 48 and 43 kDa, possibly subunits of the same protein. These antibodies immobilized on Protein A-Sepharose depleted about 85% of the ATPase or ADPase activity from C₁₂E₉-solubilized ATP diphosphohydrolase. The immunoprecipitated resin-rabbit antibody-antigen complex was separated by SDS-PAGE, and Western blots developed with mouse polyclonal anti-potato apyrase antibodies identify the same 48 kDa band in the two promastigote strains, confirming that parasite and vegetable proteins share epitopes. Furthermore, the coincident molecular weight suggested that this active ATP diphosphohydrolase corresponds to the putative nucleoside diphosphatase identified in *L. braziliensis* genome as belonging to NTPDase family, whose amino acid sequence was recently deposited in GeneBank database from NCBI. Evolutionary and closer structural relationships were then demonstrated between potato apyrase and *Leishmania braziliensis* NDPase by phylogenetic analysis, alignment of amino acid sequences, peptides prediction and molecular modeling. Specific protein domains are suggested to be potentially involved in the immune response. They also seem to be conserved during host and parasites co-evolution. Due to this cross-immunoreactivity between potato apyrase and ATP diphosphohydrolase from *Leishmania (V.) braziliensis* promastigotes, also suggested by *in silico* analyses, Western blots were developed with antibody present in sera from patients with American cutaneous leishmaniasis (ACL), and the results suggested that these shared epitopes are antigenic for host human. The antibody levels against the vegetable protein or against *Leishmania braziliensis* promastigote antigens preparation were then analyzed in 21 serum samples from patients with ACL. About 84% of them have IgG seropositivity for *L. braziliensis* promastigote antigens (Lb) or potato apyrase. Positive correlation was observed between IgG and the elevated IgG1 or IgG3 subtypes levels against Lb, both subtypes com 76% seropositivity in ACL patients. Interestingly, significant elevations of the IgG1 (71%

seropositivity) and IgG3 (43% seropositivity) levels against potato apyrase were also observed. High IgG4 seropositivity for both Lb (62%) and potato apyrase (48%), but not of IgG2 (<24%), evidenced that parasite ATP diphosphohydrolase is also capable to stimulate this IgG subtype. IgA seropositivity for Lb or potato apyrase was 62% and 14%, respectively, while IgM or IgE antibody seropositivity was low for both preparations (<14%). These results suggest that the domains shared between potato apyrase and *Leishmania braziliensis* ATP diphosphohydrolase contribute with IgG antibody level elevation against promastigote antigens, associated to higher IgG1, IgG3 and IgG4 subtype production. It is the first demonstration of an active ATP diphosphohydrolase in *Leishmania braziliensis* promastigote form, of its cross-immunoreactivity with anti-potato apyrase antibody, and antigenic properties of conserved domains in ACL patients. Further studies of these shared domains could lead to the development of new drugs targets, molecular markers or implementation of vaccines.

Key-words: ATP diphosphohydrolase, *L. braziliensis*, American Tegumentary Leishmaniasis

LISTA DE FIGURAS

Figura I: Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea no mundo.....	18
Figura II: Evolução dos casos de LTA no Brasil.....	19
Figura III: Ciclo de vida das espécies de <i>Leishmania</i> sp.....	21
Figura IV: Classificação clínica da LTA.....	22
Figura V: Formas de polarização da LTA.....	23
Figura VI: Aspectos imunológicos das formas polarizadas da LTA.....	28
Figura VII: Modelagem estrutural das NTPDases de mamíferos.....	30
Figura VIII: Localização ultraestrutural da atividade ATP difosfohidrolásica de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	31
Figura 1. Imunoreatividade cruzada entre ATP difosfohidrolase de formas promastigotas e anticorpos anti-apirase de batata.....	47
Figura 2: Cladograma representando a distância filogenética entre as ATP difosfohidrolases de diferentes organismos.....	49
Figura 3: Alinhamento da estrutura primária da apirase de batata, ATP difosfohidrolase de parasitos e humanos.....	52
Figura 4: Modelo molecular da apirase de <i>S. tuberosum</i> , da NDPase de <i>L. braziliensis</i> , e da superposição das duas proteínas.....	54
Figura 5: Imunoreatividade cruzada entre a apirase de batata e soros de pacientes com leishmaniose cutânea.....	56
Figura 6: Níveis de anticorpos em pacientes com leishmaniose cutânea (ACL).....	57
Figura 7: Níveis de subtipos de IgG em pacientes com leishmaniose cutânea (ACL).....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Medida da atividade para substratos específicos em preparação de formas promastigotas de <i>Leishmania</i> sp.....	44
Tabela 2: Efeitos de inibidores na hidrólise da ATP em preparação de formas promastigotas de <i>Leishmania</i> sp.....	45
Tabela 3: Efeitos do detergente não-iônico C ₁₂ E ₉ na atividade ATP difosfohidrolásica da preparação de formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	45
Tabela 4: Depleção da atividade ATP difosfohidrolásica solubilizada em C12E9 da preparação de promastigotas <i>L. (V.) braziliensis</i> (MHOM/BR/1975/M2903) por anticorpos policlonais anti-apirase de batata.....	46
Tabela 5: Predição teórica de peptídeos na seqüência de aminoácidos da NPDase de <i>L. braziliensis</i> , homólogas com as regiões da apirase de batata.....	51

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Carta da Comissão de Ética autorizando o trabalho com soro de pacientes com LTA.....82

Anexo 2: Artigo: COIMBRA, E. S.; GONÇALVES DA COSTA, S. C.; COSTA, B. L. S.; GIAROLA, N. L. L.; SOARES, F. A. R.; FERREIRA, A. P.; SOUZA, C. S. F.; ABREU-SILVA, A. L.; VASCONCELOS, E. G. (2008). A *Leishmania (L.) amazonensis* ATP diphosphohydrolase isoform and potato apyrase share epitopes: antigenicity and correlation with disease progression. *Parasitology* 135, doi: 10.1017/S0031182007003927.....83

ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs.....	Absorbância
ADP.....	Difosfato de adenosina
ACRs.....	Regiões Conservadas de Apirase
AIDS.....	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AMP.....	Monofosfato de adenosina
ATP.....	Trifosfato de adenosina
dC.....	depois de Cristo
DO.....	Densidade Óptica
EDTA.....	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA.....	Ácido etilenoglicol tetra-acético
ELISA.....	Ensaio Imunoenzimático
E-NTPDase.....	Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase
HLA.....	Antígeno leucocitário humano
IL.....	Interleucina
IFN- γ	Interferon gama
Ig.....	Imunoglobulina
IRM.....	Intradermorreação de Montenegro
kDa.....	quiloDaltons
LCD.....	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL.....	Leishmaniose Cutânea Localizada
LCM.....	Leishmaniose Mucocutânea
LTA.....	Leishmaniose Tegumentar Americana
LT.....	Leishmaniose Tegumentar
MOPS.....	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
NTPDase.....	Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase
OMS.....	Organização Mundial de Saúde
Page.....	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PCR.....	Reação em cadeia da polimerase
PBS.....	Tampão fosfato salina
RIFI.....	Reação de Imunofluorescência Indireta
SDS.....	Dodecil sulfato de sódio
SUCEN.....	Superintendência de Controle de Endemias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Leishmaniose Tegumentar Americana.....	18
1.2 Agente etiológico, vetor e ciclo biológico.....	20
1.3 Doença, diagnóstico e tratamento.....	22
1.4 Aspectos imunológicos da LTA.....	26
1.5 ATP difosfohidrolase.....	29
2 OBJETIVOS GERAIS.....	33
2.1 Objetivos Específicos.....	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Reagentes.....	34
3.2 Cultivo e preparação de amostras de promastigotas.....	34
3.3 Dosagem de proteínas.....	35
3.4 Dosagem enzimática da preparação de promastigotas.....	35
3.5 Purificação da apirase de batata e obtenção de soro imune anti- apirase de batata.....	36
3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida e western blots.....	36
3.7 Solubilização da preparação de promastigotas.....	37
3.8 Ensaio de imunoprecipitação.....	38
3.9 Análises <i>in silico</i>	38
3.10 Seleção de soros de pacientes com leishmaniose cutânea.....	40
3.11 Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	40
3.12 Análises estatísticas dos resultados.....	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa crônica, não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que são veiculados através da picada de insetos vetores, os flebotomíneos. Essa patogênese acomete as estruturas da pele e cartilagens da nasofaringe, de forma localizada ou difusa. É primariamente uma infecção de caráter zoonótico, envolvendo uma grande variedade de mamíferos silvestres. Os animais domesticados e o homem acabam sendo envolvidos secundariamente (ASHFORD, 1997).

A LTA, assim como outras formas de leishmaniose, acompanha o homem desde a Antigüidade, existindo relatos e descrições encontrados na literatura a partir do século I d.C. (CAMARGO e BARCINSKI, 2003). Hoje, segundo estimativa da Organização Mundial de Saúde, a leishmaniose cutânea é uma doença endêmica que afeta populações de 70 países, sendo que 90% ocorrem no Irã, Arábia Saudita, Síria, Afeganistão, Brasil, Peru, Argélia e Paquistão (Figura I) (OMS, 2004).



Figura I: Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea no mundo. Fonte: Organização Mundial de saúde (OMS), 2004.

No Brasil, a LTA é conhecida por vários nomes, tais como “úlceras de Bauru” ou “ferida brava”. Sua distribuição é ampla em todo o território nacional, onde atualmente todos os Estados federativos têm registros da enfermidade. Surto epidemiológicos têm ocorrido nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e mais recentemente, na região Amazônica, relacionada ao processo predatório de colonização (GONTIJO e CARVALHO, 2003). Nos últimos anos, o Ministério da Saúde registrou média anual de 35 mil novos casos de LTA no país. A figura II ilustra as taxas de ocorrência da doença no Brasil.

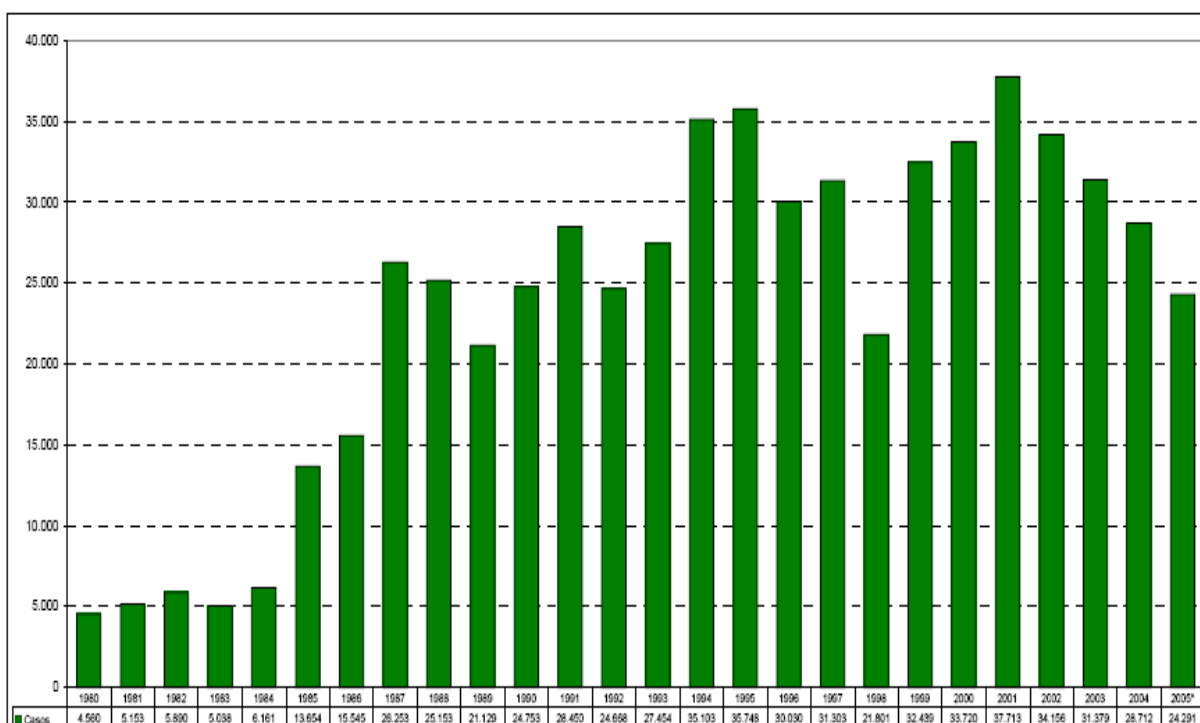


Figura II: Evolução de casos de LTA de 1980 a 2005. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007.

Não só no Brasil, assim como em outros países do Novo Mundo, a LTA constitui um grande problema de saúde pública. Sua importância reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, causando morbidade e mortalidade, mas também na possibilidade da doença assumir formas que podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e também incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo (GONTIJO e CARVALHO, 2003).

Além disso, com o surgimento da AIDS, a leishmaniose tem emergido como uma infecção secundária em indivíduos imunocomprometidos, diminuindo a qualidade e a expectativa de vida destes pacientes (ALVAR *et al.*, 1997).

1.2 AGENTE ETIOLÓGICO, VETOR E CICLO BIOLÓGICO

O gênero *Leishmania* é constituído por protozoários digenéticos, que passam parte do seu ciclo de vida no intestino do inseto flebotomíneo e a outra parte do ciclo ocorre nos tecidos do hospedeiro vertebrado (KILLICK-KENDRICK, 1999). Estes parasitos são pertencentes à família Trypanosomatidae (LEVINE *et al.*, 1980), e apresentam dois estágios morfológicamente distintos: as formas promastigota e amastigota (NEVES, 1995).

Os amastigotas apresentam forma ovóide, não possuem flagelo livre e se multiplicam por divisão binária simples. São encontradas nos fagolisossomos (vacúolo fagocitário) das células dos hospedeiros vertebrados. O baixo pH destes compartimentos não constitui um problema, visto que os parasitos são acidófilos e possuem mecanismos de escape que os protegem das enzimas lisossomais (NEVES, 1995; ASHFORD e BATES, 1998).

Os promastigotas apresentam forma alongada, cinetoplasto anterior ao núcleo, flagelo livre e longo, saindo da extremidade anterior, permitindo motilidade ao parasito. Também se multiplicam por divisão binária simples. São encontradas no trato digestivo do hospedeiro invertebrado. Durante seu desenvolvimento no flebotomíneo, as distintas espécies de *Leishmania* sp. podem sofrer transformações morfológicas diferentes, mas no final, todas se transformam em formas promastigotas infectantes, deslocando para o aparelho bucal do inseto (NEVES, 1995; ASHFORD e BATES, 1998).

Gaspar Vianna, em 1911, propôs a denominação de *Leishmania braziliensis* para o agente específico da LTA no Brasil. Entretanto, até o momento, já foram descritas sete espécies de *Leishmania* sp. pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, identificadas no Brasil como causadoras de LTA humana: Subgênero *Viannia*: *L. (Viannia) braziliensis*; *L. (Viannia) guyanensis*; *L. (Viannia) lainsoni*; *L. (Viannia) naiffi*; *L. (Viannia) shawi*; *L. (Viannia) lindenberg*. Subgênero *Leishmania*: *L. (Leishmania) amazonensis*.

A *Leishmania* sp. é transmitida por flebotomíneos, que constituem um grupo de insetos hematófagos com a seguinte posição sistemática (KILLICK-KENDRICK, 1990): Ordem DÍPTERA; Família PSYCHODIDAE; Sub-Família PHLEBOTOMINAE; Gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*.

Os flebotomíneos são insetos de pequeno porte, apresentando em seu corpo intensa pilosidade. Têm como característica o vôo saltitante e a manutenção das asas eretas, mesmo em repouso, ao contrário dos outros dípteros. Somente as fêmeas são hematófagas e possuem adaptações no aparelho bucal para picar a pele de vertebrados e sugar o sangue. Apresentam vários nomes populares, como mosquito palha, asa dura, asa branca, tatuquira, birigui, cangalha, cangalhinha, ligeirinho, péla-égua e etc (BASANO e CAMARGO, 2004).

Durante a alimentação sanguínea, o inseto pode ocasionalmente ingerir formas amastigotas do gênero *Leishmania* sp. juntamente com o sangue infectado do vertebrado. As formas amastigotas ingeridas diferenciam-se em formas promastigotas, sofrendo modificações morfológicas e bioquímicas, até tornarem-se infectivas (promastigota metacíclica). Em uma nova alimentação, a fêmea do flebotomíneo regurgita os promastigotas metacíclicas na epiderme do hospedeiro e então, esses parasitos poderão ser fagocitados pelos macrófagos. Os promastigotas são englobados dentro do fagossomo, que se funde com os lisossomos formando o fagolisossomo, e neste momento ocorre a diferenciação do parasito em amastigota, capaz de desenvolver e multiplicar-se dentro da célula. Após sucessivas multiplicações do amastigota, a célula hospedeira se rompe liberando novos parasitos que poderão infectar outros macrófagos (Figura III) (PINHEIRO, 2005).

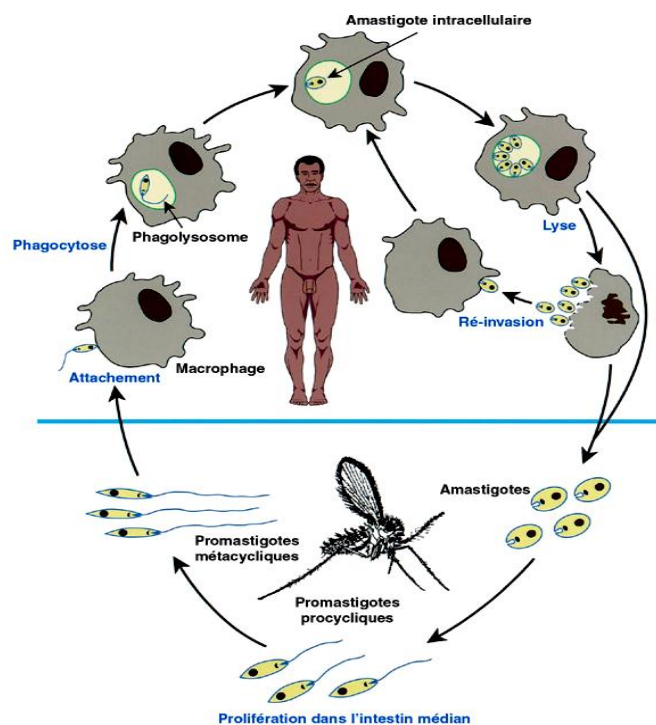


Figura III: Diagrama do ciclo de vida das espécies de *Leishmania* spp.. Fonte: HANDMAM, 2001.

1.3 DOENÇA, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

As várias espécies do gênero *Leishmania* sp., flebótomos vetores e reservatórios vertebrados, em diferentes situações ambientais, propiciam a existência de distintas apresentações clínicas da LTA, que vão desde formas inaparentes até lesões disseminadas, atingindo a pele e as mucosas (COLER e REED, 2005). Marzochi e Marzochi (1994) propõem uma classificação clínica da LTA, envolvendo as diferentes formas, apresentações da doença e seus respectivos agentes etiológicos (Figuras IV).

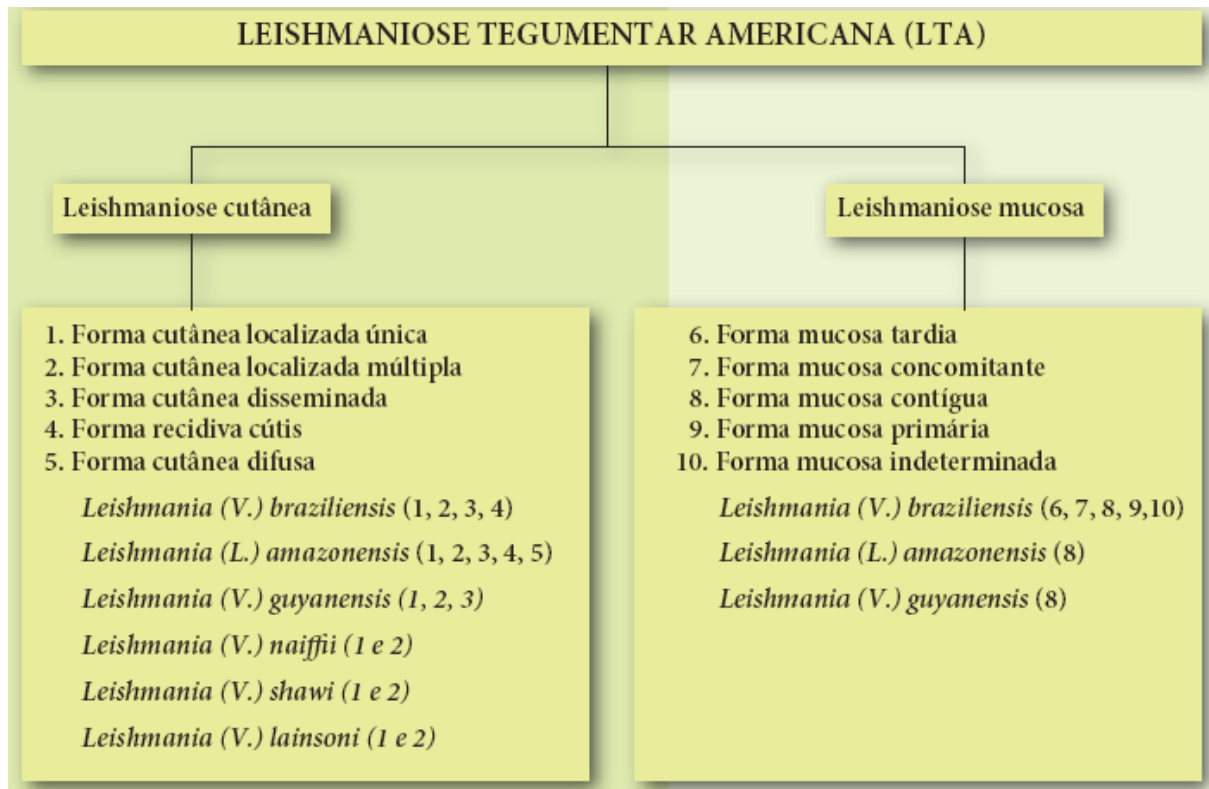


Figura IV: Classificação clínica da LTA, envolvendo as diferentes formas, apresentações da doença e seus respectivos agentes etiológicos. (MARZOCHI e MARZOCHI, 1994).

De maneira mais resumida, a LTA pode ser classificada em três grupos principais (Figura V): a leishmaniose cutânea localizada (LCL) representando a manifestação clínica mais freqüente, onde as lesões são exclusivamente cutâneas e apresentam poucos parasitos com tendência para a cura espontânea ou uma boa resposta ao tratamento; a leishmaniose cutânea mucosa (LCM), caracterizando o pólo hiperérgico, geralmente causada por disseminação hematogênica dos parasitos

causando lesões destrutivas das mucosas, principalmente boca e nariz, e não apresentando cura espontânea; e a leishmaniose cutânea difusa (LCD) distinguida pela falha em produzir uma resposta imune mediada por células durante a infecção, sendo incapazes de controlar a multiplicação parasitária e a progressão da doença, ocasionando acentuada proliferação dos parasitos e expandindo o número de lesões na superfície corporal (REIS *et al.*, 2006).

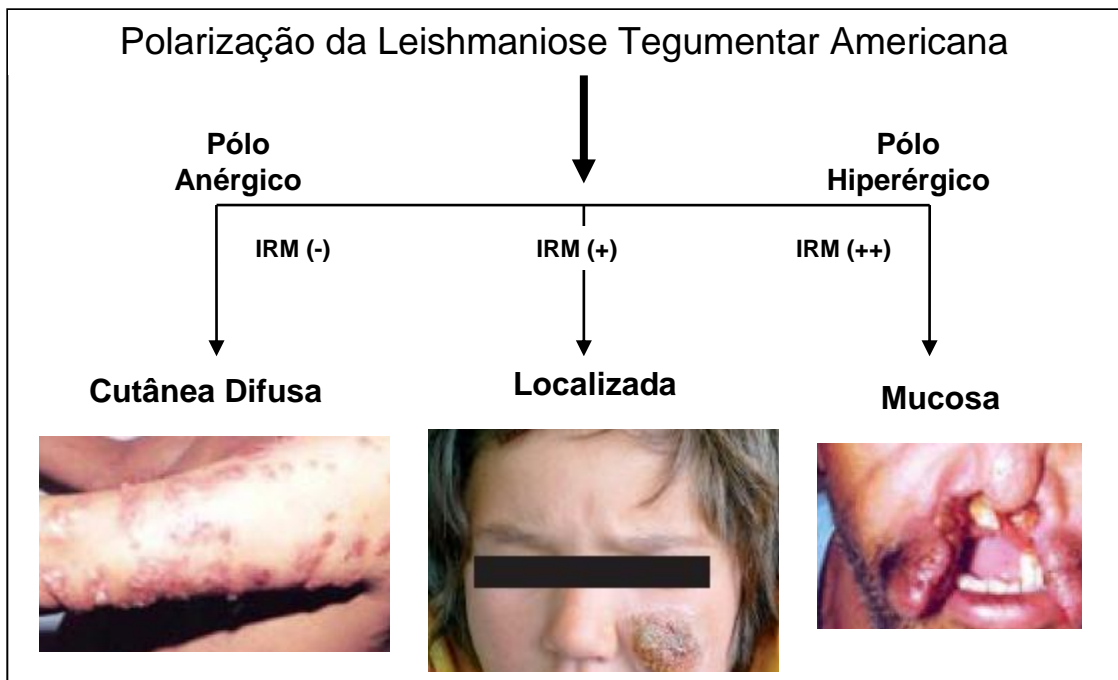


Figura V: Formas de polarização da Leishmaniose Tegumentar Americana. Fonte: Adaptado do MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006. Fotos: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006/2007; REITHINGER *et al.*, 2007).

O diagnóstico da LTA abrange aspectos clínico-epidemiológicos e laboratoriais. Frequentemente a associação desses elementos é necessária para se chegar ao diagnóstico final (GONTIJO e CARVALHO, 2003).

O diagnóstico epidemiológico pode ser realizado pela pesquisa epidemiológica para identificar quais são os grupos expostos a maior risco de contaminação ajuda a esclarecer o diagnóstico do paciente. Devem-se levar em conta as informações sobre a procedência do indivíduo, residências anteriores, atividades relacionadas com desmatamento ou atividades de lazer em florestas (SUCEN, 2001).

O quadro clínico cutâneo inicia-se pelo aparecimento de pequena lesão eritemato-papulosa no local da picada com formação de um nódulo, após um período de incubação variável (18 dias a 4 meses), com o aparecimento de uma crosta central. A perda desta crosta dá origem a uma úlcera, que evolui formando uma úlcera leishmaniótica. A lesão inicial pode ser única ou múltipla, dependendo do número de picadas infectantes e pode ou não evoluir, adquirindo características específicas (MARZOCHI, 1992). O diagnóstico diferencial também é fundamental para a elucidação da doença, já que as lesões provenientes da leishmaniose podem ser confundidas com outras formas de patologia (BASANO e CAMARGO, 2004).

Complementando a investigação epidemiológica e clínica, o diagnóstico laboratorial baseia-se em exames parasitológicos ou imunológicos, de acordo com a seguinte esquematização: exames parasitológicos através da pesquisa de amastigota mediante biópsia ou raspagem das lesões cutâneas; semeadura do material colhido em meios de cultura artificiais ou inoculação em animais experimentais (hamsters). Exames imunológicos: IRM; ELISA e RIFI. A reação intradérmica de Montenegro (IRM) fundamenta-se na visualização da resposta de hipersensibilidade celular retardada. A IRM geralmente persiste positiva após o tratamento, ou cicatrização da lesão cutânea tratada ou curada espontaneamente, podendo negatizar nos indivíduos com LCD e nos precocemente tratados. A técnica de ELISA (Ensaio Imuno-enzimático) e a reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) detectam anticorpos anti-*Leishmania* sp. circulantes no soro dos pacientes com títulos geralmente baixos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). O método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) vem sendo amplamente utilizado para fins de pesquisa. Na rotina de diagnóstico, é pouco utilizado, porém acrescenta em sensibilidade quando utilizado com os métodos parasitológicos tradicionais (MARQUES, 2001).

Na prática, a conduta mais utilizada é a pesquisa direta de parasitos mediante biópsia ou raspagem das lesões cutâneas e a reação intradérmica de Montenegro, aliadas ao aspecto clínico da lesão e ao antecedente epidemiológico. A indicação e a sensibilidade de cada exame estão relacionadas com a forma clínica da LTA (BASANO e CAMARGO, 2004).

Após a realização do diagnóstico, a Organização Mundial da Saúde e o Ministério da Saúde do Brasil recomendam para o tratamento os antimoniais pentavalentes como drogas de primeira escolha (AMATO, 2006).

Desde a introdução do tártaro emético (antimonial trivalente) na terapia da LTA, por Gaspar Vianna em 1912, o tratamento dessa doença pouco evoluiu, havendo apenas a substituição do antimonial trivalente pelo pentavalente (MARQUES, 2001). Embora os antimoniais pentavalentes sejam na maioria das vezes efetivos e indicados, devem ser consideradas as desvantagens desta droga, tais como efeitos colaterais, regimes de tratamento muito prolongados e contra-indicação para cardiopatas, nefropatas, idosos e grávidas (MAYRINK *et al.*, 2006). Além disso, as formas mucosa e mucocutânea exigem maiores cuidados por apresentarem resposta mais lenta e maior possibilidade de recidiva (MAYRINK *et al.*, 2001).

Nos casos de falha terapêutica pelo antimonial pentavalente, os fármacos utilizados como segunda escolha no tratamento da LTA é a anfotericina B, a rifampicina ou a pentamidina (MARQUES, 2001).

Entretanto, em vista do caráter insatisfatório das drogas atualmente em uso e do fato de algumas estirpes de parasitos serem mais ou menos resistentes a esses medicamentos, continuam as pesquisas sobre novos agentes terapêuticos, tais como formulações lipídicas da anfotericina B, miltefosina, paromicina, imiquimod e azoles (REY, 2001; AMATO, 2004; CROFT *et al.*, 2006). Alternativamente, com o advento da vacina (Leishvacin®) para LTA, com fins profiláticos, idealizado por vários pesquisadores e modificado por Mayrink e colaboradores, seu uso terapêutico tem sido objeto de muitos estudos, sozinho ou associado com outras drogas, e tem sido estimado como uma boa alternativa ou complementação aos tratamentos atuais, assim como medida profilática diante das dificuldades da Saúde Pública no controle e profilaxia da LTA (MARQUES, 2001; MAYRINK, 2006).

A eliminação de reservatórios associada com campanha anti-vetorial são medidas de controle que pode prevenir a infecção em indivíduos de área endêmica. No entanto, todas essas medidas são de aplicações limitadas na LTA, por isso o tratamento é fundamental (GONTIJO e CARVALHO, 2003).

1.4 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LTA

A partir da inoculação das formas promastigotas na pele, inicia-se uma complexa interação entre o parasito e a resposta imunológica do hospedeiro. Inicialmente, no local da inoculação há o desencadeamento de uma resposta inflamatória aguda inespecífica da qual participam células e fatores séricos - células natural *killer* (NK), polimorfonucleares (neutrófilos, macrófagos e eosinófilos) e sistema complemento. Assim, a maioria dos promastigotas inoculados, que ainda estão no ambiente extracelular, são rapidamente destruídos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Considerando-se que a forma amastigota de *Leishmania* sp. é um parasito intracelular obrigatório, a ativação do sistema complemento pode beneficiá-lo, pois como demonstrado por Mosser e Edelson (1984), deposição de fragmentos como C3b na superfície do parasito, promove um aumento da sua fagocitose.

O modelo experimental melhor estudado para leishmaniose cutânea é o da infecção de camundongos por *L. major*. A funcionalidade das sub-populações Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF) e Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13) foram particularmente bem estabelecidas em função da existência de camundongos susceptíveis e resistentes a esses parasitos. Os camundongos susceptíveis (BALB/c) desenvolvem lesões cutâneas no sítio de injeção; os resistentes (C57Bl/6, CBA, C3H), apresentam uma cura rápida e proteção a novas reinfecções (PINHEIRO, 2004). Numerosos estudos mostram que a progressão da doença em camundongos susceptíveis está associada ao padrão de resposta Th2, com alta produção de IL-4. Já os camundongos resistentes possuem padrão de resposta Th1, com alta produção de IFN- γ , resultando na síntese de intermediários de nitrogênio e oxigênio reativo pelos macrófagos ativados e, conseqüentemente, na morte dos parasitos intracelulares (TRIPATHI, SINGH e NAIK, 2007).

Mais recentemente, susceptibilidade e resistência à infecção por *Leishmania* sp. em modelos murinos também têm sido associada com a emergência de um subtipo de células T, as células T regulatórias (CD4⁺CD25⁺), as quais suprimem por mecanismos dependente ou não de IL-10, a habilidade de células T efetoras CD4⁺CD25⁻ eliminarem o parasito no sítio da infecção, resultando em longo tempo de persistência do patógeno no hospedeiro (CAMPOS-NETO, 2005; REIS *et al.*, 2006).

De acordo com a revisão feita por Reithinger *et al.* (2007), essa dicotomia existente em camundongos, ainda não foi claramente demonstrada em humanos. O que já está bem estabelecido é que, para o controle da infecção, é necessária a predominância da resposta imune celular com perfil Th1 (Figura VI). Na LC, a imunidade celular está preservada, com predominância das citocinas do perfil Th1, secretando principalmente IFN- γ , IL-12 e TNF- α . Na LCD, há ausência de imunidade celular efetiva, e a resposta Th2 está aumentada, com altas concentrações no soro de IL-4, IL-5 e IL-10. Nessa situação, os macrófagos não conseguem eliminar a infecção, e o parasito passa a ser encontrado em grande quantidade nas lesões, apesar do controle do processo inflamatório. A LM mostra uma mistura de citocinas do perfil Th1 e Th2, com alta produção de IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ e TNF- α , o que poderia explicar a dificuldade na resolução das lesões, já que a resposta Th2 tende a dominar quando ambas as células são ativadas (REITHINGER *et al.*, 2007; TRIPATHI, SINGH e NAIK, 2007).

As sub-populações Th1 e Th2 também induzem a síntese de anticorpos de isótipos diferentes. Como em outras doenças infecciosas e parasitárias, o monitoramento da resposta de anticorpos a antígenos envolvidos nos diferentes estágios da infecção pode fornecer informações valiosas que auxiliam na compreensão dos mecanismos de controle do sistema imune sobre os parasitos (DE SOUZA *et al.*, 2005). Em LTA, variados perfis e níveis de imunoglobulinas têm sido detectados, refletindo a complexidade da doença (GUTIERREZ *et al.*, 1991) e dificultando o estabelecimento de um padrão de resposta imune humoral, por isso o papel de anticorpos específicos ainda não está completamente esclarecido (DE SOUZA *et al.*, 2005). Sabe-se que os títulos de anticorpos específicos são mais altos nas formas graves, como a LCD e embora os níveis de anticorpos na LM sejam mais baixos do que os encontrados na LCD, eles são superiores aos observados na LC. Após a cura clínica, os títulos de imunoglobulinas tendem a cair rapidamente (em poucos meses) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

De acordo com De Souza *et al.* (2005), em LTA, a predominância de isótipos IgG1, IgG2 e IgG3 nas leishmanioses cutâneas e mucocutâneas tem sido associadas ao perfil TH1 de resposta. Já, o isótipo IgG4 relaciona-se às manifestações da leishmaniose cutânea difusa, associado ao perfil TH2 da resposta imune.

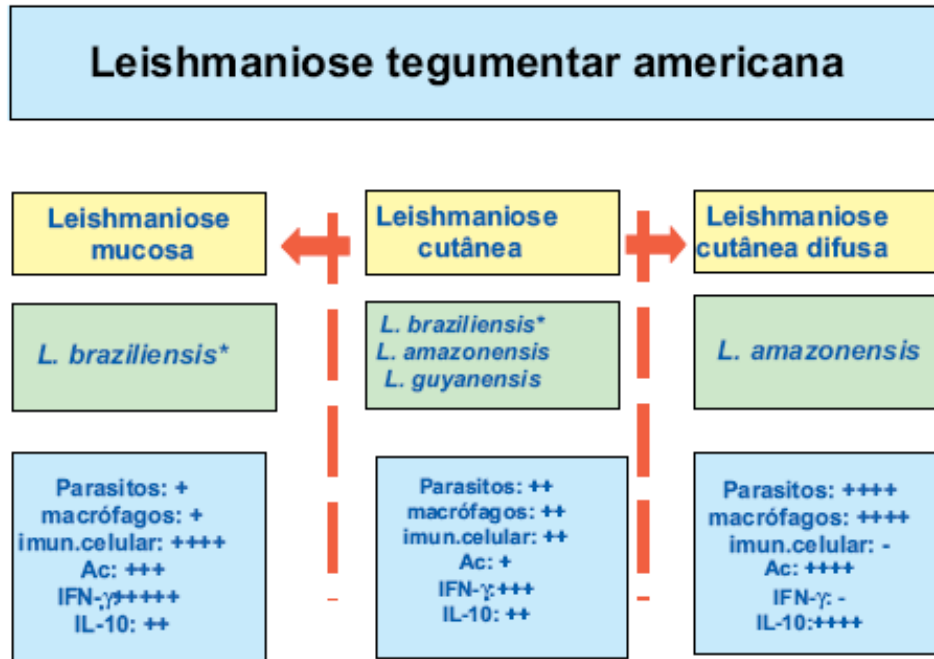


Figura VI: Aspectos imunológicos da LTA. * Principal espécie causadora de leishmaniose cutânea no Brasil. Ac: Anticorpos; IFN- γ : Interferon gama; IL-10: Interleucina 10. Ausência (-); Presença (+): + leve; ++ moderada; +++ intensa; ++++ muito intensa. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007.

Um grande número de moléculas de *Leishmania* sp. têm sido apontadas como fatores de virulência (PINHEIRO *et al.*, 2006). Evidências mostram que estas moléculas atuam em conjunto, permitindo ao parasito escapar dos eventos microbicidas do organismo hospedeiro, utilizando-se de mecanismos de evasão como inativação do sistema complemento, modulação da produção de citocinas e quimiocinas, interferência nos processos de migração e apoptose celular e modificação do micro-ambiente intracelular. Percebe-se que o parasito evoluiu de maneira a explorar o sistema imune do próprio hospedeiro, modulando-o e proporcionando um ambiente favorável para o estabelecimento da infecção. O desequilíbrio da relação parasito-hospedeiro seria a causa tanto da eliminação da infecção, quanto do processo patogênico nas leishmanioses (CASTELLANO, 2005).

O conhecimento dessas moléculas utilizadas para auxiliar os mecanismos de escape do parasito e/ou provocadoras de estímulo antigênico é de potencial importância para o desenvolvimento de métodos de prognóstico, diagnóstico, além da possibilidade de vacinas e novas terapias (CASTELLANO, 2005).

Várias proteínas promissoras do parasito vêm sendo identificadas e estudadas, entre elas, a glicoproteína 63 (gp63), glicoproteína de membrana 46 (gp46, também conhecida como M-2), homólogos de receptores de leishmânia ativadas por quinase C (p36/LACK), cisteína proteinase B e A (CPB e CPA), antígenos LD1, proteína de superfície hidrofílica acilada B1 (HASPB1), LCR1, LmSTI1, M-2, proteína salivar 15 (SP15), antígenos de superfície de promastigota 2 (PSA-2), histona H1, fator de iniciação de alongação (LeIF) e TSA (COLER e REED, 2005).

1.5 ATP DIFOSFOHIDROLASES

As ATP difosfohidrolases, também chamadas apirases, CD39, NTPases ou NTPDases, são proteínas amplamente distribuídas na natureza, sugerindo que essas enzimas tenham um importante papel no metabolismo celular. Esta família tem membros não somente em vertebrados, mas também em invertebrados, plantas, fungos, bactérias e protozoários (HANDA e GUIDOTTI 1996; VASCONCELOS *et al.* 1996; ZIMMERMANN e BRAUN, 1999).

A atividade enzimática das apirases é classificada por três critérios, de acordo com Plesner (1995): (1) dependência de íons bivalentes, principalmente Ca^{+2} e Mg^{+2} ; (2) insensibilidade aos inibidores típicos de outras ATPases do tipo P, F, V e (3) habilidade de hidrolisar vários nucleosídeos di- ou trifosfatados. Todos os membros da família apirase compartilham cinco regiões (ACRs; Apyrase-Conserved Regions) altamente conservadas (VASCONCELOS *et al.*, 1996; HANDA e GUIDOTTI, 1996; ZIMMERMANN, 1999). Estas regiões conservadas estão envolvidas na atividade catalítica da proteína e/ou na integridade da conformação tridimensional das NTPDases (IVANENKOV *et al.*, 2005).

As apirases de mamíferos são as mais estudadas até o momento (Figura VII). Oito membros já foram identificados, incluindo seis enzimas ligadas a membranas (NTPDases1-4, 7-8) e duas enzimas secretadas, as NTPDase 5 e NTPDase 6 que são alocadas no retículo endoplasmático e no Complexo de Golgi, respectivamente (IVANENKOV *et al.*, 2005; ZIMMERMANN *et al.*, 2001). NTPDase 6 tem sido relacionada com a regulação da atividade plaquetária no órgão cardíaco, e a NTPDase 5 está envolvida em respostas de células T e atenuação de agregação

plaquetária em sítios de injúria vascular (MIZUMOTO *et al.*, 2002). Muitas NTPDases de mamíferos têm sido relacionadas à respostas imunológicas, sendo encontradas em plaquetas, linfócitos, monócitos, macrófagos e células endoteliais. Em células T foi demonstrada a importância do ATP na secreção de INF- γ e IL-2, que são destacados mediadores na ativação da resposta imune (LANGSTON *et al.*, 2003).

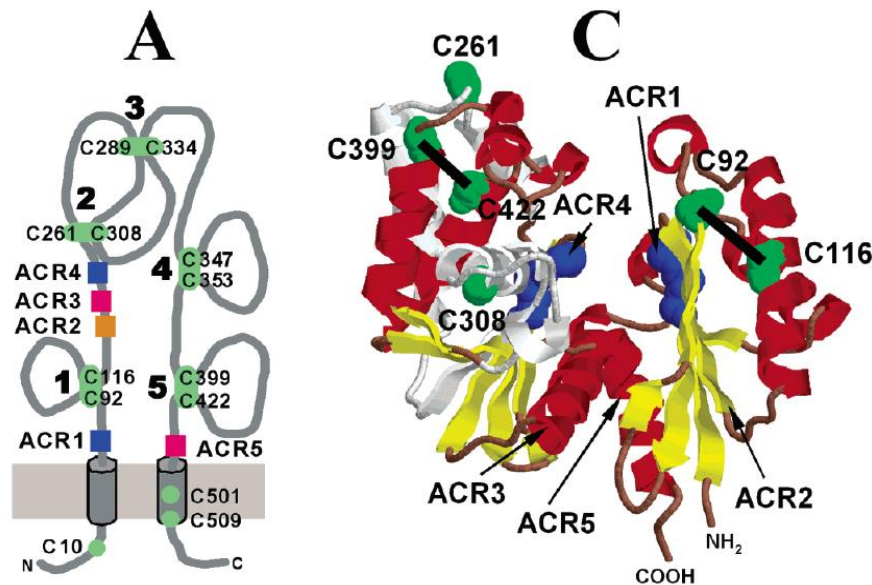


Figura VII: As 5 regiões conservadas de apirase (ACRs) (A), e uma modelagem estrutural das NTPDases de mamíferos (C) (IVANENKOV *et al.*, 2005).

As apirases também têm sido caracterizadas em vários parasitos, tais como: *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma mansoni*, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis* (Figura VIII). Essa enzima, aparentemente, está associada com a virulência patológica destes organismos (VASCONCELOS *et al.*, 1993; BERMUDES *et al.*, 1994; ASAI *et al.*, 1995; BARROS *et al.*, 2000; DE AGUIAR MATOS *et al.*, 2001; COIMBRA *et al.*, 2002; FIETTO *et al.*, 2004; PINHEIRO *et al.*, 2006). Tem sido também sugerido que elas desativam mecanismos de defesa dos hospedeiros que envolvam ATP ou ADP na superfície das células, tais como ativação de plaquetas e reatividade citotóxica de linfócitos T. Além disso, apirases presentes na superfície de parasitos tripanosomatídeos podem hidrolisar nucleotídeos como parte da via de recuperação de purinas, já que muitos deles não fazem “síntese *de novo*” (BERMUDES *et al.*, 1994; BARROS *et al.*, 2000; DE AGUIAR MATOS *et al.*, 2001; COIMBRA *et al.*, 2002; FIETTO *et al.*, 2004; PINHEIRO *et al.*, 2006).

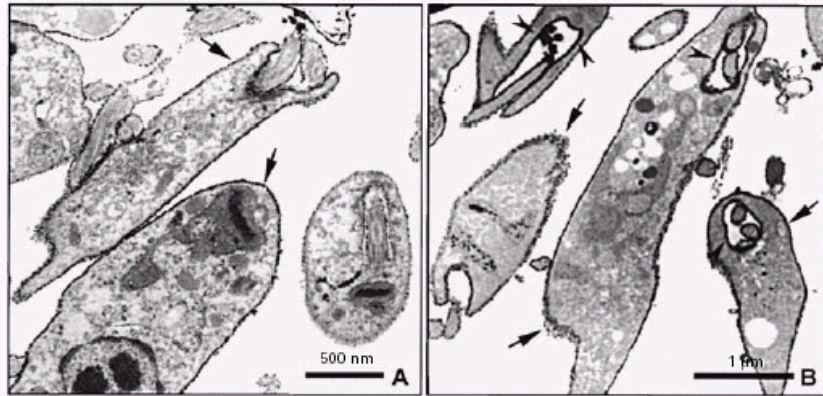


Figura VIII: Localização ultraestrutural da atividade ATP difosfohidrolásica de formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (A, B). Aspecto geral mostrando depósitos de fosfato eletro-densos homogeneamente distribuídos após hidrólise de ADP (A) ou ATP (B) na superfície da membrana plasmática dos parasitos (setas) e da membrana de flagelo (ponta de seta) (COIMBRA *et al.*, 2002).

A apirase de *Solanum tuberosum* foi o primeiro membro da família das E-NTPDases purificada e que teve seu gene clonado (TRAVERSO-CORI *et al.*, 1965; HANDA e GUIDOTTI, 1996). Imunoreatividade cruzada foi observada entre anticorpos anti-apirase de batata e isoformas de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni*, sugerindo que estas proteínas possuem homologia estrutural e epítomos conservados (VASCONCELOS *et al.*, 1996; FARIA-PINTO *et al.*, 2004). Em *S. mansoni*, a imunoreatividade cruzada com anticorpos anti-apirase de batata revelou duas isoformas de ATP difosfohidrolase no parasito, uma associada à membrana, e a outra solúvel, confirmando que esta é secretada do ovo (VASCONCELOS *et al.*, 1996; FARIA-PINTO *et al.*, 2004). Recentemente, foi observada por microscopia confocal a ausência de reatividade entre anticorpos anti-apirase de batata e células do parênquima hepático, ducto biliar e vasos sanguíneos de cortes de fígado de camundongo, assim como do tecido granulomatoso, ricos em células de resposta imune que expressam ATP difosfohidrolases em sua superfície, sugerindo que existem epítomos particularmente compartilhados entre o parasito e a apirase de batata (FARIA -PINTO *et al.*, 2006).

Uma isoforma de ATP difosfohidrolase de *L. (L.) amazonensis* foi purificada, e como observado por Coimbra *et al.*, (2008), é uma proteína altamente antigênica, já que é reativa com anticorpos IgG-anti ATP difosfohidrolase contidos em soros de camundongos infectados experimentalmente com formas amastigotas de *L. amazonensis*. Esta proteína também apresenta imunoreatividade cruzada com anticorpos anti-apirase de batata, sugerindo que compartilha epítomos com a proteína vegetal e que pertence à família das E-NTPDases (COIMBRA *et al.*, 2008).

Os projetos genomas de três espécies do gênero *Leishmania* já foram finalizados: *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis*. Entretanto, apesar do sequenciamento desses genomas produzirem seqüências lineares de aminoácidos, o desafio agora é a determinação da estrutura, função e expressão das proteínas codificadas pelos genes (PEACOCK *et al.*, 2007). Métodos experimentais tais como a cristalografia de raios-X, difração de nêutrons e de ressonância magnética nuclear (RMN), estão fornecendo estruturas de alta resolução de um grande conjunto de proteínas. Porém, estas técnicas não são aplicáveis para o estudo de todas as proteínas, principalmente as proteínas de membrana celular (SANTOS FILHO e ALENCASTRO, 2003). Em conseqüência, vários métodos computacionais foram desenvolvidos com a finalidade de contornar esse problema, entre eles a modelagem molecular.

Nesta dissertação está sendo mostrada a caracterização de uma isoforma de ATP difosfohidrolase em formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, que compartilha domínios com a apirase de batata, sugerindo que essas duas proteínas fazem parte da família das NTPDases, e que são potencialmente antigênicas.

2 OBJETIVOS GERAIS

Caracterizar a presença de uma isoforma de ATP difosfohidrolase em formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, verificar a existência de imunoreatividade cruzada com a apirase de batata, os domínios compartilhados entre estas proteínas, bem como o perfil de resposta imune humoral humana contra estes domínios, visando o futuro aproveitamento biotecnológico da proteína vegetal.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detecção de uma atividade ATP difosfohidrolásica em preparação de formas promastigotas de *L. braziliensis*;

2. Determinar o peso molecular de uma isoforma desta enzima, através da imunoreatividade cruzada com anticorpos anti-apirase de batata;

3. Executar análises *in silico* para estabelecer a relação estrutural entre a apirase de batata e os membros da família das NTPDases, incluindo proteínas de diferentes organismos encontradas no banco de dados de genes;

4. Determinar a estrutura tridimensional da apirase de batata e da NDPase de *L. (V.) braziliensis* e as possíveis homologias entre elas através de modelagem computacional;

5. Analisar se soro de pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) braziliensis* tem reatividade cruzada com apirase de batata por “Western blots”;

6. Analisar o perfil de resposta imune humoral humana em soros de pacientes com leishmaniose cutânea usando apirase de batata e preparação de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* como antígenos em técnicas de ELISA.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados neste trabalho possuíam alto grau de pureza, sendo obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), da Merck (Rio de Janeiro, Brasil), da Reagen (Rio de Janeiro, Brasil) e da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Todas as soluções foram preparadas usando água deionizada obtidas em um sistema de resinas de troca iônica através do deionizador Permuton. Marcador de peso molecular pré-corado, anti-IgG de coelho e de camundongo conjugados à peroxidase, membranas de nitrocelulose e Kit ECL foram obtidos da Amersham Pharmacia ECL (GE Healthcare, USA). Anticorpos anti-imunoglobulinas de humanos conjugados à peroxidase foram obtidos dos laboratórios Bethyl e Pharmingen.

3.2 CULTIVO E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DE PROMASTIGOTAS

Formas promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) foram cultivadas em meio LIT (infusão de fígado e triptose) a 25°C, até atingirem a fase estacionária de crescimento (MARQUES *et al.*, 2006). Os parasitos (1×10^9 células/mL) foram coletados por centrifugação (TE141/Revan-Cientec) a 10.000g por 15 minutos a 4°C e lavados 3 vezes com tampão Tris-HCl, 5 mM pH 7,4. Após a lavagem, os promastigotas foram ressuspensos em tampão Tris-HCl 5 mM, pH 7,4 contendo 8% de sacarose e inibidores de proteases: leupeptina (0,5 µg/ml), pepstatina (0,07 µg/ml), inibidor de tripsina (50 µg/L) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (2 µg/ml). Em seguida, os parasitos foram submetidos a três séries de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C, finalizando o rompimento de membranas através de quatro ciclos de sonicação (USC700/UltraSonic Cleaner/Tecnal).

A espécie do Complexo *L. braziliensis* foi isolada de um paciente com leishmaniose cutânea (LOPEZ *et al.*, 1993), e tem sido mantida *in vivo* por passagens seriadas em hamsters. A cepa foi cultivada em meio BHI (infusão de cérebro e coração), suplementada com 10% de soro albumina bovina, 1% de L-

glutamina e 1% de sulfato de gentamicina a 25°C, até atingirem a fase estacionária. (DE SOUZA *et al.*, 2005). A preparação do homogeneizado foi realizada como descrito acima.

A viabilidade celular foi verificada por visualização da motilidade dos parasitos ao microscópio óptico (Microscópio OLYMPUS CX41).

3.3 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas das amostras foi determinada de acordo com o método de Lowry *et al.* (1951). Albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

3.4 DOSAGEM ENZIMÁTICA DA PREPARAÇÃO DE FORMAS PROMASTIGOTAS

A medida de atividade enzimática foi realizada em meio de reação padrão contendo tampão MOPS 50 mM, pH 7,4, 1 mM CaCl₂, 0,1 mg proteína/ml e 3 mM do substrato desejado. A reação foi iniciada pela adição de substratos, incubada por 60 minutos a 37°C, e interrompida pela adição de 1 volume de HCl 0,2 N. A quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado foi determinada espectrofotometricamente (Bel Photonics 1105/Tecnal) de acordo com Taussky e Shorr (1953). O tempo de incubação foi escolhido para assegurar a linearidade da reação. Para atividades endógenas e análise da dependência de cátions bivalentes, a hidrólise de ATP e ADP foi medida em meio contendo tampão MOPS 50 mM, pH 7,4, sem a adição de 1 mM CaCl₂, ou com 5 mM EDTA ou 5 mM EGTA. Os efeitos de inibidores específicos para outras ATPases, tais como, ortovanadato de sódio (100 µM), azida sódica (1 mM), diciclohexilcarbodiimida (DCCD, 100 µM) e p-trifluormetoxifenilhidrazona (FCCP; 200 µM) foram também testados. As atividades ATPásicas na presença de DCCD ou FCCP foram comparadas aos testes realizados com 2,5% de DMSO ou etanol, respectivamente, solventes usados para estes compostos. Para os cálculos das dosagens enzimáticas, os valores representam a média de (n) determinações ± S (desvio padrão), usando diferentes preparações.

3.5 PURIFICAÇÃO DA APIRASE DE BATATA E OBTENÇÃO DE SORO IMUNE ANTI-APIRASE DE BATATA

Apirase de batata foi purificada em nosso laboratório a partir de uma linhagem comercial de *Solanum tuberosum* (conhecida como batata-inglesa) como descrito por Ketllun *et al.* (1982), e a enzima purificada apresentou uma única banda protéica como previamente demonstrado por SDS/PAGE e “Western blots” (FARIA-PINTO *et al.*, 2004).

A apirase pura de *S. tuberosum* foi usada para a produção de anticorpos anti-apirase de batata em coelho branco (Nova Zelândia) ou em camundongos BALB/c. O soro imune foi obtido após três inóculos de 100 µg de apirase pura de batata, com intervalos de 15 dias entre eles. No primeiro inóculo foi usado o Adjuvante de Freund Completo. Para os outros dois inóculos usou-se o Adjuvante de Freund incompleto. O soro pré-imune foi obtido antes do primeiro inóculo. Os soros foram aliquotados e mantidos a – 20 °C até o momento do uso. O título de anticorpos anti-apirase de batata foi avaliado por ELISA, usando-se a apirase de batata como antígeno. A maior diluição de soro imunoreativo com a apirase de batata nos dois animais foi 1:20.000.

3.6 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E “WESTERN BLOTS”

Amostras da preparação de promastigotas (50 µg de proteína total) ou apirase de batata altamente purificada (1 µg) foram solubilizadas em tampão de amostra e aplicadas em gel de poliacrilamida a 10% com 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), segundo descrito por Laemmli (1970), durante 2 horas a 130 volts em um sistema de eletroforese (BioRad, Mini Protean III). Padrão de peso molecular pré-corado foi também aplicado. Parte do gel foi corada com solução de Azul de Coomassie (1% de azul de coomassie R, 30% de ácido acético glacial e 40% de metanol), e posteriormente descorada (40% de metanol e 10% de ácido acético glacial) para a visualização de bandas protéicas.

A outra parte do gel foi usada para “Western blots”. Para isso, as proteínas, previamente separadas por SDS-PAGE, foram eletrotransferidas (BioRad, Mini

Trans-Blot III) para membranas de nitrocelulose. O gel foi colocado sobre a membrana de nitrocelulose entre duas folhas de papel de filtro embebidas em tampão de transferência (0,25 M de Tris, 0,192 M de glicina, pH 8,3, 20% de metanol, 0,1% de SDS). O sistema foi adaptado a câmara de eletrotransferência com o tampão previamente resfriado, segundo as instruções do fabricante. A transferência foi realizada por 60 minutos, em uma voltagem contínua de 100 volts, gerando uma corrente de aproximadamente 300 mA.

Após a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose, esta foi cuidadosamente retirada da câmara e mergulhada em tampão PBS suplementada com 3% de caseína, mais 0,1% de Tween-20, durante 2 horas, para bloqueio. A membrana de nitrocelulose foi cortada e as tiras foram incubadas por 12 horas à temperatura ambiente, sob leve agitação (Mesa agitadora TE141/Tecnal,) com diferentes soros diluídos no mesmo tampão de bloqueio, sem o Tween-20. Soro de coelho contendo anticorpos policlonais contra a apirase de batata foi diluído 1:1000, e os soro de pacientes com leishmaniose cutânea (n= 10) ou indivíduos saudáveis (n= 10), 1:100. As membranas foram então lavadas em 3 etapas de 10 minutos cada, com tampão PBS mais 0,1% Tween-20 e incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de coelho ou anti-IgG de humano acoplados à peroxidase. As membranas foram novamente lavadas, e para a revelação foi utilizado o Luminol como substrato e filmes de raio-X GBR para auto-radiografia (Kodak), de acordo com as instruções do fabricante (kit ECL/Amersham Pharmacia, UK).

3.7 SOLUBILIZAÇÃO DA PREPARAÇÃO DE PROMASTIGOTAS

Uma alíquota da preparação de promastigotas (4,3 mg de proteína/ml) de *L. (V.) braziliensis*, cepa MHOM/BR/1975/M2903 foi adicionado ao meio de reação contendo tampão MOPS 50 mM, pH 7,4, 1 mM CaCl₂, e suplementado com 1mg/ml do detergente não-iônico C₁₂E₉. Posteriormente, este solubilizado foi submetido à centrifugação a 10.000g por 10 minutos a 4°C. Dosagem de proteína total e das atividades ATPásica e ADPásica foram realizadas com o sobrenadante deste solubilizado.

3.8 ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO

Soro de coelho contendo anticorpos policlonais contra a apirase de batata na diluição de 1:500 foi adicionado a uma alíquota (5 mg de proteína/ml) do sobrenadante de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) tratada com C₁₂E₉ como previamente descrito. Esta mistura foi incubada por 3 horas à temperatura ambiente. Então, a proteína A-Sepharose (3 µl/100 µl amostra) foi adicionada, e a incubação estendida por mais 2 horas. Controle com soro pré-imune foi feito em paralelo. Proteína A-Sepharose foi adicionada, na ausência de soro, para controle da atividade fosfolitolítica durante o tempo total de procedimento. A resina foi sedimentada por centrifugação durante 5 minutos, para posterior dosagem da atividade hidrolítica destes sobrenadantes (0,1 mg de proteína/ml) pela adição de ATP ou ADP como já descrito.

O fração precipitada resultante do procedimento da imunoprecipitação foi lavada por 3 vezes com tampão MOPS 50 mM, pH 7,4, e solubilizado em tampão de amostra para aplicação em gel de poliacrilamida. As proteínas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose, e submetidas a “Western blots”. Para evitar reatividade entre subunidades da IgG de coelho, o “Western blot” foi realizado com soro de camundongo (diluição 1:500) contendo anticorpos policlonais contra a apirase de batata e para este procedimento foi usado o tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8, mais 150 mM NaCl e 0,1% Tween-20. A revelação foi realizada por quimioluminescência usando anticorpos anti-IgG de camundongos acoplados à peroxidase, o Luminol como substrato e filmes de raio-X para auto-radiografia.

A preparação de formas promastigotas da espécie do Complexo *L. braziliensis* foi submetida aos mesmos procedimentos de solubilização e incubação com anticorpos anti-apirase para a obtenção do complexo “resina-soro de coelho-antígeno” e identificação de ATP difosfolitolase por “Western blots”.

3.9 ANÁLISES *in silico*

A seqüência primária da apirase de *S. tuberosum* e de todos os outros organismos analisados neste trabalho foram obtidas do NCBI (National Center for Biotechnology Information), banco de dados que mantém atualizadas as

informações sobre genomas e proteínas. Para o alinhamento múltiplo e o cladograma foi usado o programa disponibilizado pelo GeneBee Service (Graphical Phylogenetic Tree - GeneBee Service - <http://www.genebee.msu.su>). O alinhamento da seqüência primária da apirase de batata com cada seqüência dos demais membros da família das NTPDases foi feito usando o programa BLASTp, e o alinhamento dos domínios compartilhados foi feito pelo programa “Blast 2 Sequences” (blseq), do NCBI, os quais executam comparações entre duas seqüências, buscando regiões de identidade e similaridade através do algoritmo de alinhamento Smith-Waterman (SMITH e WATERMAN, 1981).

Os epítomos para células B nos domínios da NDPase de *L. braziliensis* foram analisados usando AbcPRED SERVER (www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC_method.html) que é capaz de prever epítomos com 65,93% de fidelidade. A predição de epítomos para células B é baseada em escore (até 1), e neste trabalho somente os peptídeos com escore > 0,8 foram considerados positivos (SAHA e RAGHAVA, 2006). A seqüência da NDPase de *L. braziliensis* foi também analisada usando um algoritmo apropriado (www.imtech.res.in/raghava/propred/definitions.html) que pode indicar peptídeos de 9 aminoácidos, iniciados com um resíduo hidrofóbico, que têm a probabilidade de ligar com alta afinidade a uma ou mais (seqüências promíscuas) das 51 diferentes moléculas HLA-DR analisadas (SINGH e RAGHAVA, 2001).

Os modelos tridimensionais da apirase de batata e da NDPase de *L. braziliensis* foram feitos em colaboração com o Dr. Octávio Luiz Franco da Universidade Católica de Brasília, que também identificou no alinhamento múltiplo das seqüências as regiões em α -hélice e estruturas β -pregueadas. O melhor molde para a apirase de batata ou para a NDPase de *L. braziliensis* foi determinado através do servidor BIO-info meta server (<http://bioinfo.pl/meta/>). A estrutura “PDB file 1T6C”, já determinada por difração de raios-X, foi a que mostrou a melhor identidade com a proteína vegetal (52%) e a do parasito (37%) na ausência de “gaps”. A construção da estrutura tridimensional foi feita através do programa Modeller 8.0 (SALI e BLUNDELL, 1993; SANCHEZ e SALI, 1997). O programa Prosa II (SIPPL, 1993) e o Swiss-PdbViewer (GUEx e PEITSCH, 1997) foram usados para selecionar os modelos que apresentavam as características mais favoráveis para o empacotamento e exposição a solventes. Procheck (LASKOWSKI *et al.*, 1993) foi

usado para análise adicional da qualidade estereoquímica. Baixo escore em “prosa II’ e alto fator “procheck g” caracterizaram a alta qualidade do modelo.

3.10 SELEÇÃO DE SOROS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA

A seleção dos pacientes com leishmaniose cutânea, habitantes de área endêmica, foi realizada em colaboração com o Dr. Marcos José Marques da Universidade Federal de Alfenas. As amostras de soro (n= 21) foram obtidas de pacientes (15 homens e 6 mulheres de idade entre 20 a 45 anos) com leishmaniose cutânea provenientes de área endêmica. Esses pacientes apresentavam uma única lesão cutânea, medindo aproximadamente 12 mm de diâmetro, com um tempo de desenvolvimento \leq 60 dias. O diagnóstico da infecção por *L. (V.) braziliensis* foi confirmado através de exame parasitológico, pelo teste de intradermoreação de Montenegro, e pela reação em cadeia da polimerase (PCR), usando como padrão o DNA obtido de uma forma promastigota de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), como previamente descrito (MARQUES *et al.*, 2001). Como controle negativo foram usadas amostras de soros de 5 a 10 indivíduos saudáveis moradores de área não endêmica para leishmaniose. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética para pesquisa em humanos da Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brasil (Processo n°: 141/2006).

3.11 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

A análise do perfil de isótipos de imunoglobulinas anti-apirase foi feita utilizando-se a técnica ELISA, de acordo com metodologia previamente descrita (HARLOW e LANE, 1988), com modificações após a realização de diversos experimentos onde foram testados diluições e sistemas de bloqueio diversos. A apirase de batata (5 μ g/poço em 0,1 M NaHCO₃, pH 9,6), ou preparação de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (5 μ g/poço em 0,1 M NaHCO₃, pH 9,6) foi adsorvida em placas de microtitulação (Nunc-Immuno Plate PolySorp) durante 12 h a 4° C. Em seguida, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS, pH 7,2, e bloqueadas por 1 h 30 min com 0,05% de Tween-20 e 2,5% de caseína diluídos em

tampão PBS. Após o bloqueio, as placas foram incubadas por mais 12 h com os soros diluídos no mesmo tampão usado para o bloqueio e novamente lavadas por cinco vezes com 0,05% de Tween-20 em PBS. As placas foram então incubadas por mais 1 h e 30 min com os anticorpos anti-imunoglobulinas de humanos conjugados à peroxidase. Para a revelação, foram usados como substratos o OPD/H₂O₂, previamente diluídos em tampão citrato de sódio, pH 5,5. Após o desenvolvimento da cor, a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2 N, e a leitura efetuada a 492 nm em um leitor de microplacas (Molecular Devices Corporation, Menlo Park, CA). A reatividade dos anticorpos foi quantificada em três experimentos diferentes para cada imunoglobulina testada. Como controle negativo, foi testado os anticorpos secundários na ausência do soro humano. Poços contendo apenas a apirase ou a reação colorimétrica também estavam presentes nas placas.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Para a comparação da soropositividade dos anticorpos, o menor limite de positividade (ponto de corte) foi definido como sendo a média da densidade ótica das amostras de soros de indivíduos saudáveis mais 2 ou 3 vezes o desvio padrão. A média do valor de densidade ótica obtida da duplicata de cada amostra de paciente com leishmaniose cutânea, igual ou maior que o ponto de corte foi considerada como soropositiva. As análises estatísticas foram feitas usando o teste não paramétrico e não pareado de Mann-Whitney, com o auxílio do software GraphPad Prism, versão 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 DETECÇÃO DE ATIVIDADE FOSFOHIDROLÍTICA E DE UMA ISOFORMA DE ATP DIFOSFOHIDROLASE EM FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania sp.*

O meio de reação padrão usado continha 1 mM de CaCl_2 , uma condição iônica que permite detecção preliminar de atividades ATP difosfohidrolásicas. Atividade fosfohidrolítica foi detectada na preparação de promastigotas da cepa padrão MHOM/BR/1975/M2903 de *Leishmania (V.) braziliensis*. As amostras hidrolisaram igualmente ATP ou ADP, na proporção de 724 ± 341 ($n= 13$) ou 603 ± 451 nmol $\text{Pi}/\text{mg}^{-1}\text{h}^{-1}$ ($n= 8$), respectivamente (Tabela 1). Usando as mesmas condições experimentais, uma preparação de promastigotas de uma cepa classificada como membro do Complexo *L. braziliensis* foi tão efetiva quanto a primeira na hidrólise de ATP (854 ± 286 nmol $\text{Pi}/\text{mg}^{-1}\text{h}^{-1}$; $n= 3$) e ADP (407 ± 117 $\text{Pi}/\text{mg}^{-1}\text{h}^{-1}$; $n= 5$). Nenhuma atividade endógena ATPásica ou ADPásica foi observada na ausência de CaCl_2 ($n= 3$), ou na presença de 5 mM EDTA ($n= 3$) ou 5 mM EGTA ($n= 3$), confirmando então, a dependência da atividade fosfohidrolítica pelos cátions bivalentes. Evidências adicionais da presença de atividade ATP difosfohidrolásica nas formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) foram obtidas pela hidrólise de UTP, UDP, GTP e GDP (Tabela 1). Em nossas condições experimentais, ATP, ADP, UDP e GDP foram os melhores substratos para esta enzima, e outros nucleotídeos, tais como, GTP e UTP foram hidrolisados em menor proporção (Tabela 1). Nenhuma quantidade significativa de Pi foi liberada quando 5'-AMP ou p-NPP foi usado como substrato (Tabela 1). Inibidores clássicos de atividades ATPásicas foram também usados. O ortovanadato de sódio foi capaz de inibir 53% dessa atividade (Tabela 2). Nenhuma alteração significativa foi encontrada quando ouabaína, FCCP ou DCCD foi adicionado ao meio de reação (Tabela 2). Azida sódica foi capaz de inibir 58% da atividade ATPásica (Tabela 2).

As proteínas das preparações de promastigotas da cepa do Complexo *L. braziliensis* e de *L. (V.) braziliensis* (cepa MHOM/BR/1975/M2903) foram fracionadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 10% (Fig. 1). Não foi possível a visualização direta de bandas coradas pelo Coomassie-blue (dados não mostrados). Por “Western blots” (Fig. 1, painel WB), anticorpos policlonais contra a apirase de batata, produzidos em coelho, identificaram duas bandas de aproximadamente 48 e 43 kDa nas duas preparações de promastigotas (poços V e S), possivelmente subunidades da mesma proteína.

Os efeitos do detergente não-iônico C₁₂E₉ (1 mg/ml) nas atividades ATPásica e ADPásica das formas promastigotas da cepa padrão foram investigados com o objetivo de se obter ATP difosfohidrolase solubilizada e ativa. Após centrifugação da preparação tratada com C₁₂E₉, 94% das proteínas totais foram localizados no sobrenadante, enquanto 74% ou 28% das atividades ATPásica e ADPásica, respectivamente, foram mantidas, quando comparadas aos controles (Tabela 3).

Anticorpos policlonais anti-apirase de batata produzidos em coelhos foram então usados para imunoprecipitar a ATP difosfohidrolase solubilizada de amostras obtidas de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903). A Tabela 4 mostra que anticorpos anti-apirase de batata imobilizados em proteína A-Sepharose foram capazes de depletar cerca de 83% e 87% das atividades ATPásica e ADPásica, respectivamente, correspondendo a depleção de uma isoforma com a razão de atividade ATPásica/ADPásica de aproximadamente 1 (Tabela 4).

Os complexos depletados do sobrenadante, obtidos de experimentos de imunoprecipitação usando a cepa padrão de *L. (V.) braziliensis* e aquela do Complexo *L. braziliensis*, foram submetidos à eletroforese e “Western blots” usando anticorpos policlonais anti-apirase de batata obtidos em camundongos. As mesmas bandas de 48 e 43 kDa observadas na preparação de promastigotas do Complexo *L. braziliensis* (Fig. 1, painel WB, V) foram também detectadas no material imunoprecipitado (Fig. 1, painel WB-I, V). Na preparação de *L. (V.) braziliensis* é possível observar a banda de 48 kDa, e uma outra de menor massa molecular (~40 kDa), possivelmente forma proteolizada da mesma proteína.

Tabela 1: Especificidade para substratos. A medida de atividade fosfohidrolítica em preparação de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) foi feita em meio de reação padrão. O resultado representa a porcentagem de atividade quando comparada a atividade ATPásica ($724 \pm 341 \text{ nmol Pi.mg}^{-1}.\text{h}^{-1}$). O número de medidas em duplicatas usando diferentes preparações de promastigotas é mostrado entre parênteses.

SUBSTRATO (3 mM)	ATIVIDADE FOSFOHIDROLÍTICA (%)
ATP	100 (13)
ADP	83,8 (8)
UTP	58,5 (2)
UDP	109 (2)
GTP	47,7 (2)
GDP	163 (2)
5'-AMP	7,7 (2)
p-NPP ¹	0,8 (2)

¹p-NPP: p-nitrofenilfosfato

Tabela 2. Efeitos de inibidores sobre a hidrólise de ATP. Os resultados estão expressos como uma porcentagem do controle que foi medido em meio de reação padrão na ausência dos componentes indicados. A tabela mostra a média \pm desvio padrão de 4 experimentos diferentes feitos em duplicatas para cada composto usado.

COMPONENTES	ATIVIDADE RELATIVA (%)
Ortovanadato de sódio (100 μ M)	47 \pm 6
Ouabaína (1 mM)	138 \pm 70
FCCP (200 μ M)	114 \pm 62
DCCD (100 μ M)	99 \pm 38
Azida sódica (1 mM)	42 \pm 3

Tabela 3. Efeitos do detergente não-iônico C12E9 sobre a atividade fosfolitolítica de preparações de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903). Os dados são expressos pela média \pm desvio padrão. Os valores entre parênteses representam o número de experimentos (n) realizados em duplicata e a porcentagem (%) de proteína total solubilizada ou de atividade hidrolítica quando comparada ao controle na ausência de detergente.

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	PROTEÍNA (mg/ml)	ATIVIDADE ATPásica	ATIVIDADE ATDásica
		(nmol Pi.mg ⁻¹ .h ⁻¹)	
Controle	4,30 mg/ml (3; 100)	667 \pm 222 (4; 100)	721 \pm 162 (4; 100)
1 mg/ml C ₁₂ E ₉	4,05 mg/ml (3; 94)	491 \pm 342 (4; 74)	200 \pm 8,6 (4; 28)

Tabela 4. Depleção da atividade ATP difosfolásica solubilizada em C12E9 da preparação de promastigotas *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) por anticorpos policlonais anti-apirase de batata, produzidos em coelho, imobilizados em Proteína A-Sepharose. Os soros imune e pré-imune foram usados na diluição 1:500. Os resultados entre parênteses representam a porcentagem de atividade fosfolítica quando comparada ao soro pré-imune, de um experimento realizado em duplicata.

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	ATIVIDADE ATPásica	ATIVIDADE ADPásica
	(nmol Pi.mg ⁻¹ .h ⁻¹)	
Proteína A-Sepharose ¹	312	252
Soro pré-imune	242 (100)	230 (100)
Soro-imune	42 (17)	30 (13)

¹ Proteína A-Sepharose foi adicionada sozinha, na ausência de soro, como controle da atividade fosfolítica durante o tempo total do experimento.

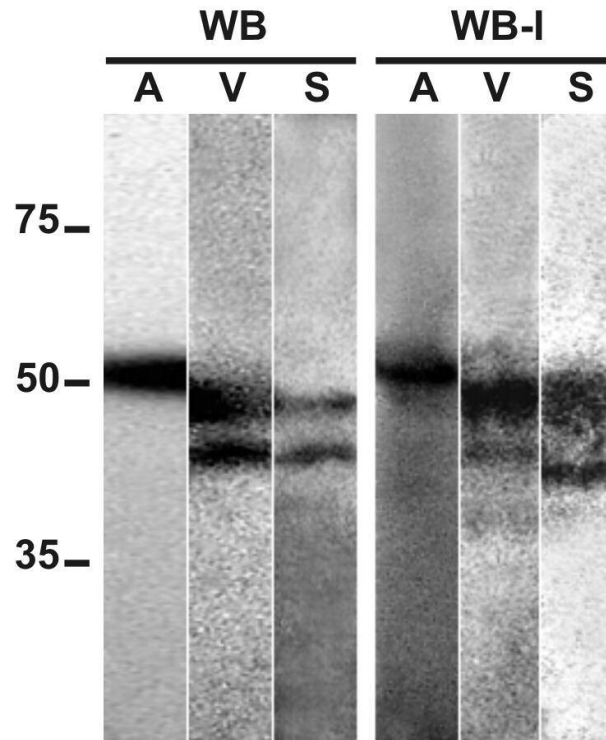


Figura 1. Imunoreatividade cruzada entre ATP difosfohidrolase de formas promastigotas e anticorpos anti-apirase de batata (WB e WB-I). WB: proteínas (50 µg) de promastigotas da espécie do Complexo *L. braziliensis* (V) ou *L. (V.) braziliensis*, cepa MHOM/BR/1975/M2903 (S) foram fracionadas em gel de SDS-PAGE a 10%, eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com soro diluído 1:1000 contendo anticorpos anti-apirase de batata produzidos em coelho. WB-I: o complexo imunoprecipitado “resina-anticorpos de coelho-antígeno” isolados de ambas as preparações de promastigotas (V e S) foram lavados, submetidos à eletroforese e “Western blots” desenvolvidos com soro policlonal anti-apirase de batata (diluído 1:500) produzido em camundongos. Reatividade entre a apirase de batata e soros policlonais anti-apirase de batata produzidos em coelho (WB, A) ou camundongo (WB-I, A) foi usada como controle positivo, e nenhuma outra banda reativa pode ser observada. As membranas foram reveladas por quimioluminescência.

4.2 ANÁLISE *IN SILICO* DA APIRASE DE *S. tuberosum* E DA NDPase DE *L. braziliensis*

Análises no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) usando seqüências conhecidas de NTPDases revelaram proteínas homólogas e hipotéticas nos genomas de *Schistosoma japonicum*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania major*, *Leishmania infantum* e *L. braziliensis*. O alinhamento da seqüência de aminoácidos de 29 membros da família das ATP difosfohidrolases foi então realizado, incluindo ATP difosfohidrolases de batata, mamíferos, helmintos e protozoários.

Deste alinhamento (dados não mostrados) resultou o cladograma mostrado na Figura 2, o qual expressa a distância evolutiva entre as seqüências de aminoácidos das proteínas. Ramos independentes são mostrados, indicando diferentes caminhos evolucionários, possivelmente devido a divergências ancestrais. Por outro lado, é possível observar através do alinhamento da apirase de batata com cada uma das seqüências analisadas, que existe uma alta relação estrutural entre esta proteína vegetal e as hipotéticas NDPases de *Leishmania* sp., a solúvel SmATPase 2 de *S. mansoni* e as solúveis NTPDases 5 e 6 de mamíferos. A SmATPase 1 de *S. mansoni* mostra estreita relação estrutural com as NTPDases 1-3 e 8 de mamíferos, todas elas associadas às membranas.

As GDPases de *Leishmania* sp. estão mais distantes no cladograma e possuem maior homologia estrutural com a NTPDase 1 de *T. cruzi*, confirmado pelas porcentagens de identidade e similaridade encontradas entre elas. A proteína hipotética NTPDase de *P. falciparum* e a proteína NTPase de *T. gondii*, cuja atividade enzimática já foi caracterizada, são as que possuem menor proximidade com a apirase de batata conforme observado no cladograma (Fig. 2), e menor porcentagem de identidade e similaridade com a seqüência de aminoácidos da proteína vegetal. As NTPDases 4 e 7 de mamíferos, também associadas às membranas, foram as que mostraram a maior distância da apirase de batata (Fig. 2).

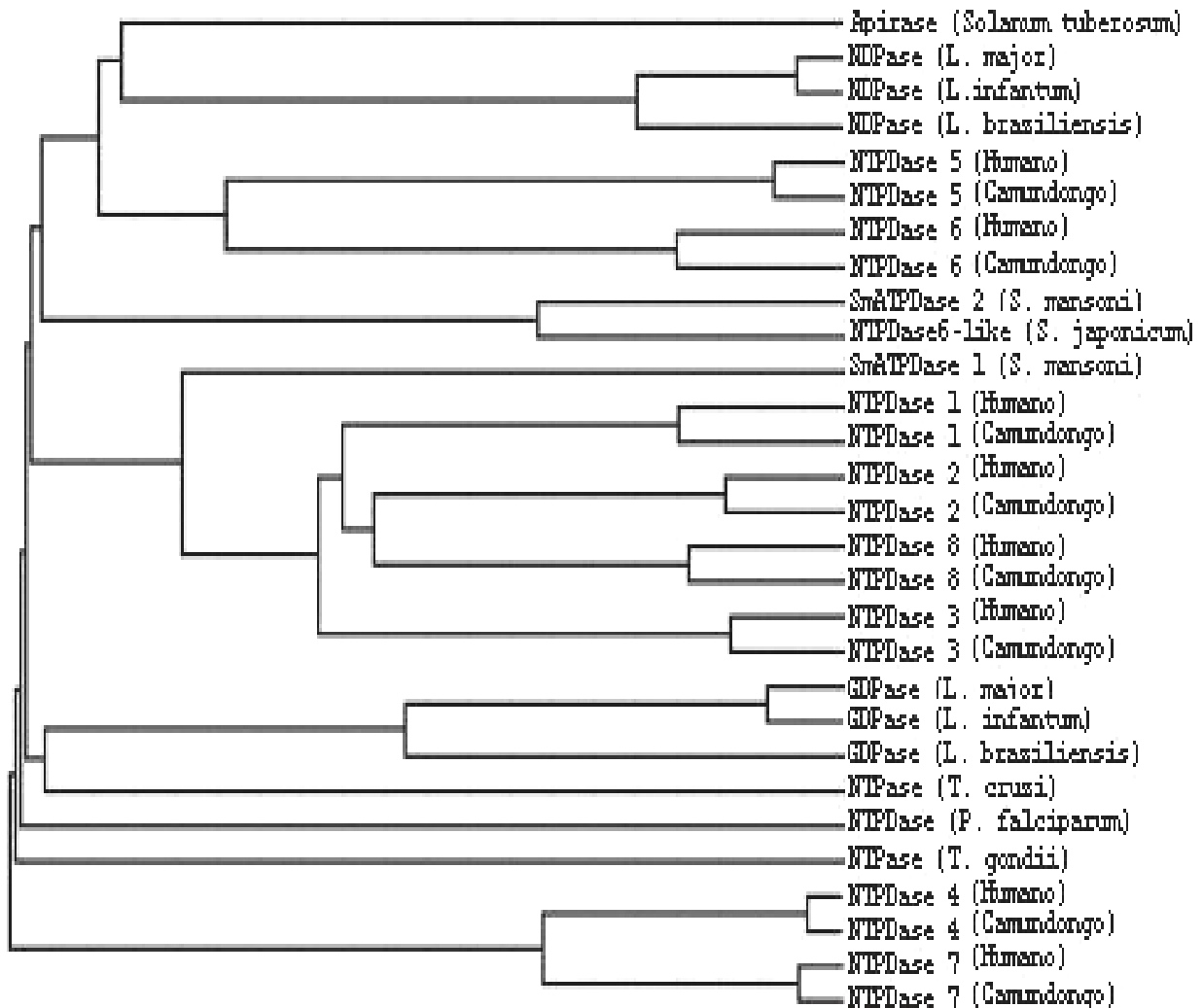


Figura 2. Cladograma representando a distância filogenética entre as ATP difosfohidrolases de diferentes organismos. Este cladograma foi construído usando o programa disponibilizado pelo GeneBee Service (Graphical Phylogenetic Tree - GeneBee Service - <http://www.genebee.msu.su>). Os números de acesso das seqüências no banco de dados do NCBI são: *S. tuberosum* apyrase, P80595; *S. mansoni* SmATPDase2, DQ868522; *S. japonicum* NTPDase6-like protein, AAW26231; NTPDase6-*H. sapiens*, AAP92131; NTPDase5-*H. sapiens*, NP_001240; NTPDase5-*M. musculus*, NP_001021385; *T. cruzi* NTPDase1, AAS75599; *L. braziliensis* NDPase, CAM42020; *L. major* NDPase, CAJ03227; *L. infantum* NDPase, CAM66723; *P. falciparum* NTPDase1, XP_00138471; *S. mansoni* SmATPDase1, AAP94734; NTPDase1-*H. sapiens*, NP_001767; NTPDase1-*M. musculus*, AAAH11278; NTPDase2- *H. sapiens*, NP_982293; NTPDase2-*M. musculus*, O55026; NTPDase8-*H. sapiens*, AAR04374; NTPDase8-*M. musculus*, NP_082369; NTPDase3-*H. sapiens*, NP_001239; NTPDase3-*M. musculus*, NP_848791; *L. braziliensis* GDPase, CAM37219; *L. major* GDPase, Q4HK3 and *L. infantum* GDPase, CAM66031; NTPDase4-*H. sapiens*, NP_004892; NTPDase4-*M. musculus*, NP_080450; NTPDase7- *H. sapiens*, NP_065087; NTPDase7-*M. musculus*, NP_444333; *T. gondii* NTPase1, Q27893; NTPDase6-*M. musculus*; NP_742115.

Na Figura 3 é mostrado o alinhamento da apirase de batata, NDPases e GDPases de *Leishmania* sp., e as NTPDases 1, 5 e 6 de humanos. Maior identidade com a apirase de batata foi encontrada para as NDPases de *L. braziliensis* (30% de identidade e 44% de similaridade em 404 aminoácidos analisados), *L. major* (30% de identidade e 44% de similaridade em 408 aminoácidos analisados) e *L. infantum* (31% de identidade e 45% de similaridade em 401 aminoácidos analisados). As GDPases de *Leishmania* sp. possuem menor identidade e similaridade com a proteína vegetal (32 a 33% de identidade e 45 a 48% de similaridade em apenas 228 a 231 aminoácidos analisados). As NTPDases 6 (31% de identidade e 47% de similaridade em 433 aminoácidos analisados) e NTPDase 5 (29% de identidade e 47% de similaridade em 401 aminoácidos analisados) de humanos mostram também alto nível de homologia com a apirase de batata. A NTPDase 1 (24% de identidade e 43% de similaridade em 436 aminoácidos analisados) mostra a menor identidade entre as três seqüências primárias de humanos analisadas (Fig. 3).

Os domínios de maior identidade (50 a 82%) entre a apirase de batata, e as de *Leishmania* sp. ou humanos foram localizados, de acordo com o alinhamento, nas regiões A, C, D e E, que incluem os domínios conservados característicos da família das ATP difosfohidrolases, isto é, as ACR1, ACR2, ACR3 e ACR4, respectivamente, e em outras regiões tais como B, F e G (31 a 67%; Fig. 3). Nenhuma identidade significativa foi observada entre os aminoácidos próximos à região ACR5 destas proteínas (Fig. 3).

Predição de epítomos nos domínios da seqüência primária da NDPase de *L. braziliensis*, homólogos à apirase de batata (Fig. 3 e Tabela 5) mostra que, com exceção da região G, todas as outras são aptas a ligarem anticorpos (escore > 0,8; Tabela 5). Com exceção da Região E, que inclui a ACR4, todas as outras regiões foram preditas como promíscuas, isto é, 12 (24%) a 42 (83%) das 51 diferentes moléculas HLA-DR, teoricamente, ligam com afinidade a epítomos da NDPase do parasito e, portanto, estes epítomos têm alta probabilidade de induzir resposta imune de células T (Fig. 3 e Tabela 5).

Tabela 5: Predição teórica de peptídeos nos domínios da NDPase de *L. braziliensis* compartilhados com a apirase de batata que podem ser considerados epítomos ou capazes de ligar aos alelos HLA-DR. Peptídeos com escore > 0,8 (em negrito) nos domínios têm alta probabilidade de serem epítomos. O número de moléculas HLA-DR que ligam peptídeos nanoméricos da proteína do parasito é relativo à análise de 51 alelos e a porcentagem é mostrada entre parênteses.


Regiões da apirase de batata	<i>L. (V.) braziliensis</i> NDPase		
	Anticorpos (escore)		Moléculas HLA-DR
A (46-64)	> 0,8		12/51 (24)
B (78-117)	> 0,8		42/51 (83)
C (120-133)	> 0,8		33/51 (65)
D (164-185)	> 0,8		19/51 (37)
E (194-204)	> 0,8		02/51 (04)
F (240-252)	> 0,8		15/51 (29)
G (392-410)	< 0,8		27/51 (53)

Figura 3. Alinhamento da estrutura primária da apirase de batata, ATP difosfohidrolase de parasitos e humanos. Todas as regiões conservadas (A-G) das sequências de aminoácidos estão indicadas por linhas escuras, e as regiões conservadas da família das apirases (ACRs) por caixas verticais. Os resíduos de aminoácidos idênticos à apirase de batata estão representados pela cor cinza. O resíduo de aminoácido hidrofóbico inicial de um nanômero, o qual tem potencial habilidade para ligar às moléculas de HLA-DR, está com bordas pretas e os outros resíduos de aminoácidos de cada nanômero estão em negrito. Os peptídeos que ligam anticorpos com alto escore estão representados dentro de caixa horizontal. Os cilindros cinza correspondem a α -hélices e as setas representam estruturas β -pregueadas. As linhas horizontais indicam porções de seqüências de aminoácidos que foram omitidas das figuras. Os números de acesso das seqüências no banco de dados do NCBI estão indicados na Figura 2.



S.tuberosum apyrase (40) -----SHESEH **A** **IFDAGSTGSRVHV** **REDE**---**KLGLL**---PIGN-----NI
L.braziliensis NDPase(50) -----SNVYD **D** **IDAGSTGSRVHV**FQYER---SSTGV-----ILLR
L.major NDPase (48) -----AYANVYDVVIDAGSTGSRVHVQYER---GRTGF-----VLLR
L.infantum NDPase (48) -----AYANVYDVVIDAGSTGSRVHVQYER---GRTGL-----VLLR
L.braziliensis GDPase(200) -RKACVDAVAKYSVVFEDIGSTGNRVHVYKYRVNPLTQISASAPDELISK----IDLVG
L.major GDPase (185) -GAACAKSSVKYSVVFEDIGSTGNRVHVYKYRVAPATRTAAAAGSELSD----IDLVE
L.infantum GDPase (185) -ACTKTKTSDKYSVVFEDIGSTGNRVHVYKYRVAPATHAAAAGSELSD----IDLVE
Human NTPDase 5 (44) -----SASTLYGIMFDAGSTGTRIHVYTFVQKMPGQLPI-----LEG
Human NTPDase 6 (90) -GTAADGHEVYFYGIMFDAGSTGTRVHVVFQFTR-PPRETPT-----LTH
Human NTPDase 1 (45) -----ENVKYGIVLDAGSSHTSLYIYKW-PAEKENDTGVV-----H-----QV

Region-A



S.tuberosum apyrase (78) **E** **MATEPGLSS** **AEDPKAAANSLEPLLDGAE** **VPQE** **Q** **SETPLE** **GATAG** **RM** **KG**
L.braziliensis NDPase(83) ER **KRIEPG** **SSFATDOEGAKOS** **AG** **R** **AEKAVPRS** **QRCTS** **T** **KATAG** **RL** **LP**
L.major NDPase (83) ERFKRAEPDLSSFATDLDGAKASLEGLLRFADTVVPSYQKCTSVTLKATAGLRLLPE
L.infantum NDPase (83) ERFKRVEPGLSSFATDPDGAKESLAGLLRFADKVVPSYQKCTFVTLKATAGLRLLPE
L.braziliensis GDPase(251) ELFELNFKALSELNPNVQDAPEALWELFAKAKNFVPAELHACTPIEFKATAGLRMLGL
L.major GDPase (236) ELFELNFKALSELNPNVQDAPEALWELFVAKDFVPAELHACTAAEFKATAGLRMLGM
L.infantum GDPase (236) ELFELNFKALSELNPNVQDAPEALWELFMKAKYFVPAELHACTAVEFKATAGLRMLGM
Human NTPDase 5 (81) EVFDSVKPGLSAFVDQPKQGAETVQGLLEVAKDISIPRSHWKKTPVVLKATAGLRLLPE
Human NTPDase 6 (133) ETFKALKPGLSAYADDFEKSAAQGIRELLDVAKQDIPDFWKATPLVLKATAGLRLLPG
Human NTPDase 1 (83) EECRVKGPGISKFVQKVNIEIGIYLTDCMERAREVIPSQHQETPVYLGATAGMRLLRM


Region-B

Region-C



S.tuberosum apyrase (136) DAAEKILQAVRNLVKNQSTFHSKDC **--TILDGTOEGS** **MWAA** **NY** **LGN** **--G**---
L.braziliensis NDPase(140) ADQQVLLDAAQQTLLK-AFPFQSRGAS---IVSGAEOG **GWLT** **NYL** **NRL**-----
L.major NDPase (140) SAQQALLDVAQHTLN-ASPFQSRGAS---IISGAQEGVYGWLTVNYLLDRL-----
L.infantum NDPase (140) SVQQVLLDAAQHTLN-ASPFQSRGAS---IISGAQEGVYGWLTVNYLLNRL-----
L.braziliensis GDPase(308) EKATEILAEIRARYR-KETFWRGSA-PVRILDSHEEGLMAWLTVNFLLGTAFARN--T
L.major GDPase (293) EKANEILAGIRARYR-NETFWRGNA-SVRILDACEEGMAWLTVNYLLGAFSRG-AT
L.infantum GDPase (293) EKATEILDGIRARYR-NETFWRGNA-PVRILDSHEEGLMAWLTVNYLLGAFSRG--T
Human NTPDase 5 (138) HKAKALLFEVKEIFR-KSPFLVPKGS--VSIMDGSDEGILAWTVNFLTQQL-HG---
Human NTPDase 6 (190) EKAQKLLQKVKEVFK-ASPELVGDDC--VSIMNGTDEGSAWITINFLTGSL----KT
Human NTPDase 1 (140) ESEELADRVLDDVVERSLSNYPFDQGG--ARITIGQEEGAYGWITINYLKGFSSQKTRW

Region-D



S.tuberosum apyrase (194) **ATID** **GGGS** **Q** **AYALSNEQ**FAKAFQNEEDGEPEVQOKHLMKSKDY---NL **HS** **LNYG**
L.braziliensis NDPase(195) ATID **MGGASTQ**VVFETPTSGEWLFFN----YAHQLRTP**KRTI**---**AM** **QHS** **LG** **G**
L.major NDPase (195) ATIDMGGASTQVVFETPTSGEWLFFN----YAYQLRTPKRTI---AMYQHSYLGGLG
L.infantum NDPase (195) ATIDMGGASTQVVFETPTSGEWLFFN----YAHQLRTPKRTI---TMYQHSYLGGLG
L.braziliensis GDPase(370) AIIIDIGGGSTQIVFEPGEDTFYKMRAD----VRGSATLGGRSV---KVYQHSYEGYG
L.major GDPase (355) AVIDLGGGSTQIVFEPGESTFHGMRTD----FRYAATLGSRSV---RAYQHSYEGYG
L.infantum GDPase (355) AVIDLGGGSTQIVFEPGESAFHGMRTD----LRYSATLGSRSV---SAYQHSYEGYG
Human NTPDase 5 (196) GTLDLGGASTQITFLPQFEKTLQTPRG---YLTSFEMFNSTY---KSLYTHSYLGF
Human NTPDase 6 (248) GMLDLGGGSTQIAFLPRVEGTLOASPPG---YLTALRMFNRTY---KLYSYSYLGGLG
Human NTPDase 1 (210) GALDLGGASTQVTFVPQNTIESPDNALQ F---RLYGKDY---NVYTHSFLCYG

Region-E

Region-F

S.tuberosum apyrase (391) **E** **CMD** **MEYTLVDC** **GLNPHKEIT**VIHDVqyKNYLVgaAWPLGCAIDLVSSTTN-
L.braziliensis NDPase(374) EITCME**LAVL**YS**SL**THGLGLSDDRTLEVPNRI--EGIAV--SWSLGCSSL---SFLVK-
L.major NDPase (374) ETACMELAYMYSFLTYGLGLSDATVLTVPNRI--EGMAV--SWSLGCSSL---SFLLK-
L.infantum NDPase (374) ETACMELAYMYSFLTYGLGLSDATVLTVPNRI--EGMAV--SWSLGCSSL---SFLLK-
L.braziliensis GDPase(643) EYECMYYSYTYALLRGRYEVPEGRVLHVAKKI--SGYET--AWPLGASL---ISVT--
L.major GDPase (626) EYECMYYSYTYALLRGRYEVPEGRVLHVAKKI--RGYET--AWPLGASL---LSTL--
L.infantum GDPase (629) EYECMYYSYTYALLRGRYEVPEGRVLHVAKKI--RGYET--AWPLGASL---LSTL--
Human NTPDase 5 (374) PFLCMDLSYITALLKDGFGFADSTVLQLTQKVV--NNIET--GVALGATFHLLQSLGI-
Human NTPDase 6 (427) PFSCMDLTYV-SLLLQEFQFPKRVKLTTRKI--DNVET--SWALGAFHYIDSLSNR-
Human NTPDase 1 (411) EY-CFSGTYILSLLLQGYHFTADSWEHIFHFIGKIQGSDA--GWTLYGMLNLL--TNMIP-

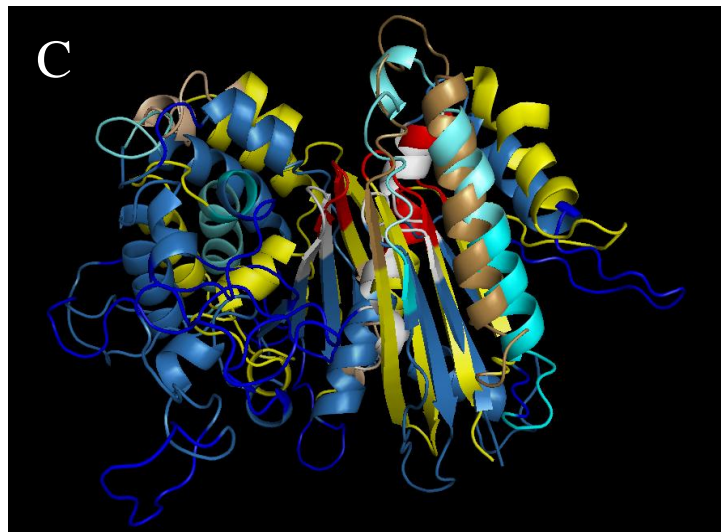
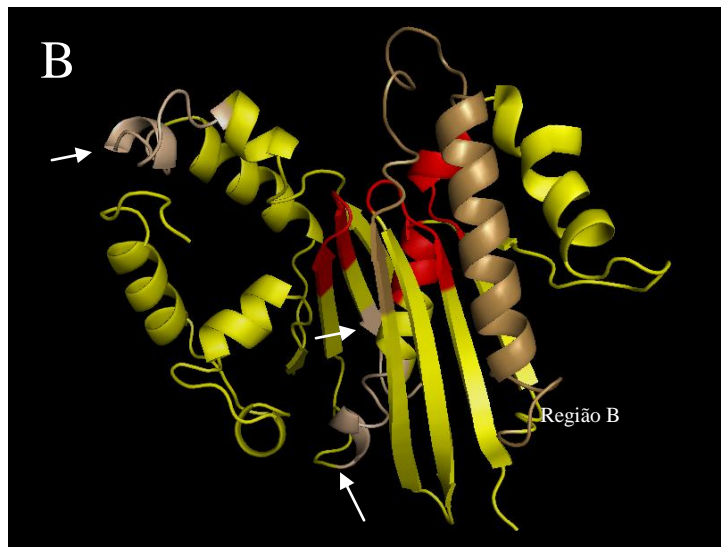
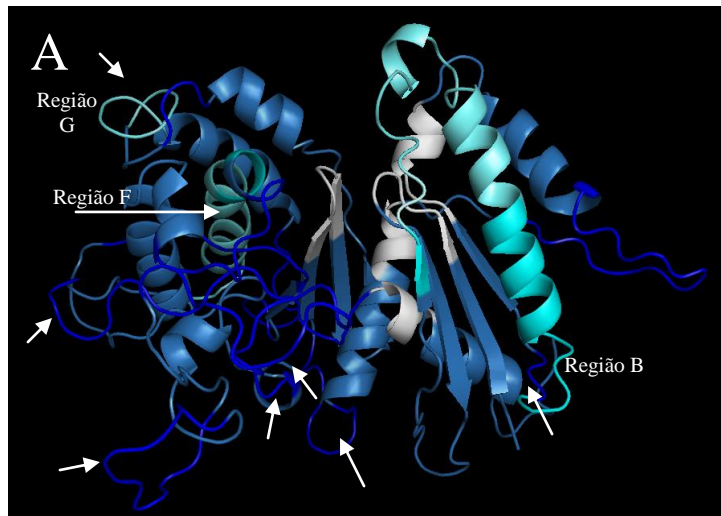
Region-G

ACR5

A estrutura tridimensional da apirase de batata (A) e da NDPase de *L. braziliensis* (B) isoladas e em sobreposição (C) são mostradas na Figura 4. Estas estruturas são globulares, onde se observa fitas em folhas paralelas e antiparalelas e estruturas helicoidais em hélice. As conexões entre os filamentos 1 e 4, e entre os filamentos 4 e 5, contêm segmentos em hélice, todos do mesmo lado das pregas. As conexões são significativamente maiores no domínio C-terminal do que no domínio N-terminal. Adequadamente, cinco hélices estão presentes no domínio C terminal e somente 2 no domínio N-terminal (Fig. 4).

É interessante observar na Figura 4 (A, B e C) os altos níveis de homologia que existe entre a estrutura tridimensional da NDPase de *L. braziliensis* e a apirase de batata, e a coincidente localização das regiões mostradas na Figura 3. Como visualizado no modelo, essas regiões são expostas e capazes de ligar anticorpos. Para melhor entendimento da relação estrutural entre estas proteínas, as regiões ACRs da apirase de batata (A) estão marcadas em branco e da NDPase de *L. braziliensis* (B) em vermelho, e setas brancas foram adicionadas para indicar os locais antigênicos. As três outras regiões indicadas nesta dissertação - B, F e G – foram destacadas por outras tonalidades de azul na apirase de batata (A) e marrom na NDPase de *L. braziliensis* (Fig. 4, B).

Figura 4- Modelo molecular da apirase de batata (A) e da NDPase de *L. braziliensis* (B), e após sobreposição das duas proteínas (C). Os modelos mostram o alto nível de homologia estrutural entre elas. As regiões conservadas das apirases (ACRs) estão representadas em branco (A) ou vermelho (B), e as regiões expostas que ligam anticorpos estão indicadas por setas brancas (A, B). As regiões conservadas B, F e G foram destacadas por outras tonalidades de azul (A, C) ou marrom (B, C).



4.3 IMUNOREATIVIDADE CRUZADA ENTRE A APIRASE DE *S. tuberosum* E SOROS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA

A apirase de batata foi reconhecida em “Western blots” usando soros (diluição 1:100) de 10 pacientes com leishmaniose cutânea, e um resultado representativo é mostrado na Figura 5. Soro proveniente de 10 indivíduos saudáveis (diluição 1:100) não reagiram com a proteína vegetal (Fig. 5). A pureza da apirase de batata também pode ser observada, desde que nenhuma outra banda foi reconhecida pelos soros testados (Fig. 5).

Os níveis de anticorpos IgG total, IgM, IgA e IgE foram então quantificados em soros diluídos de pacientes com leishmaniose cutânea usando preparação de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (Lb) ou apirase de batata como antígenos nas placas de ELISA.

A Figura 6 mostra a mediana e os valores máximo e mínimo da densidade ótica (DO) da média da duplicata de cada soro, diluído 1:80. Níveis significativamente altos de IgG (A) contra Lb (primeira coluna; $P < 0,05$) ou apirase de batata (segunda coluna; $P < 0,001$) estavam presentes em soros de pacientes com leishmaniose cutânea, quando comparados aos níveis encontrados em indivíduos saudáveis (controle). Para IgG, foram observados 86% (18/21; ponto de corte 0,080) ou 81% (17/21; ponto de corte 0,196) de soropositividade para Lb e apirase de batata, respectivamente (Fig. 6). Embora nenhuma diferença significativa tenha sido observada para os níveis de IgM (B), IgA (C) ou IgE (D) contra Lb (primeira coluna), quando comparados ao controle, é possível observar 14% (3/21; ponto de corte 0,187) e 62% (13/21; ponto de corte 0,045) de soropositividade para IgM e IgA, respectivamente. Nenhuma soropositividade para IgM (B, ponto de corte 0,261) foi observada quando a apirase de batata foi usada como antígeno, mas os níveis séricos de 2 a 3 (10-14%) dos 21 pacientes com leishmaniose cutânea ficaram acima do ponto de corte para os anticorpos IgA (C, ponto de corte 0,055) e IgE (Fig. 6, segunda coluna, D, ponto de corte 0,271).

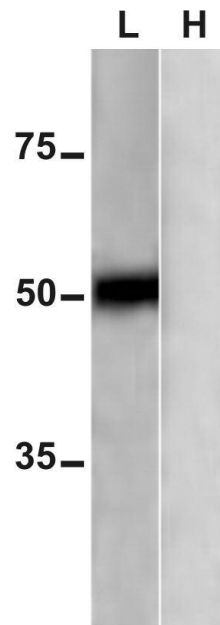


Figura 5. Imunoreatividade cruzada entre a apirase de batata e soros de pacientes com leishmaniose cutânea. Apirase de batata (1 μ g) foi submetida a eletroforese e “Western blots” usando soro diluído 1:100 de paciente com leishmaniose cutânea (L). Soro diluído de indivíduo saudável (H) foi usado como controle negativo. As membranas foram reveladas por quimioluminescência.

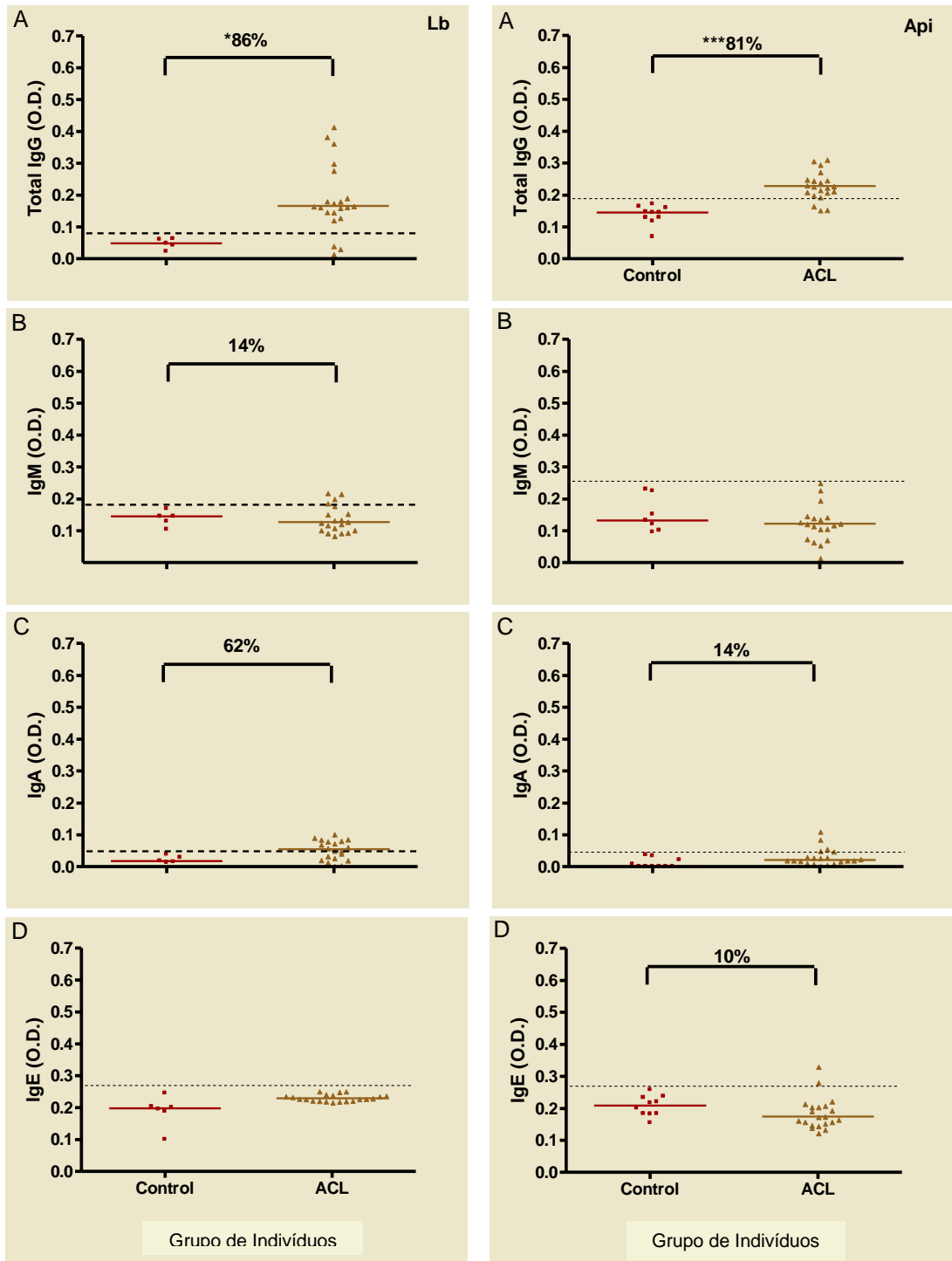


Figura 6: Níveis de anticorpos em pacientes com leishmaniose cutânea (ACL). Níveis de IgG (A), IgM (B), IgA (C), IgE (D) foram quantificados em soros diluídos 1:80 de pacientes com ACL ou saudáveis (Control) usando preparação de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (Lb) e apirase de batata (Api) em técnicas de ELISA. Os resultados foram expressos como a média dos valores de absorvância obtidos de duplicatas. A mediana é mostrada em barra e a linha horizontal representa o valor do ponto de corte. A significância das diferenças entre os grupos foi determinada pelo teste não pareado de Mann-Whitney. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

Os subtipos de IgG foram então quantificados (Fig. 7). Níveis significativamente altos de IgG1 (A; $P < 0,01$) e IgG3 (C; $P < 0,001$) contra Lb (primeira coluna) foram encontrados na diluição 1:80 do soro, com uma alta variação entre as amostras individuais, que mostram valores de DO até 7 vezes maiores que o ponto de corte. Para os antígenos de promastigotas (Lb), 16 (76%) dos 21 pacientes com leishmaniose cutânea mostraram soropositividade para IgG1 (A, ponto de corte 0,058) ou IgG3 (C, ponto de corte 0,080). Adicionalmente, correlação positiva foi observada entre IgG total e IgG1 ($R^2 = 0,3406$; $P < 0,01$), e em menor proporção com IgG3 ($R^2 = 0,1947$; $P < 0,05$). Similarmente, níveis significativamente altos de IgG1 (A) e IgG3 (C) foram encontrados quando a apirase de batata foi usada como antígeno (segunda coluna), com soropositividade de 71% (15/21; ponto de corte 0,103) e 43% (9/21; ponto de corte 0,080), respectivamente. Os valores de DO dos anticorpos IgG1 e IgG3 foram até 3 vezes maiores que o ponto de corte (Fig. 7, segunda coluna). Um único paciente com leishmaniose cutânea teve forte reatividade de IgG3 contra a apirase de batata, 9 vezes maior que o valor do ponto de corte (DO 0,704; dados não mostrados). Nenhuma diferença significativa foi observada para os níveis de IgG4 em várias diluições testadas (1:20 a 1:160) contra Lb (primeira coluna) ou apirase de batata (segunda coluna), quando comparados aos níveis encontrados em indivíduos saudáveis. Contudo, elevados níveis de IgG4 foram encontrados em 13 (62%) e 10 (48%) dos 21 soros testados contra Lb (ponto de corte 0,169) e apirase de batata (ponto de corte 0,157), respectivamente, com valores de DO até 3 vezes maiores que o ponto de corte (Fig. 7, D). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os níveis de IgG2 (B) encontrados nos soros de pacientes e indivíduos saudáveis, e somente 5 (24%) e 2 (10%) dos 21 pacientes com leishmaniose cutânea mostraram soropositividade para Lb (primeira coluna; ponto de corte 0,017) ou apirase de batata (segunda coluna; ponto de corte 0,129), respectivamente.

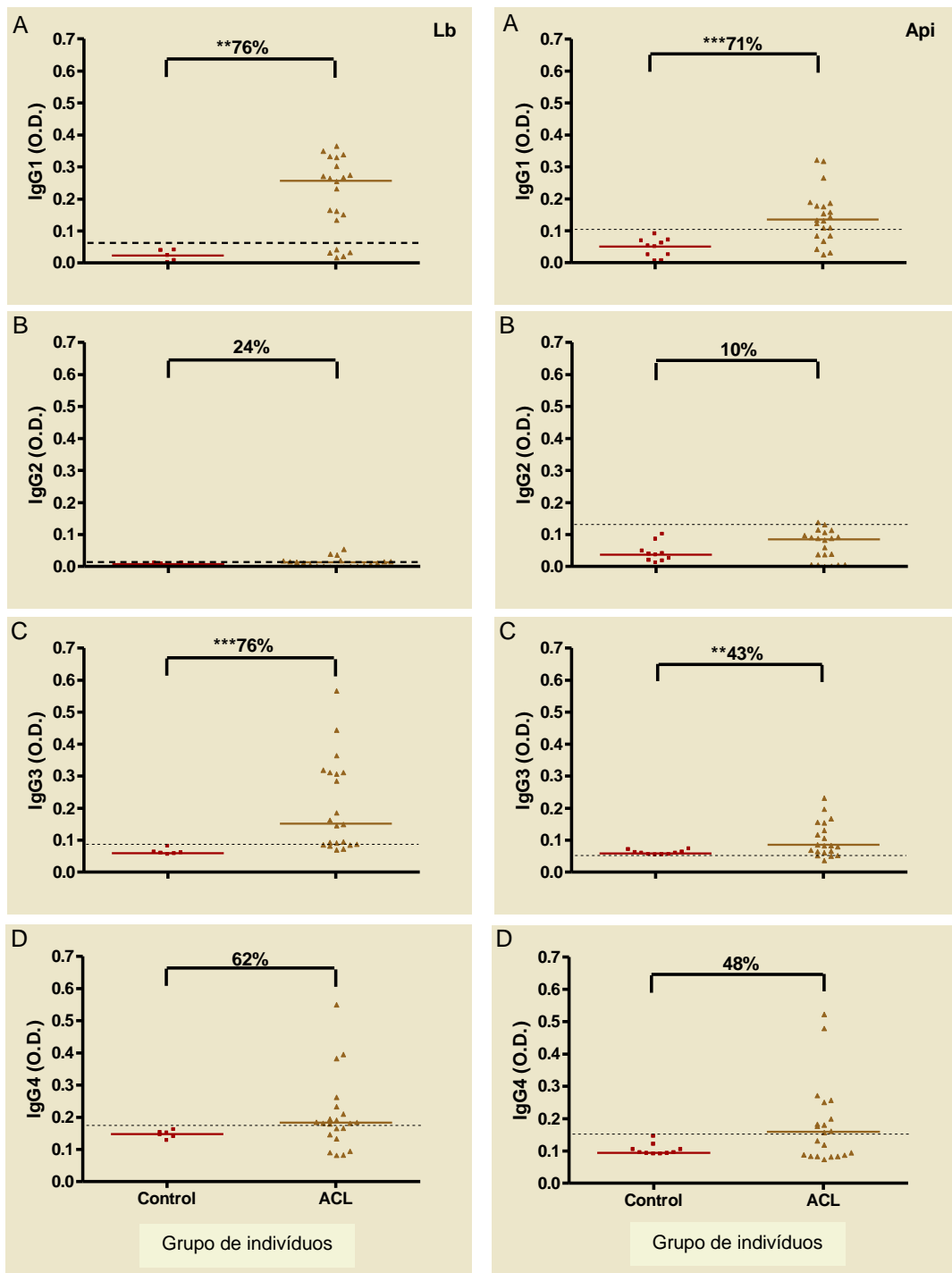


Figura 7. Níveis de subtipos de IgG em pacientes com leishmaniose cutânea (ACL). Níveis de anticorpos IgG1 (A), IgG2 (B), IgG3 (C), IgG4 (D) foram quantificados em soros diluídos 1:80 de pacientes com ACL ou saudáveis (Control) usando preparação de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (Lb) e apirase de batata (Api) em técnicas de ELISA. Os resultados foram expressos como a média dos valores de absorvância obtidos de duplicata. A mediana é mostrada em barra e a linha horizontal representa o valor do ponto de corte. A significância das diferenças entre os grupos foi determinada pelo teste não pareado de Mann-Whitney. Valores de P < 0,05 foram considerados significativos.

5. DISCUSSÃO

5.1 DETECÇÃO DE UMA ISOFORMA ATIVA DE ATP DIFOSFOHIDROLASE EM FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania sp.*

As formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania sp.* são antigênicas e bioquimicamente complexas. A identificação, localização e caracterização destes antígenos têm motivado inúmeras investigações, todas voltadas para a seleção de moléculas que sejam úteis para o desenvolvimento de métodos diagnóstico ou vacina, ou para que forneçam indicações de novos alvos terapêuticos (KEDZIERSKI *et al.*, 2006). Como mostrado nesta dissertação, uma isoforma de ATP difosfohidrolase foi detectada nas formas promastigotas da cepa padrão *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) e em uma cepa isolada de um paciente, que foi identificada como pertencente ao Complexo *L. braziliensis*.

Os ensaios preliminares mostraram uma atividade fosfohidrolítica presente na preparação de promastigotas (cepa MHOM/BR/1975/M2903), estimulada por Ca^{2+} , e capaz de hidrolisar ATP, ADP, UTP, UDP, GTP e GDP, revelando uma ampla especificidade enzimática para nucleosídeos di- e trifosfatados, característica comum às ATP difosfohidrolases de diversas origens (PLESNER, 1995). Evidências de outras enzimas liberando fosfato inorgânico para o meio de ensaio foram também obtidas. Atividades 5'-nucleotidásica e fosfatásica foram detectadas pela hidrólise de AMP e p-NPP, respectivamente. No entanto, estas atividades foram correspondentes a < 8 % da atividade ATPásica observada na preparação de promastigotas, não contribuindo significativamente com o Pi medido no meio de ensaio. Nenhuma caracterização da presença de uma 5'-nucleotidase em *L. (V.) braziliensis* foi encontrada na literatura. Atividade fosfatásica ácida foi detectada em formas promastigotas de várias espécies de *Leishmania*, com máxima atividade em pH 5.2 (AVILA *et al.*, 1989), justificando possivelmente a baixa atividade p-nitrofenilfosfatásica em nossos experimentos.

O ortovanadato de sódio, um análogo de fosfato inorgânico, que é um inibidor de ATPases transportadoras de cátions do tipo P (CARAFOLI, 1991) foi capaz de inibir aproximadamente 53% da atividade ATPásica, sugerindo um efeito direto sobre estas ATPases na preparação de promastigotas. Nestas condições iônicas,

atividade de Na^+/K^+ ATPase foi descartada, desde que a ouabaína, um glicosídeo cardiotônico inibidor de Na^+/K^+ -ATPases de diversas origens (PERIYASAMY *et al.* 1983), não promoveu alteração significativa na atividade ATPásica. Há poucos relatos na literatura sobre ATPases de transporte em *L. (V.) braziliensis* e apenas uma Ca^{2+} -ATPase foi previamente identificada em formas promastigotas desta espécie (BENAIM, 1993) e em formas promastigotas de *L. donovani* e *L. mexicana* (MAZUMDER *et al.*, 1992; BENAIM, 1993). Portanto, é possível que a atividade enzimática que contribui com a hidrólise de ATP em nossos experimentos seja proveniente desta Ca^{2+} -ATPase previamente descrita.

A azida sódica, que é um inibidor de ATPase mitocondrial (BUSSE *et al.*, 1980) e de ATP difosfohidrolases (KNOWLES e NAGY 1999; COIMBRA *et al.*, 2002), inibiu 58% da atividade ATPásica da preparação de promastigotas. No entanto, a adição de diciclohexilcarbodiimida (DCCD), conhecido inibidor de ATPase mitocondrial (WEBER e SENIOR, 1998), e o FCCP, que desacopla fosforilação oxidativa em mitocôndria e estimula atividade ATPásica dependente de Mg^{2+} (BHATNAGAR e RAMALAH, 1998), não promoveram alterações significativas na atividade ATPásica, sugerindo um efeito direto da azida sódica sobre uma atividade ATP difosfohidrolásica.

A hidrólise significativa de nucleosídeos di- e trifosfatados sob o estímulo de íons bivalentes, associada à inibição promovida por azida sódica, sugeriu que uma atividade ATP difosfohidrolásica estava presente na preparação de promastigotas, nos motivando a dar continuidade aos estudos. É interessante observar que as formas promastigotas de outra cepa de *Leishmania*, pertencente ao Complexo *Leishmania braziliensis* (LOPEZ *et al.*, 1993), cultivadas sob condições diferentes, mostraram uma atividade hidrolítica que foi igualmente efetiva na degradação de ATP e ADP, sugerindo que a expressão desta proteína é uma ocorrência comum. É possível que a sua eficiência catalítica possa ser alterada em função de estímulos externos. Será interessante, portanto, localizá-la na forma promastigota e cultivá-la na presença ou ausência de nucleotídeos, ou de seus derivados, detectando possíveis alterações em sua atividade que possam ser correlacionadas a sua função.

O sucesso da separação de proteínas em condições não desnaturantes depende principalmente da solubilidade e sensibilidade da enzima aos detergentes. Com poucas exceções (COIMBRA *et al.*, 2002; 2008), as ATP difosfohidrolases são

inativadas por todos os detergentes normalmente usados para solubilizar proteínas e, alternativamente, são caracterizadas em homogeneizados ou em células intactas, eliminando-se a etapa de solubilização (BARROS *et al.* 2000; DE AGUIAR MATOS *et al.* 2001). Diversos detergentes em concentrações variadas foram testados em nosso laboratório visando a extração de ATP difosfohidrolase ativa de *Leishmania* (COIMBRA *et al.*, 2008). Observamos que em nossas condições de trabalho, os detergentes C₁₂E₉ (1 mg/ml), deoxicolato de sódio (0,2%) e Triton X-100 (0,2%) permitiram a solubilização e recuperação de aproximadamente 56% da quantidade de proteínas presentes na fração de membrana de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* originalmente usadas. No entanto, os detergentes não foram efetivos na preservação da atividade ATP difosfohidrolásica total, inibindo as atividades ATPásica e ADPásica em maior ou menor proporção quando testados isoladamente em experimentos padrão (COIMBRA *et al.*, 2008). O detergente não iônico C₁₂E₉ foi selecionado para a execução de nossos experimentos, por ser o mais adequado em medidas colorimétricas, desde que ele mantém o meio de reação sem turvação. Ao solubilizar a preparação de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* com este detergente, 74 e 28% das atividades ATPásica e ADPásica, respectivamente, foram mantidas, níveis estes ainda significativos e que permitiram executar o procedimento de imunoprecipitação de atividade enzimática. Soro policlonal de coelho contendo anticorpos anti-apirase de batata acoplados à Proteína A-Sepharose foi capaz de depletar 83% e 87% das atividades ATPásica e ADPásica, respectivamente, correspondendo a depleção de uma proteína com a razão de atividade ATPásica/ADPásica 1. Embora os ensaios não permitam efetivamente avaliar os níveis reais de atividade ATP difosfohidrolásica *in vivo*, eles confirmam que esta isoforma de ATP difosfohidrolase presente em formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* são ativas, e que a massa molecular previamente mostrada por “Western blots” usando a fração total da amostra é de aproximadamente 48 kDa.

Uma possível subunidade de aproximadamente 43 kDa foi mostrada por “Western blots” de fração total de promastigotas das duas cepas de *Leishmania* usadas neste trabalho e, posteriormente, ela foi identificada novamente em “Western blots” efetuados com o complexo “resina-anticorpos de coelho-antígeno” obtido da preparação de formas promastigotas do Complexo *L. braziliensis*. Isoformas de ATP difosfohidrolases podem co-existir em um mesmo sistema biológico como proteínas solúveis ou associadas às membranas, nas formas glicosilada ou deglicosilada, ou

em forma monomérica ou multimérica (KETLLUN *et al.*, 1982; BERMUDEZ *et al.*, 1994; VASCONCELOS *et al.*, 1996; GENDRON *et al.*, 2002; COIMBRA *et al.*, 2002; FARIA-PINTO *et al.*, 2004; FIETTO *et al.*, 2004; TASCA *et al.*, 2004). Esta subunidade persistente nos dois experimentos poderia corresponder a uma outra isoforma de ATP difosfohidrolase também reativa com anticorpos anti-apirase de batata, uma forma deglicosilada daquela de 48 kDa, ou a uma subunidade de um complexo multimérico da mesma proteína. Por outro lado, não parece ser nenhuma destas a justificativa para este resultado.

Usando seqüências conhecidas de ATP difosfohidrolases foi possível identificar no banco de dados do NCBI a presença de proteínas hipotéticas identificadas como nucleosídeo difosfatases nos genomas de *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis*, com alta identidade entre elas. Esta hipotética nucleosídeo difosfatase de *L. braziliensis* (número de acesso GENEID 5413969) foi identificada como sendo da família das NTPDases e, interessante, tem massa molecular predita de 47,689 kDa, com um peptídeo sinal posicionado no aminoácido 32-33, que pode ser clivado gerando uma proteína já processada de massa molecular de 44,025 kDa. Portanto, acreditamos que aquela subunidade de aproximadamente 43 kDa, identificada em nossos experimentos, corresponda a esta nucleosídeo difosfatase já processada, que é possivelmente solúvel e secretada de seu local de origem. A imunoreatividade cruzada observada entre os anticorpos anti-apirase de batata e esta isoforma de ATP difosfohidrolase de *L. (V.) braziliensis*, ou com a cepa do Complexo *L. braziliensis*, sugerem fortemente que esta proteína ativa do parasito pertence à família das NTPDases, e que existem epítomos conservados desta proteína entre estas diferentes espécies de organismos.

As proteínas que possivelmente são codificadas estão sendo investigadas em todos os três genomas visando a determinação do papel de cada uma delas no estabelecimento de infecção, envolvimento como fator de virulência ou sobrevivência do parasito (PEACOCK *et al.*, 2007; SMITH, PEACOCK e CRUZ 2007). Como revisado por Kedzierski *et al.* (2006), a identificação de antígenos compartilhados, ou aqueles antígenos espécie-específicos nas diferentes espécies de *Leishmania* poderão ser úteis na formulação de vacinas (KEDZIERSKI *et al.*, 2006). Tem sido especulado que as atividades ATP difosfohidrolásicas de parasitos são úteis na recuperação de purinas, e/ou são associadas aos seus mecanismos contra o organismo do hospedeiro, os quais envolvem ATP ou ADP, tais como

ativação da citotoxicidade de plaquetas, reatividade de linfócitos T citolíticos e/ou controle imunomodulatório (VASCONCELOS *et al.*, 1996; COIMBRA *et al.*, 2002; FARIA-PINTO *et al.*, 2004; FIETTO *et al.*, 2004; TASCA *et al.*, 2004; MAIOLI *et al.*, 2004; PINHEIRO *et al.* 2006). Nossos resultados, e os recentes registros na literatura aqui citados, estimulam futuros estudos comparativos moleculares ou imunológicos entre as diferentes espécies de *Leishmania*.

5.2 RELAÇÃO ESTRUTURAL ENTRE A ISOFORMA DE ATP DIFOSFOHIDROLASE DE *L. (V.) braziliensis* E A APIRASE DE BATATA

Anticorpos policlonais de coelho usados neste trabalho foram produzidos contra uma apirase altamente purificada, isolada da forma nativa de *S. tuberosum*. Esta apirase de batata, como demonstrado por Penido *et al.* (2007), possui razão de atividade ATPásica/ADPásica 1. Esses anticorpos policlonais imunoprecipitaram uma isoforma de ATP difosfohidrolase presente na preparação de *L. (V.) braziliensis* com uma razão atividade ATPásica/ADPásica 1, como observado pela redução de 85% de ambas as atividades medidas no sobrenadante. Interessantemente, anticorpos policlonais contra a apirase de batata também possuem imunoreatividade cruzada com isoformas de ATP difosfohidrolase presentes no homogeneizado de verme ou ovos do *S. mansoni* (VASCONCELOS *et al.*, 1996; FARIA-PINTO *et al.*, 2004), e no homogeneizado de membrana plasmática das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (COIMBRA *et al.*, 2008), sendo capazes de imunoprecipitar nestas amostras isoformas da enzima com razão de atividade ATPásica/ADPásica 1 (VASCONCELOS *et al.*, 1996; COIMBRA *et al.*, 2008). Por outro lado, nenhuma imunoreatividade cruzada foi observada entre a ATP difosfohidrolase de mamíferos e a apirase de batata, sugerindo a presença de domínios particularmente compartilhados entre a proteína vegetal e a dos parasitos (FARIA-PINTO *et al.*, 2006). Estes resultados prévios nos motivaram a analisar a relação estrutural entre as ATP difosfohidrolases já presentes no banco de dados do NCBI, e os seus possíveis epítomos por análises *in silico*.

Análise filogenética de ATP difosfohidrolases de vários organismos mostrou ramos independentes, indicando diferentes caminhos evolucionários para as NTPDases. No entanto, nossos resultados mostraram que existe uma estreita

relação entre apirase de batata e a NDPase de *L. (V.) braziliensis*, tanto na seqüência de aminoácidos da estrutura primária como na estrutura tridimensional, que apontam domínios particulares de alta identidade entre elas. Como mostrado, estas regiões são expostas e disponíveis para ligar anticorpos, sugerindo ainda a presença de epítomos conformacionais.

A região B da NDPase da *L. (V.) braziliensis* é de particular interesse, desde que ela tem alta identidade com a apirase de batata e menor homologia com as proteínas de mamíferos e, portanto, poderia ser a responsável pela imunoreatividade cruzada descrita nesta dissertação. As regiões A, C, D e E, que incluem os domínios conservados característicos da família das ATP difosfohidrolases (HANDA e GUIDOTTI, 1996; VASCONCELOS *et al.*, 1996), bem como as Regiões F e G, têm alta homologia com NTPDases de mamíferos. Estas regiões são potencialmente capazes de ligar anticorpos e/ou moléculas HLA-DR, conforme predição computacional, o que poderia induzir resposta auto-imune ou eliciar resposta regulatória de células T. Recentemente, Requena, Alonso e Soto (2000) revisaram as proteínas evolutivamente conservadas em *Leishmania* sp. e propuseram a denominação de panantígenos para proteínas que: (1) são abundantes nos componentes celulares, (2) são membros de famílias conservadas, (3) formam componentes multiméricos estáveis, (4) são imunógenos proeminentes durante as infecções parasitárias e (5) que podem ser alvos de auto-anticorpos em doenças auto-imunes. Várias proteínas homólogas aos antígenos de *Leishmania* sp. têm sido descritas como imunógenos em outras infecções parasitárias e também em doenças auto-imune (REQUENA, ALONSO e SOTO, 2000). Portanto, os domínios protéicos apontados nesta dissertação como possivelmente antigênicos, e com alta identidade com as NTPDases de mamíferos, podem ser interessantes como alvos para futuras investigações, esclarecendo o papel dos mesmos na imunomodulação ou imunopatologia das leishmanioses.

Hospedeiros e parasitos têm co-evoluído há milhares de anos. Nos mamíferos estes parasitos podem viver durante anos usando uma variedade de mecanismos de evasão e simultânea utilização da resposta imune do hospedeiro para facilitar seu próprio desenvolvimento e sobrevivência (REQUENA, ALONSO e SOTO, 2000; SACKS e SHER, 2002). É possível que regiões específicas das ATP difosfohidrolases sejam conservadas entre as diferentes espécies de parasitos, e que elas podem estar

relacionadas ao sucesso do parasitismo, através de mimetização de moléculas do hospedeiro e/ou imunomodulação da doença.

5.3 A ISOFORMA DE ATP DIFOSFOHIDROLASE DE *L. (V.) braziliensis* POSSUI DOMÍNIOS COMPARTILHADOS COM A APIRASE DE BATATA QUE SÃO ANTIGÊNICOS

Devido a imunoreatividade cruzada observada entre os anticorpos anti-apirase de batata e a isoforma de ATP difosfohidrolase de *L. (V.) braziliensis*, sugerido também pelas análises *in silico*, a antigenicidade da proteína do parasito foi testada em pacientes com leishmaniose cutânea usando esta proteína vegetal como antígeno. A apirase de batata foi reconhecida em “Western blots” pelos soros de pacientes, mas não por soros de indivíduos saudáveis, permitindo o uso da mesma em técnicas de ELISA.

A reatividade dos anticorpos contra a apirase de batata foi comparada àquela obtida com a preparação de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), a mesma usada para a identificação daquela isoforma de 48 kDa descrita nesta dissertação. A reduzida soropositividade de IgM em pacientes com leishmaniose cutânea contra a preparação de promastigotas ou apirase de batata, um anticorpo associado à fase inicial de uma infecção primária (LABRADA *et al.*, 1989), sugerem exposição prévia aos antígenos derivados de formas promastigotas devido às picadas de flebotomíneos infectados, ou até mesmo a outros parasitos que possuem apirase.

A soropositividade de IgA (62%) para antígenos de promastigotas foi elevada, enquanto nenhuma soropositividade de IgE foi detectada. Níveis elevados de IgE foram detectados em pacientes com *L. (V.) panamensis* com duração prolongada da doença, e de IgA naqueles com a forma mucocutânea (O'NEIL *et al.*, 1993). A produção de anticorpos IgE contra os antígenos derivados de formas promastigotas de *L. amazonensis* foi detectada em 40% de pacientes com leishmaniose cutânea (SOUSA-ATTA *et al.*, 2002). Por outro lado, baixa soropositividade de IgA ou IgE (<14 %) foi observada quando apirase de batata foi usada como antígeno, sendo portanto, possível que aqueles domínios conservados não são capazes de estimular

efetivamente estas classes de imunoglobulinas em pacientes com leishmaniose cutânea.

Por outro lado, o elevado nível de anticorpos IgG contra apirase de batata em pacientes com leishmaniose cutânea sugerem que aqueles domínios compartilhados entre as proteínas do parasito e a vegetal são altamente efetivos na indução de resposta imune humoral no hospedeiro humano. É interessante ressaltar que a intensidade da resposta imune humoral em leishmaniose cutânea é menor que aquela encontrada nas outras formas clínicas, mucocutânea ou visceral (RODRIGUEZ *et al.*, 1996; TRUJILLO *et al.*, 1999; DE SOUZA *et al.*, 2005; MARQUES *et al.*, 2006; PEDRAS *et al.*, 2003).

Desde que os isótipos de IgG são possivelmente regulados por resposta imune celular dos tipos Th1 e Th2 (RODRIGUEZ *et al.*, 1996; DE SOUZA *et al.*, 2005; SAHA *et al.*, 2006), a alta soropositividade de anticorpos IgG1 e IgG3 sugerem que existem domínios específicos do parasito, também presentes na apirase de batata, que estimulam uma resposta do tipo Th1, resposta imune que tem sido associada à resistência na leishmaniose cutânea e, portanto, no controle da infecção parasitária (KEDZIERSKI *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2006; TRIPATHI, SINGH e NAIK, 2007). Por outro lado, 48% dos pacientes com leishmaniose cutânea mostraram soropositividade para anticorpos IgG4, sugerindo que outros epítomos compartilhados com a apirase de batata estimulam uma resposta imune do tipo Th2.

Diferentes perfis de isótipos de IgG têm sido observados em leishmaniose cutânea causada por *Leishmania* sp, forma clínica associada a níveis baixos de anticorpos circulantes (RODRIGUEZ *et al.*, 1996; PEDRAS *et al.*, 2003; OZBILGE *et al.*, 2006; SAHA *et al.*, 2006). Subtipos IgG1, IgG2 e IgG3 contra antígenos derivados de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram detectados em leishmaniose cutânea localizada, enquanto o subtipo IgG4 foi detectado em baixos níveis em alguns pacientes (RODRIGUEZ *et al.*, 1996). Pedras *et al.* (2003) observaram que os subtipos IgG2 e IgG4 de pacientes com as formas clínicas cutânea, mucosa ou mucocutânea, não reagiram com antígenos derivados de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Por outro lado, IgG1 e IgG3 foram encontrados em níveis significativamente maiores em leishmaniose mucosa e mucocutânea quando comparados àqueles níveis de IgG1 e IgG3 encontrados na forma clínica cutânea (PEDRAS *et al.*, 2003). Correlação significativa foi encontrada entre os níveis totais de IgG e IgG1 ou IgG3 em soros de pacientes com

leishmaniose cutânea (OZBILGE *et al.*, 2006). Diferentemente, níveis significativamente elevados de anticorpos anti-leishmania, envolvendo todas as classes de anticorpos e subtipos de IgG, são encontrados em leishmaniose visceral causada por outras espécies de *Leishmania* (SAHA e RAGHAVA, 2006).

Recentemente nós reportamos imunoreatividade cruzada entre apirase de batata e soro de camundongos BALB/c infectados com formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (COIMBRA *et al.*, 2008). A infecção foi monitorada durante 90 dias e, usando a apirase de batata como antígeno em técnicas de ELISA, nós observamos nos estágios iniciais da doença níveis elevados de IgG2a, um subtipo associado à resposta imune do tipo Th1. O desaparecimento de resposta de IgG2a e a elevação dos níveis de IgG1, um subtipo associado ao perfil Th2, ocorreu no estágio mais grave da infecção experimental (COIMBRA *et al.*, 2008). Adicionalmente, como mostrado nesta dissertação, a predição de peptídeos da NDPase que são ligantes ao Complexo de Histocompatibilidade Principal de Classe II mostrou regiões, também compartilhadas com a apirase de batata, potencialmente indutoras de resposta de células T regulatórias. Os resultados experimentais, associados àqueles obtidos por predição computacional, sugerem fortemente a existência de diferentes domínios nas ATP difosfohidrolases de parasitos, também presentes na apirase de batata, que são capazes de estimular resposta imune humoral e resposta imune celular dos tipos Th1 e Th2. O padrão Th1/Th2 de resposta imune como resultado da infecção por *Leishmania* sp. tem sido bem estudado e vários antígenos estão envolvidos no estímulo de células T regulatórias, ou na susceptibilidade ou resistência a infecção (KEDZIERSKI, ZHU e HANDMAN, 2006; SACKS e SHER *et al.*, 2002). Portanto, é possível que estes domínios aqui mostrados estejam envolvidos nos mecanismos de susceptibilidade e/ou resistência do organismo hospedeiro, sugerindo investigações futuras.

É interessante ressaltar que, além daqueles antígenos indutores de resposta auto-imune, existem outros que são membros de famílias de proteínas altamente conservadas, encontrados em todos os tipos de células de procariotos ou eucariotos, e que apesar disso induzem respostas imune celular e humoral altamente específicas, sem a indução simultânea de auto-anticorpos durante as infecções (REQUENA, ALONSO E SOTO, 2000). Assim, é possível que a análise dos subtipos de imunoglobulinas, usando a apirase de batata nativa ou seus peptídeos antigênicos como antígenos, mostrem diferenças de resposta imune entre

as doenças parasitárias, levando a sensibilidade e a especificidade requeridas em métodos imunodiagnósticos, imunoterápicos ou imunoproliféricos de doenças infecto-parasitárias. Os peptídeos da apirase de batata, bem como os fragmentos de cDNA das ATP difosfohidrolases de parasitos que codificam estas possíveis porções antigênicas serão testados, isoladamente ou em conjunto, com os soros de pacientes com parasitoses diversas.

Nem todos os peptídeos ou recombinantes derivados de proteínas antigênicas mostram as mesmas propriedades quando comparados à proteína nativa, uma vez que proteínas recombinantes em conformação estrutural inadequada ou simples peptídeos podem ser fracamente imunogênicos (TRUJILLO *et al.*, 1999; PURCELL, MCCLUSKEY e ROSSJOHN, 2007). Várias estratégias têm sido avaliadas para modificar peptídeos e aumentar a imunogenicidade e a estabilidade (TRUJILLO *et al.*, 1999; PURCELL, MCCLUSKEY e ROSSJOHN, 2007). Essas observações reforçam a importância dos resultados já obtidos com a proteína vegetal nativa, mostrados nesta dissertação.

Além disso, como os ciclos de vida dos parasitos que apresentam domínios antigênicos em suas isoformas de ATP difosfohidrolase são muito diferentes, a elucidação dos caminhos pelos quais estas proteínas são processadas e apresentadas às células efectoras do sistema imune do hospedeiro poderão auxiliar no esclarecimento da imunopatologia das doenças infecto-parasitárias e ajudar no desenvolvimento de imunoterapias protetoras.

O controle epidemiológico das leishmanioses através de medidas profiláticas, da implementação de uma vacina e do tratamento em massa das populações parasitadas é de altíssima relevância. A caracterização imunológica da ATP difosfohidrolase de *L. (V.) braziliensis*, uma avaliação de seu papel na interação hospedeiro-parasito e nos eventos imunoregulatórios complexos da leishmaniose cutânea poderão abrir novas perspectivas no estudo da doença.

6. CONCLUSÕES

- Existe nas formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* uma isoforma de ATP difosfohidrolase ativa e com peso molecular estimado de 48 kDa, que possui imunoreatividade cruzada com a apirase de batata (*Solanum tuberosum*).

- As análises *in silico* sugeriram que embora as ATP difosfohidrolases de diferentes organismos estejam em ramos independentes, existe estreita relação estrutural entre a apirase de batata e esta isoforma de ATP difosfohidrolase de *L. (V.) braziliensis*. De acordo com predição, existem domínios na proteína do parasito, também encontrados na apirase de batata, que são antigênicos. Os domínios homólogos foram também identificados na estrutura tridimensional globular destas proteínas, sugerindo ainda a presença de epitopos conformacionais.

- Existe imunoreatividade cruzada entre soros de pacientes com leishmaniose cutânea e a apirase de batata. O perfil de resposta imune humoral destes pacientes contra os domínios compartilhados entre as proteínas do parasito e do vegetal e contra a preparação de promastigotas mostra elevação dos níveis de IgG1, IgG3 e IgG4, sugerindo que estes subtipos contribuem para a elevação dos níveis de IgG total.

- Como existe imunoreatividade cruzada entre a apirase de batata e outros parasitos, será interessante determinar o tipo de resposta imune que os domínios compartilhados induzem. Os ciclos de vida dos parasitos são muito diferentes em hospedeiros mamíferos, e estes estudos poderão contribuir na elucidação dos caminhos pelos quais as apirases são processadas e apresentadas às células efetoras do sistema imune do hospedeiro.

- Esta dissertação mostra que existem domínios específicos potencialmente envolvidos na resposta imune. Eles parecem ser conservados durante a co-evolução do parasito e hospedeiro. Nós consideramos que estudos futuros, tanto dos domínios do parasito quanto da apirase de batata, ou de seus peptídeos, poderão ser de relevância como marcador molecular de populações infectadas, desenvolvimento de novas drogas e/ou de vacinas.

4 RESULTADOS.....	42
4.1 Detecção de atividade fosfohidrolítica e de uma isoforma de ATP difosfohidrolase em formas promastigotas de <i>Leishmania</i> sp.....	42
4.2 Análise <i>in silico</i> da apirase de <i>S. tuberosum</i> e da NDPase de <i>L. braziliensis</i>	48
4.3 Imunoreatividade cruzada entre a apirase de <i>S. tuberosum</i> e soros de pacientes com leishmaniose cutânea.....	55
5 DISCUSSÃO.....	60
5.1 Detecção de uma isoforma ativa de ATP difosfohidrolase em formas promastigotas de <i>Leishmania</i> sp.....	60
5.2 Relação estrutural entre a isoforma de ATP difosfohidrolase de <i>L. (V.) braziliensis</i> e a apirase de batata.....	64
5.3 A isoforma de ATP difosfohidrolase de <i>L. (V.) braziliensis</i> possui domínios compartilhados com a apirase de batata que são antigênicos.....	66
6 CONCLUSÕES.....	70
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; GUTIÉRREZ-SOLAR, B.; JIMÉNEZ, M.; LAGUNA, F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; MOLINA R.; MORENO J. 1997. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, **10 (2)**: 298-319.

AMATO, V.S. 2006. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Boletim Epidemiológico Paulista**, **3 (26)**.

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

ASHFORD, R.W. 1997. The leishmaniasis as model zoonoses. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, **91 (7)**: 693-701.

ASHFORD, R.W.; BATES, P.A. 1998. Leishmaniasis on the old World. In: FEG Cox, JP Kreier; Wakelin (eds) **Microbiology and Microbial infection**. Oxford University Press: 215.

AVILA, J.L.; HERNANDEZ-MORALES, D.; POLEGRE, M.A., CONVIT, J. 1989. On the acid phosphatase isoenzymes existing in American Leishmania promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, **94(2)**:335-342.

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

BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. 2004. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, **7 (3)**: 328-337.

BENAIM, G. 1993. Intracellular calcium homeostasis. Calmodulin and Ca(2+)-ATPase of the plasma membrane of Trypanosomatids. **Acta científica Venezolana**, **44 (2)**: 57-66.

BERMUDES, D.; PECK, K.R.; AFIFI M. A.; BECKERS, C.J.M.; JOINER, K.A. 1994. Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms

secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Biological Chemistry**, **269**: 29252-29260.

BHATNAGAR, V.; RAMALAH, A. 1998. Characterization of Mg²⁺-ATPase activity in isolated B16 murine melanoma melanosomes. **Molecular and Cell Biochemistry**, **189**: 99-106.

BURNSTOCK, G. 2001. Purine-mediated signalling in pain and visceral perception. **Trends in Pharmacological Science**, **22**: 182-188.

BUSSE, D.; POHL, B.; BARTEL, H.; BUSCHMANN, F. 1980. The Mg²⁺-dependent adenosine triphosphatase activity in the brush border of rabbit kidney cortex. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **201**: 147-159.

CAMARGO, L.M.A.; BARCINSKI, M.A. 2003. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência e Cultura**, **55 (1)**: 34-37.

CAMPOS-NETO, A. 2005. What about Th1/Th2 in cutaneous leishmaniasis vaccine discovery. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **38 (7)**: 979-984.

CARAFOLI, E. 1991. Calcium pump of the plasma membrane. **Physiology Review**, **71**: 129-153.

CASTELLANO, L.R.C., 2005. Resposta imune anti-Leishmania e mecanismos de evasão. **VITAE Academia Biomédica Digital**, **25**.

COIMBRA, E.S.; GONÇALVES DA COSTA, S.C.; CORTE-REAL, S.; FREITAS, F.G.R.; DURÃO, A.; SOUZA, C.S.F.; SILVA SANTOS, M.I.; VASCONCELOS, E.G. 2002. Characterization and cytochemical localization of an ATP diphosphohydrolase from *Leishmania amazonensis* promastigote. **Parasitology**, **124**: 137-145.

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

COFFMAN, R.L.; CARTY, J.A. 1988. T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by IFN- γ . **Journal of Immunology**, **136**: 949-954.

COLER, R.N.; REED, S.G. 2005. Second generation vaccines against leishmaniasis, **Trends Parasitology**, **21**: 244-249.

CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. 2006. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, **19 (1)**: 111-126

DE AGUIAR MATOS, J.A.; BORGES, F.P.; TASCA, T.; BOGO, M.R.; DE CARLI, G.A.; DA GRAÇA, F. M.; DIAS RD.; BONAN C.D. 2001. Characterisation of an ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. **International Journal for Parasitology**, **31 (8)**: 770-5.

DE SOUZA, M.A., SILVA, A.G., AFONSO-CARDOSO, S.R.; JUNIOR, S.F.; FERREIRA, M.S. 2005. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **38**: 137-141.

FARIA-PINTO, P.; MEIRELLES, M.N.L.; LENZI, H.L.; MOTA, E.M.; PENIDO, M.L.O.; COELHO, P.M.Z. 2006. Cross-immunoreactivity between anti-potato apyrase antibodies and mammalian ATP diphosphohydrolases: potential use of the vegetal protein in experimental schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **101**: 359-63.

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

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

GENDRON, F.P.; BENREZZAK, O.; KRUGH, B.W.; KONG, Q.; WEISMAN, G.A.; BEAUDOIN, A.R. 2002. Purine signaling and potential new therapeutic approach: possible outcomes of NTPDase inhibition. **Current Drug Targets**, **3 (3)**: 229-45.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. 2003. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **36 (1)** : 71-80.

GUEx, N.; PEITSCH, M.C. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, **18**: 2714-2723.

GUTIERREZ, Y.; SALINAS, G.H.; PALMA, G.; VALDERRAMA, L.B.; SANTRICH, C.V.; SARAIVA, N.G. 1991. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **45**: 281-289.

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

HANDMAN, E. 2001. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clinical Microbiology Reviews**, **14**: 229-243.

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

IVANENKOV, V.V.; MELLER, J.; KIRLEY, T.L. 2005. Characterization of disulfide bonds in human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 (NTPDase3): implications for NTPDase structural modeling. **Biochemistry**, **44**: 8998-9012.

KEDZIERSKI, L.; ZHU, Y.; HANDMAN, E. 2006. Leishmania vaccines: progress and problems. **Parasitology**, **133**: S87-S112.

KETLLUN, A.M.; URRRA, R.; LEYTON, M.; VALENZUELA, M.A.; MANCILLA, M.; TRAVERSO-CORI, A. 1982. Purification and characterization of two isoapyrases from *Solanum tuberosum* var. Ultimeus. **Phytochemistry**, **31**: 3691-3696.

KILLICK-KENDRICK, R. 1990. The life cycle of *Leishmania* in the sandfly with special references to the form infective to the vertebrate host. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, **65** (1) : 37-42.

KILLICK-KENDRICK, R. 1999. The biology and control of Phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, **17** (3): 279-289.

KNOWLES, A.F.; NAGY, A.K. 1999. Inhibition of an ecto-ATP-diphosphohydrolase by azide. **European Journal of Biochemistry**, **262**: 349-357.

LABRADA, M.; WEIGLE, K.; VALDERRAMA, L.; SARAIVA, N.G.; 1989. Evaluation of immunoglobulin isotype specific to *Leishmania* in tegumentary American leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **84**: 409-416.

LABORATÓRIO DE IMUNOMODULAÇÃO - DPTO. DE PROTOZOOLOGIA/IOC – FIOCRUZ. SITE: www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/index.htm (Acessado em 29 de abril de 2007).

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

LANGSTON, H.P.; KE, Y.; GEWIRTZ, A.T.; DOMBROWSKI, K.E.; KAPP, J.A. 2003. Secretion of IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. **The Journal of Immunology**, **170 (6)**: 2962-2970.

LASKOWSKI, R.; MACARTHUR, M.; MOSS, D.; THORNTON, J. 1993. PROCHECK: a program to check stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, **26**: 283-290.

LEVINE, C.N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B.M.; LEEDALE, G.F.; LOEBLICH, A.R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E.G.; PAGE, F.C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F.G. 1980. A newly revised classification of the protozoa. **Journal of Protozoology**, **27 (1)**: 37-58.

LOPEZ, M.; INGÁ, R.; CANGALAYA, M.; ECHEVARRIA, J.; LLANOS-CUENTAS, A.; ORREGO, C.; AREVALO, J. 1993. Diagnosis of Leishmania using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **49**: 348-356.

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

MAIOLI, T.U.; TAKANE, E.; ARANTES, R.M.E.; FIETTO, J.L.R.; AFONSO, L.C.C. 2004. Immune response induced by New World Leishmania species in C57BL/6 mice **Parasitology Research**, **94 (3)**: 207-212.

MARQUES, M.J.; VOLPINI, A.C.; GENARO, O.; MAYRINK, W.; ROMANHA, A.J. 2001. Simple form of clinical sample preservation and Leishmania DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **65**: 902-906.

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

MARZOCHI, M.C.A. 1992. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, **63**: 82-104.

MARZOCHI, M.C.; MARZOCHI, K.B. 1994. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Caderno de Saúde Pública**, **10 (2)**: 359-75.

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

MAYRINK, W.; TOLEDO, V.P.C.P.; GOLLOB, K.J.; OLIVEIRA, M.A.P.; COST, C.A.D.A.; GENARO, O.; PINTO, J.A.; AFONSO, L.C.C. 2001. Immunochemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **96 (1)**: 89-98.

MAYRINK, W.; BOTELHO, A.C.C.; MAGALHÃES, P.A.; BATISTA, S.M.; LIMA, A.O.; GENARO, O.; COSTA, C.A.; MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.M.; WILLIAMS, P.; DIAS, M.; CAIAFFA, W.T.; NASCIMENTO, E.; MACHADO-COELHO, G.L.L. 2006. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **39 (1)**: 14-21.

MAZUMDER, S.; MUKHRJEE, T.; GHOSH, J.; RAY, M.; BHADURI, A. 1992. Allosteric modulation of *Leishmania donovani* plasma membrane Ca(2+)-ATPase by endogenous calmodulin. **Journal of Biological Chemistry**, **267(26)**:18440-18446.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2006. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial** – Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 136 p.: il. color. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2007. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**

Americana– 2. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde. 182 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

MIZUMOTO, N.; KUMAMOTO, T.; ROBSON S.C.; SÉVIGNY, J.; MATSUE, H.; ENJYOJI, K.; TAKASHIMA, A. 2002. CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: Modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. **Nature Medicine**, **8 (4)**: 336-338.

MOSSER, D.M.; EDELSON, P.J. 1984. Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. **The Journal of Immunology**, **132 (3)**:1501-5.

MEYER-FERNANDES, J.R. et al., 1997. Mg-dependent Ecto-ATPase activity in *Leishmania tropica*. **Ach Biochem Biophys**, 341: 40-46

NEVES, D.P. 1995. Parasitologia Humana. Editora Atheneu, 9º edição: 34-64.

O'NEIL, C,E.; LABRADA, M.; SARAVIA, N.G. 1993. *Leishmania (Viannia) panamensis* – specific IgE and IgA antibodies relation to expression of human tegumentary leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **49**: 181-188.

Organização Mundial de Saúde, 2004. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004) Leishmaniasis. (<http://www.who.int/emc/disease/leish/index.html>). Acessado em 08 de julho de 2007.

OZBILGE, H.; AKSOY, N.; GUREL, M.S.; YASAR, S. 2006. IgG and IgG subclasses antibodies in patients with active cutaneous leishmaniasis. **Journal of Medical Microbiology**, **55**: 1329-1331.

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

PEDRAS, M.J.; ORSINI, M.; CASTRO, M.; PASSOS, V.M.A.; RABELLO, A. 2003. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, **47**: 477-485.

PENIDO, M.L.O.; RESENDE, D.M.; VIANELLO, M. A.; BORDIN, F.H.S.; JACINTO, A.A.; DIAS, W. D.; MONTESANO M. Â.; NELSON, D. L.; COELHO, P.M.Z.; VASCONCELOS, E. G. 2007. A new series of schistosomicide drugs, the alkylaminoalkanethiosulfuric acids, partially inhibit the activity of *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. **European Journal of Pharmacology**, **570 (1-3)**: 10-7.

PERIYASAMY, S.M.; HUANG, W.; ASKARL, A. 1983. Origins of the different sensitivities of (Na⁺/K⁺)-dependent adenosine triphosphatase preparations to ouabain. **Comparative Biochemistry and Physiology**, **176B**: 449-454.

PINHEIRO, C.M. 2005. A ecto-ATPase de *Leishmania amazonensis* como membro da família das NTPDases e seu possível envolvimento na aquisição de adenosina e virulência. **Tese (Doutorado em Química Biológica)** – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

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

PINHEIRO, R.O. 2004. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. **Infarma**, **16**: 7-8.

PLESNER, L. 1995. Ecto-ATPases: identities and functions. **International Review of Cytology**, **158**: 141-214.

PURCELL, A.W.; MCCLUSKEY, J.; ROSSJOHN, J. 2007. More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. **Nature Drugs Discovery**, **6 (5)**:404-14.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological Reviews**, **50 (3)**: 413-92.

REY, L. **Parasitologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

REIS, L.C.; DE BRITO, M.E.F.; SOUZA, M.A.; RÊGO, V. 2006. Mecanismos Imunológicos na Resposta Celular e Humoral na Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista de Patologia Tropical**, **35 (2)**: 103-115.

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

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

RIBEIRO, J.M.C.; KATZ, O.; PANNELL, L.K.; WAITUMBI, J.; WARBURG, A. 1999. Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacological active amounts of adenosine and 5'-AMP. **The Journal of Experimental Biology**, **202**: 1551-1559.

RODRIGUEZ, V.; CENTENO, M.; ULRICH, M. 1996. The IgG isotypes of specific antibodies in patients with American cutaneous leishmaniasis; relationship to the cell-mediated immune response. **Parasite Immunology**, **18**: 341-345.

SACKS, D.; SHER, A. 2002. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**, **3**: 1041-1047.

SAHA, S.; RAGHAVA, G.P. 2006. Prediction of continuous B cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. **Proteins**, **65**: 40-48

SALI, A.; BLUNDELL, T.L.; 1993. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**, **234**: 779-815.

SANCHEZ, R.; SALI, A. 1997. Evaluation of comparative protein structure modeling by MODELLER-3. **Proteins**, **1**: 50-58.

SANTOS FILHO, O.A.; ALENCASTRO, R.B. 2003. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, **26 (2)**: 253-259.

SINGH, H.; RAGHAVA, G.P. 2001. Proped: prediction of HLA-DR binding sites. **Bioinformatics**, **17**: 1236-1237.

SIPPL, M.J. 1993. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Proteins**, **17**: 355-362.

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

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

SOUSA-ATTA, M.L.B.; SALAMÉ, G.S.; D'OLIVEIRA, J.R.; A, ALMEIDA, R.P.; ATTA, A.M.; CARVALHO, E.M. 2002. Immunoglobulin E antileishmanial antibody response in cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, **9**: 101-104.

SUCEN, 2000-2001. **Superintendência de Controle de Endemias**. Site: www.sucen.sp.gov.br. Acessado em 03 de agosto de 2007.

SOLOWAY, P.; FISH, S.; PASSMORE, H.; GEFTER, M.; COFFEE, R.; MANSER, T. 1991. Regulation of the immune responses to peptide antigens: differential induction of immediate-type hypersensitivity and T cell proliferation due to changes in either peptide structure or major histocompatibility complex haplotype. **The Journal of Experimental Medicine**, **174**: 847-858.

TASCA, C.D. BONAN, G.A. DE CARLI, G.A.; SARKIS, J.J.F. 2004. *Trichomonas vaginalis*: cytochemical localization of a NTPDase1 and an ecto-5'-nucleotidase and effects of adenine nucleotides on cellular viability. **Parasitology Research**, **93**: 300-303.

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

TRAVERSO-CORI, A.; CHAIMOVICH, H.; CORI, O. 1965. Different molecular forms of potato apyrase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **137**: 133-142.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. 2007. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. **Medical Microbiology and Immunology**, **51**: 229-242

TRUJILLO, C.; RAMIREZ, R.; VÉLEZ, I.D.; BERBERICH, C. 1999. The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with

American leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. **Immunology Letters**, **70**: 203-209.

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

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

WEBER, J.; SENIOR, A.E. 1998. Effects of the inhibitors azide, dicyclohexylcarbodiimide, and aurovertin on nucleoside binding to the three F1-ATPase catalytic sites measured using specific tryptophan probes. **Journal of Biological Chemistry** **273**: 33210-33215.

ZIMMERMANN, H. 1999. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and search for function. **Trends in Pharmacological Sciences**, **20**: 231-236.

ZIMMERMANN, H.; BRAUN, N. 1999. Ecto-nucleotidases: molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system. **Progress in Brain Research**, **120**: 371-85.

ZIMMERMANN, H.; VOLLMEYER, P.; KOCH, M.; BRAUN, N.O.; HEINE, P.; SERVOS, J.; ISRAR, E.; KEGEL, B. 2001. Multiple ecto-nucleotidases in PC12 cells: identification and cellular distribution after heterologous expression. **Journal of Neurochemistry**, **78 (5)**: 1019-1028.