

RODRIGO DE BARROS FREITAS

OBTENÇÃO DE HIBRIDOMAS PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS
MONOCLONAIS CONTRA A PROTEÍNA E-NTPDase-2 DE *Leishmania major*

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Viçosa, como parte das
exigências do Programa de
Pós-Graduação em
Bioquímica Agrícola, para
obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

F866o
2010

Freitas, Rodrigo de Barros, 1983-
Obtenção de hibridomas para a produção de anticorpos
monoclonais contra a proteína E-NTPDase-2 de
Leishmania major / Rodrigo de Barros Freitas. – Viçosa,
MG, 2010.

xii, 81f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográfica: f. 66-79.

1. Anticorpos monoclonais. 2. *Leishmania major*.

I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

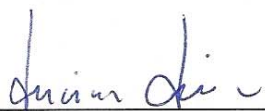
CDD 22.ed. 572.8

RODRIGO DE BARROS FREITAS

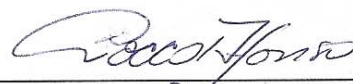
OBTENÇÃO DE HIBRIDOMAS PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS
MONOCLONAIS CONTRA A PROTEÍNA E-NTPDase-2 DE *Leishmania major*

Dissertação apresentada
à Universidade Federal de
Viçosa, como parte das
exigências do Programa de
Pós-Graduação em
Bioquímica Agrícola, para
obtenção do título de
Magister Scientiae.

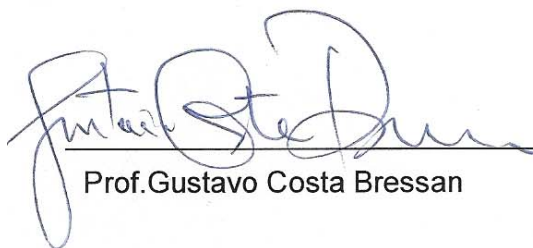
APROVADA: 27 de julho de 2010.



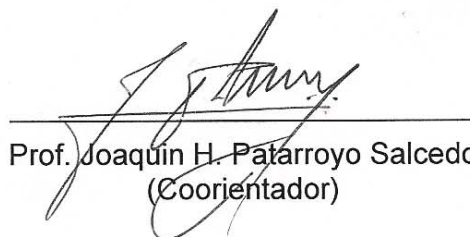
Prof.ª Luciana Moreira Lima



Prof. Luis Carlos Crocco Afonso



Prof. Gustavo Costa Bressan



Prof. Joaquín H. Patarroyo Salcedo
(Coorientador)



Prof.ª Juliana Lopes Rangel Fietto
(Orientadora)

Aos meus amados pais - Judite e Fernando, pela de dedicação incondicional, meus irmãos Tiago e Ana Claudia pela força e companheirismo, aos meus avós - Lino, Antônio, Custódio, Maria, Teresinha e Eva, por representarem o indescritível em minha vida, a minha amada Bianca por tornar minha vida mais bonita e feliz.

Obrigado a todos!

AGRADECIMENTOS

Chegar ao fim de uma dissertação de mestrado é sem dúvida fruto da contribuição de muitos, junto à benção de Deus. Desta maneira agradeço a todos que colaboraram para a conclusão deste projeto.

À DEUS por estar ao meu lado abençoando minhas escolhas e guiando meus passos, pelo dom da vida que se revela neste pequeno instante entre duas eternidades.

À minha família pela empolgação, assistência e estímulo fornecidos em toda minha vida acadêmica. Obrigado Pai pelo amor ao conhecimento, passado em atos e palavras, e pelo exemplo de esforço e empenho dedicados aos sonhos. Obrigado Mãe pelo companheirismo e dedicação neste momento, foi fundamental.

À professora Juliana L. R. Fietto pelo exemplo de profissional que é. Obrigado por todo aprendizado que sua orientação me proporcionou. Trabalhar em sua equipe neste período foi mais que aprender a pesquisar, foi aprender a conviver. Obrigado pela atenção dedicada e pela tranquilidade no trabalho. Dedico a você professora toda minha gratidão pela segurança que me proporcionou na elaboração dos trabalhos.

A Bianca, por ser meu porto seguro, minha única certeza em meio a tantas incertezas. Obrigado por toda ajuda e tempo dedicado. Foi mais fácil trabalhar tendo você ao meu lado. Obrigado a Neusa, João, Barbara e Luana, pelo acolhimento neste período.

Aos amigos do Laboratório de Infectologia Molecular Animal pelo companheirismo e aprendizado. Sem vocês o trabalho seria mais difícil. Obrigado Antônio, Raphael, Lucas, Matheus, Yaro, Roni, Felipe, Tcha-Tcha, Cristiane, Mariana, Fernanda, Luciana, Josi, Luana, Xênia, Tonieli, Pedro, Ethel, Ramon e tantos outros. A todos vocês agradeço de coração. A Larissa e Myrian meu especial agradecimento por estarem perto e trabalharem em parceria durante este período.

A professora Márcia e ao Professor Abelardo pelo suporte acadêmico e envolvimento no projeto.

Aos coorientadores, Prof. Joaquim Patarroyo e Prof. Leandro Licursi, fundamentais na confecção desta dissertação.

Aos membros da banca: Prof^a.Luciana Moreira Lima; Prof.Luis Carlos Crocco Afonso; Prof.Gustavo Costa Bressan; Prof. Joaquin H. Patarroyo Salcedo por aceitarem compor esta equipe.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ. Pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao seu Valdir pelo apoio técnico e amizade. Foi muito bom poder contar com o senhor.

Aos amigos do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários pela ajuda na elaboração dos experimentos. Agradeço ao Marcinho pela amizade e tempo dedicado no intuito de ajudar, obrigado mesmo. Ao Sidimar, Carlos, Leandro, Bel, Cintia, Elisangela e tantos outro. Apredei muito com vocês.

Aos amigos da Pequena Via por entenderem minha ausência neste periodo e contribuírem de forma integral na minha formação. Amo vocês!

Aos querido amigos da Bioquímica 2004 pela amizade e alegria de poder ter convivido com vocês. Saudades.

Aos animais experimentais, sem eles seria impossível a realização deste trabalho.

Pra finalizar... A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Leishmanioses.....	3
2.2. Biologia do Parasito.....	4
2.3. Apresentação Clínica.....	8
2.3.1. Leishmaniose Cutânea.....	8
2.3.2. Leishmaniose Mucocutânea.....	9
2.3.3. Leishmaniose Visceral.....	9
2.4. Papel dos cães na dinâmica da Leishmaniose	10
2.5. Tratamento com drogas.....	11
2.6. Diagnóstico.....	13
2.7. Vacinação.....	16
2.8. E-NTPDase.....	17
2.9. Anticorpos monoclonais.....	21
3. Objetivos.....	26
3.1. Objetivos gerais.....	26
3.2. Objetivos específicos.....	26
4. Materiais e Métodos.....	27
4.1. Local.....	27
4.2. Animais experimentais.....	27
4.3. Expressão heteróloga da NTPDase-2 de <i>L. major</i> em sistema bacteriano..	27
4.3.1. Desenho dos iniciadores para retirada do peptídeo sinal.....	27
4.3.2. Amplificação da sequência codificante da porção solúvel da NTPDase-2 de <i>L. major</i> por PCR.....	29
4.3.3. Purificação do fragmento de DNA do gel de agarose.....	30
4.3.4. Vetores de Clonagem e de Expressão.....	30

4.3.5. Clonagem em vetor de entrada pJET-Blunt com extremidade cega	32
4.3.6. Clonagem em vetor de expressão pET21b com extremidades Coesivas.....	32
4.3.7. Transformação de células de <i>E. coli</i> competentes pelo método de choque térmico.....	33
4.3.8. Extração de DNA plasmidial.....	33
4.3.9. Crescimento bacteriano em meio líquido e estoque dos clones.....	34
4.3.10. Clivagens enzimáticas.....	34
4.3.11. Sequenciamento.....	34
4.3.12. Indução da expressão protéica	35
4.4. Purificação da proteína recombinante.....	35
4.4.1. SDS-PAGE e coloração com nitrato de prata.....	37
4.4.2. <i>Western blot</i>	38
4.4.3. Dosagem de proteínas pelo método de Bradford.....	38
4.5. Imunização dos animais.....	39
4.5.1. Inoculação dos animais.....	39
4.5.2. Coleta de sangue.....	39
4.6. Cultivo das células de Mieloma SP2/0.....	40
4.7. Contagem das células.....	41
4.8. DOT-ELISA para avaliação da produção de anticorpos específicos no soro dos camundongos.....	41
4.9. Coleta dos linfócitos.....	42
4.10. Fusão.....	43
4.11. Coleta de sobrenadante do cultivo celular.....	44
4.12. ELISA para avaliação da produção de anticorpos monoclonais anti-NTPDase-2 do sobrenadante dos hibridomas.....	44
5. Resultados e Discussão.....	46
5.1. Clonagem nos vetores pJET-Blunt e Pet-21b.....	46
5.2. Expressão e purificação da proteína E-NTPDase-2 heteróloga de <i>L.major</i> .	54
5.3. Análise protéica por <i>Western blot</i>	56

5.4. Imunização dos camundongos BALB/c.....	57
5.5. Titulação do soro hiperimune.....	59
5.6. Produção dos hibridomas produtores de anticorpos monoclonais.....	60
5.6.1 Cultivo do mieloma.....	60
5.6.2. Fusão.....	61
6. Conclusões.....	64
6.1. Perspectivas futuras.....	64
7. Referências Bibliográficas.....	66

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Página
Tabela 1. Correlação entre as formas clínicas da doença, espécie do patógeno e a região de prevalência no globo.....	4
Figura 1. Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania</i>	6
Figura 2. Fotos de pacientes com Leishmaniose	10
Figura 3. Topologia de membrana e propriedades catalíticas das diferentes famílias de ecto-nucleotidases	20
Figura 4. Desenho esquemático da técnica para a produção de hibridomas e clones secretores de anticorpos monoclonais.....	23
Figura 5. Esquema da região codificante da E-NTPDase2 de <i>L. major</i> e da posição dos iniciadores usados na amplificação da região codificante da porção solúvel da proteína.....	28
Tabela 2. Seqüências dos iniciadores utilizados para ampliações do amplicon codificante da porção solúvel da NTPDase-2 de <i>L. major</i>	29
Figura 6. Mapa físico do vetor de clonagem pJET-Blunt.....	30
Figura 7. Mapa físico do vetor de expressão pET21b.....	31
Figura 8. Cronograma de inoculação e coleta do sangue.....	40
Figura 9. Sequência nucleotídica e aminoacídica da E-NTPDase-2 de <i>L. major</i>	48
Figura 10. Amplificação e purificação do gene referente à E-NTPDases 2 de <i>L. major</i>	49
Figura 11. Extração do DNA plasmidial e clivagem enzimática do DNA recombinante.....	51
Figura 12. Extração do DNA plasmidial, clivagem enzimática do vetor e purificação das seqüências de interesse.....	52
Figura 13. Confirmação da clonagem do amplicon referente a NTPDase 2 em vetor de expressão pET-21b.....	53
Figura 14. Purificação dos corpos de inclusão contendo a proteína heteróloga E-NTPDase-2 de <i>L. major</i>	55
Figura 15. Purificação em resina de afinidadeda NI-NTA da proteína heteróloga E-NTPDase-2 de <i>L. major</i>	56
Figura 16. <i>Western blot</i>	57
Figura 17. DOT ELISA do soro dos camundongos imunizados com a proteína E-NTPDase-2 de <i>L. major</i>	58
Figura 18. DOT ELISA da titulação do soro imune.....	59
Figura 19. Mieloma.....	61
Figura 20. Hibridoma.....	62
Figura 21. Ensaio de ELISA.....	63

RESUMO

FREITAS, Rodrigo de Barros, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2010. **Obtenção de hibridomas para a produção de anticorpos monoclonais contra a proteína E-NTPDase-2 de *Leishmania major*.** Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto. Coorientadores: Márcia Rogéria de Almeida Lamego; Leandro Licursi de Oliveira; Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo e Abelardo Silva Junior.

As Leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* que atualmente representam um problema de saúde pública no Brasil e em outros países do mundo. As E-NTPDases ou apirases, presentes nesses parasitos, têm como principal função a degradação de nucleotídeos, especialmente extracelulares di e/ou trifosfatados, permitindo ao parasito a modulação da resposta imune do hospedeiro, que necessita da sinalização purinérgica, e favorecendo o desenvolvimento celular por sua participação na via de recuperação de purinas das quais os parasitos são dependentes. Os anticorpos monoclonais são oriundos de um hibridoma para reconhecimento de um determinado antígeno e podem ser selecionados para uma especificidade desejada, produzidos em grande quantidade e com boa qualidade. Este trabalho teve como objetivo a expressão heteróloga da proteína E-NTPDase-2 de *L. major* e produção de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais contra esta proteína. Para isso foi feito o desenho de iniciadores específicos visando a amplificação da região codificante da porção solúvel (ecto-domínio) da E-NTPDase-2, sem a porção codificante para a região do peptídeo amino-terminal, perfazendo um DNA com 1053 pares de base. O amplicom foi obtido com amplificação por PCR, clonado em vetor de amplificação (pJET-bunt) e de expressão (pET-21b) em sistema bacteriano (*E. coli* DH5 α). A expressão da proteína E-NTPDase-2 foi realizada em sistema bacteriano (*E. coli* BL-21) e a purificação foi feita por cromatografia de afinidade em coluna de Ni²⁺-agarose (Ni-NTA). Com a proteína purificada procedeu-se as imunizações dos camundongos e conseqüente confirmação da produção de anticorpos anti-NTPDase 2 por DOT ELISA. A fusão da células B dos camundongos

imunizados, com as células de mieloma (Sp20) foi realizada para obtenção dos hibridomas. Desta maneira foram isolados hibridomas anti-E-NTPDase-2 de *L.major* que poderão ser utilizados em várias aplicações futuras, como o diagnóstico e tratamento da Leishmaniose canina.

ABSTRACT

FREITAS, Rodrigo de Barros, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2010. **Obtenção de hibridomas para a produção de anticorpos monoclonais contra a proteína E-NTPDase-2 de *Leishmania major***. Adviser: Juliana Lopes Rangel Fietto. Co-Advisers: Márcia Rogéria de Almeida Lamego; Leandro Licursi de Oliveira; Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo e Abelardo Silva Junior.

Leishmaniasis are parasitic diseases caused by protozoa of the Kinetoplastida order, *Trypanosomatidae* family and *Leishmania* genus. It currently represents a public health problem in Brazil and other countries in the world. The E-NTPDase or apyrases present in such parasites are mainly responsible for the degradation of nucleotides, especially extracellular di- and/or triphosphate, thus allowing the parasite to modulate an immune response in the host, which needs a purinergic signalling, and promoting the cellular development for its participation in the purine salvage pathway, in which the parasites are dependent. Monoclonal antibodies are originated of a hybridoma for the recognition of a specific antigen and can be selected for a desired specificity as well as produced in large scale and with good quality. This research aimed the expression of the heterologous *L.major* E-NTPDase-2 proteins and the production of monoclonal antibody-secreting hybridomas against such protein. A design of specific primers aiming the amplification of the coding region of the soluble portion (ecto-domain) of the E-NTPDase-2 was proposed, without the coding region for the amino-terminal peptide portion, resulting in a 1053-base-pair DNA. The amplicon was obtained by PCR amplification, cloned into an amplification (pJET-bunt) and expression (pET-21b) vector of bacterial system (*E. coli* DH5 α). The protein expression of the E-NTPDase-2 was carried out in a bacterial system (*E. coli* BL-21) and the purification was performed by affinity chromatography on a Ni²⁺-agarose column (Ni-NTA). With the purified protein, immunizations of the mice were conducted with subsequent confirmation of the production of anti-NTPDase-2 antibodies, by means of DOT ELISA. The fusion of the B cells from the immunized mice, with the myeloma cells (Sp20), was performed in order to obtain the hybridoma.

Then, hybridoma of *L.major* anti-E-NTPDase-2 were isolated making its usage possible in several future applications such as the diagnosis and treatment of canine leishmaniasis.

1. INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias com amplo espectro de sintomas clínicos, dividida basicamente em duas formas clínicas: visceral (kalazar), tegumentar. Estas enfermidades são causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Atualmente, conhece-se 20 espécies de protozoários patogênicos pertencentes a este gênero. Estes parasitos são transmitidos pela picada de insetos vetores dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo). A forma visceral quando não tratada costuma ser fatal, já as formas cutâneas, apesar de raramente evoluírem para a fatalidade, são mutilantes (forma mucosa e muco-cutânea) e desagradáveis especialmente na ocorrência de múltiplas lesões (formas cutânea-difusa e cutânea).

Estas enfermidades apresentam um quadro de endemismo em 88 países com 350 milhões de pessoas expostas a infecção que acomete 12 milhões delas. Até o momento mais de 30 diferentes espécies de *Leishmania* já foram identificadas. Diferentes espécies variam em termos de distribuição regional, bem como a seu tropismo por diferentes órgãos humanos.

A crescente expansão da Leishmaniose no mundo se deve ao aumento de fatores como: desmatamentos, urbanização descontrolada e hospedeiros humanos susceptíveis a infecção como indivíduos imunossuprimidos. No intuito de encontrar uma solução para esse problema de saúde pública, um dos pontos a serem analisados é o controle dos reservatórios dos parasitos, sendo o cão o principal hospedeiro de relevância epidemiológica, visto o intenso parasitismo cutâneo observado nestes animais de acordo com Deane e colaboradores (1954) e o grande contato estabelecido com as pessoas devido a sua presença doméstica. Desta maneira, o cão participa ativamente do processo de manutenção da Leishmaniose .

Nosso grupo de pesquisa, junto ao grupo do Dr. Luís Carlos Crocco Afonso (UFOP), estudando a infecção experimental de camundongos (C57BL6), verificou que os animais eram capazes de controlar a infecção por *L.*

(*V.*) *braziliensis*, mas não por *L. (L.) amazonensis*. A diferença de resposta a infecção foi relacionada a um estado anérgico observado nos animais infectados por *L. (L.) amazonensis* derivado possivelmente da capacidade maior de hidrólise dos nucleotídeos extracelulares. Esta sugestão é baseada no conhecido efeito do ATP extracelular como molécula pró-inflamatória e de seu metabólito, a adenosina, como imuno-supressora (Maioli, Takane *et al.*, 2004). Esses trabalhos mostram a importância das E-NTPDases na infecção por diferentes espécies de *Leishmania*, sendo estas proteínas hoje consideradas como moléculas de virulência e bons alvos para o desenho racional de drogas.

A E-NTPDase-2 é uma proteína de 45 KDa, predita como possivelmente ecto-localizada, o que a torna facilmente disponível para o reconhecimento pelo sistema imune ou por drogas direcionadas. Logo, as E-NTPDases se apresentam como bons alvos para o desenvolvimento de novas abordagens para a imunoprevenção e imunoterapia, diagnóstico das Leishmanioses e também como potenciais candidatos vacinais. Desde a descrição por Kohler & Milstein (1975) da metodologia para a produção de anticorpos monoclonais, várias aplicações para esses anticorpos têm sido descritas, incluindo a purificação e/ou detecção de antígenos específicos. Os anticorpos monoclonais oriundos do sobrenadante de hibridomas selecionados reconhecem determinantes antigênicos únicos, podem ser utilizados para uma especificidade desejada, produzidos em grandes quantidades com boa qualidade e podem ser usados no desenvolvimento de testes diagnósticos específicos, mais rápidos e fáceis.

A fim de obter-se ferramentas de análise específicas das E-NTPDases de *Leishmania* e da E-NTPDase-2 de *Leishmania major*, este trabalho teve como objetivo a produção de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais anti-E-NTPDase-2, que possam futuramente serem testados para os mais diferentes fins.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1-Leishmanioses

Constituem importante problema de saúde pública, sendo as Leishmanioses endêmica em diversos países do mundo. São doenças parasitárias causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* (Bryceson, 1996). A infecção se estabelece nas células do sistema fagocítico mononuclear e são conhecidas as formas clínicas tegumentares e visceral (Pearson, 1993). A Leishmaniose Tegumentar pode manifestar-se por lesão cutânea-mucosa ou cutânea única, múltipla ou disseminada, de acordo com a espécie do parasito e resposta imune do hospedeiro (Pearson, 1993). A Leishmaniose Visceral caracteriza-se pela proliferação de parasitos principalmente no baço, fígado e medula óssea, mas pode determinar lesões em praticamente todos os órgãos (Duarte, 2000).

As Leishmanioses são endêmicas em 88 países, acometendo 12 milhões de pessoas, sendo que 350 milhões estão expostas à infecção. Brasil, Bangladesh, Índia, e Sudão são responsáveis por 90% dos casos notificados de Leishmaniose Visceral. Brasil, Bolívia e Peru respondem por 90% dos casos de Leishmaniose Muco-Cutânea ao passo que o Afeganistão, Arábia Saudita, Brasil, Irã, Peru, e Síria (Novo Mundo) são responsáveis por 90% dos casos de Leishmaniose Cutânea. As infecções humanas são também encontradas em 16 países da Europa (Velho Mundo), e apresentam um aumento na incidência de cerca de dois milhões de novos casos ao redor do mundo (World Health Organization, 2008).

Mais de 30 diferentes espécies de *Leishmania* já foram identificadas. As diferentes espécies variam em termos de distribuição regional, bem como a sua especificidade por vários órgãos humanos. Abaixo podemos observar na tabela 1 algumas das principais espécies de *Leishmania*, as formas clínicas associadas e as regiões de suas prevalências no mundo (Neuber, 2008).

Tabela 1: Correlação entre as formas clínicas da doença, espécie do patógeno e região de prevalência do globo. Os dados foram obtidos da revisão de Neubar (2008).

Formas da Doença	Patógeno	Região do Globo
Leishmaniose Visceral ou Kala-azar	<i>L. (L). donovani</i>	China, Índia, Irã, Sudão, Quênia, Etiópia
	<i>L. (L). infantum</i>	Países mediterrâneos
	<i>L. (L). infantum. chagasi</i>	Brasil, Colômbia, Venezuela, Argentina
Leishmaniose Cutânea e cutânea disseminada	<i>L. tropica</i>	Países mediterrâneos e Afeganistão
	<i>L. (L). major</i>	Oriente Médio, Europa Ocidental, Norte de África e Quênia
	<i>L. aethiopica</i>	Etiópia
	<i>L. mexicana</i>	América central e Amazônia
	<i>L. amazonensis</i>	Amazônia
Leishmaniose Muco-cutânea e mucosa	<i>Complexo de L. (V) braziliensis</i>	Brasil, Peru, Equador, Colômbia, Venezuela

A devastação das florestas, com a derrubada de árvores para os mais diferentes fins, representa um grande problema para o Brasil no tocante ao aumento do contato da população com reservatórios e vetores de *Leishmania* (Costa, 2005). Só no ano de 2007 foram notificados 69.867 casos de Leishmaniose cutânea nas regiões Norte e Nordeste. Em grandes metrópoles, como Belo Horizonte, Recife e Rio de Janeiro, vêm sendo relatados surtos epidêmicos de Leishmaniose (Dantas-Torres e Brandao-Filho, 2006; Costa, 2008).

2.2-Biologia do Parasito

A posição do cinetoplastídeo, do núcleo, bem como o diâmetro celular são fatores que auxiliam na diferenciação das formas morfológicas das espécies de *Leishmania*. Estas ainda distinguem-se por características sorológicas como a especificidade por um determinado anticorpo monoclonal, características bioquímicas e moleculares como a densidade de flutuação do DNA nuclear (Grimaldi e Tesh, 1993). Atualmente as espécies de *Leishmania*

que infectam o homem são classificadas em complexos agrupados em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania* (Herwaldt, 1999). O subgênero *Viannia*, inclui espécies em que os promastigotas se desenvolvem na porção posterior do intestino do inseto vetor, com migração para a porção anterior. No subgênero *Leishmania*, os promastigotas multiplicam-se na porção anterior e média do trato digestivo do inseto vetor (Molyneux, 1987). No Brasil existem 7 espécies que são responsáveis pela Leishmaniose Cutânea, sendo 6 do subgênero *Viannia* e 1 do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L.(V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* e mais recentemente as espécies *L.(V.) lainsoni*, *L.(V.) naiffi*, *L.(V.) lindenberg* e *L.(V.) shawi* foram identificadas nas regiões Norte e Nordeste (Murray, Berman *et al.*, 2005). A espécie *L.(L.) major*, endêmica no Velho Mundo, é considerada um problema de saúde pública em países da Europa Ocidental, bem como o Norte da África, Oriente Médio e no Quênia. Esta espécie apresenta um genoma de 32.8 Mb, com um cariótipo de 36 cromossomos e com uma porcentagem de G+C igual 63%, de acordo com dados do instituto Sanger.

Os parasitos residem no flebotomíneo em sua forma flagelar promastigota e em mamíferos, apresentando-se intracelularmente na forma não flagelar, chamada de forma multiplicativa, amastigota. Os macrófagos infectados são ingeridos pelo flebotomíneo fêmea durante alimentação de sangue e lisados no intestino do mosquito onde são liberados os parasitos que se transformam na forma não infectiva promastigota. Após a maturação ocorre a colonização da porção superior do intestino e simultânea transformação do parasito para a forma promastigota metacíclica que pode infectar mamífero. O promastigota metacíclico de *Leishmania* entra no organismo do hospedeiro através da inoculação pela picada do flebotomíneo. Estes são então fagocitados por monócitos que por quimiotaxia, são atraídos para a região da picada devido a uma reação inflamatória. Leishmanioses Cutâneas são também relatadas após contato direto com úlceras infectadas e pele danificada de hospedeiros infectados (Neuber, 2008). A figura 1 descreve esquematicamente o ciclo de infecções relatado acima.

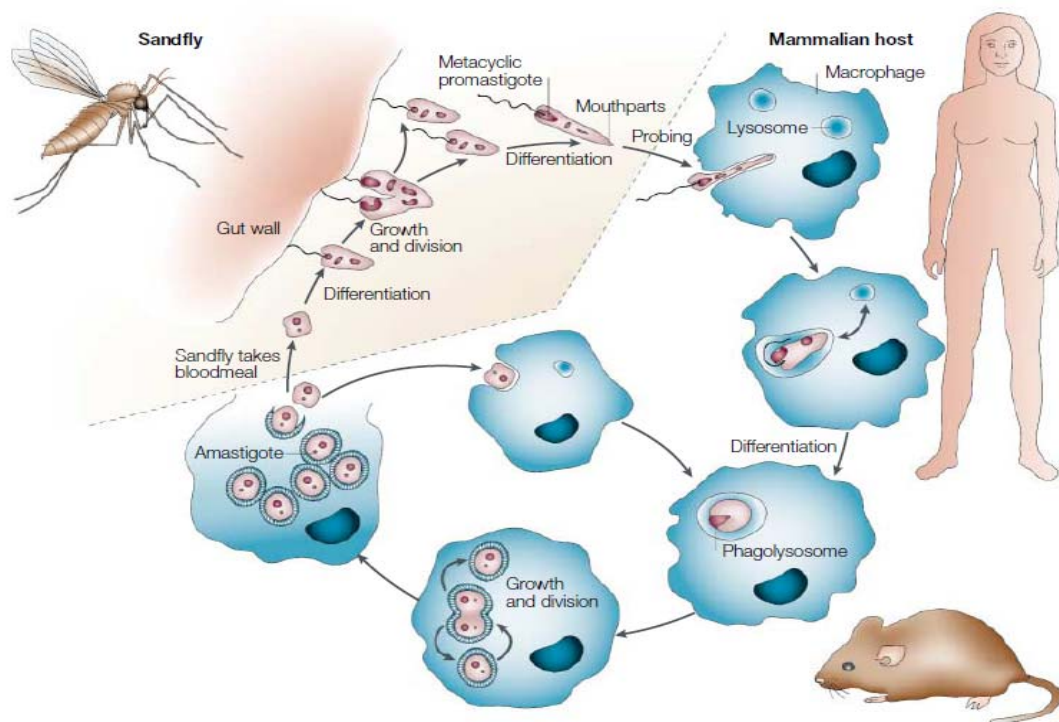


Figura 1: Ciclo de vida do parasito *Leishmania*: Figura retirada da revisao feita por Sack e Noben- Trauth, 2002.

Os flebotomíneos são dípteros hematófagos da família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae*. Este invertebrado hospedeiro é muito pequeno e, por isso, difícil de ser observado. Apresenta cor palha ou castanho-claro e não fazem barulho quando voam. É conhecido popularmente como mosquito palha, birigui, tatuquira, cagalha e asa dura de acordo com a região geográfica (Rey, 2002; Bhattacharya, Sur *et al.*, 2006).

Na América do Sul, a *L. infantum* e *L. braziliensis* são transmitidas por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*. Diversas espécies têm sido relatadas como vetores, incluindo *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia wellcomei* e *Lutzomyia complexa* (Lainson, 2005). O principal vetor de *L. infantum* é *Lutzomyia longipalpis* (Lainson e Rangel, 2005). No entanto, outras espécies de flebotomíneos têm sido consideradas como prováveis vetores, por exemplo, *Lutzomyia cortelezzii*, *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia forattinii*,

(Carvalho, Andrade Filho *et al.*, 2008; De Pita-Pereira, Cardoso *et al.*, 2008), especialmente em áreas onde o vetor principal nunca foi recolhido.

No caso da Leishmaniose Visceral canina diagnosticada em alguns municípios de Pernambuco (Recife e São Vicente Férrer), o *Lutzomyia longipalpis* não tem sido observado (De Carvalho, Lima *et al.*, 2007). Curiosamente, em algumas destas áreas, os carrapatos marrom do cão (*Rhipicephalus sanguineus*) foram encontradas levando formas flageladas de *Leishmania* (Silva, Silva *et al.*, 2007) e por este motivo foram suspeitos de estarem envolvidos na transmissão.

Os reservatórios do parasito incluem humanos, cães, lobos, raposas e roedores. Répteis e anfíbios são menos propícios a apresentarem esta função. Em hospedeiros humanos, o parasito multiplica se por fissão binária. É impossível diferenciar indivíduos de espécies diferentes por técnicas de microscopia óptica (Harms, 2003).

Em geral, a resposta imune celular nas Leishmanioses é considerada mais relevante para os eventos de resistência. Tanto na Leishmaniose Cutânea quanto na Visceral, diferenças marcantes nas populações de leucócitos e citocinas são observadas, a exceção da infecção por *L. major*. Na Leishmaniose Cutânea por *L. amazonensis*, os linfócitos T CD4+ são responsáveis pelo desenvolvimento da lesão (Terabe, Kuramochi *et al.*, 2000).

De acordo com o estágio e a espécie do parasito, a *Leishmania* pode modificar a defesa humoral inata do hospedeiro, remodelando o compartimento intracelular e as vias de sinalização, prejudicando mecanismos relacionados a macrófagos e células dendríticas (Sacks e Sher, 2002; Engwerda, Ato *et al.*, 2004; McMahon-Pratt e Alexander, 2004).

A infecção manipula quinases intracelulares e fosfatases, inibindo algumas vias de sinalização e ativando outras e assim afetando fatores de transcrição e a expressão gênica (Buates e Matlashewski, 2001; Sacks e Sher, 2002; Bertholet, Dickensheets *et al.*, 2003; Engwerda, Ato *et al.*, 2004; McMahon-Pratt e Alexander, 2004). Por sua vez a capacidade de resposta dos macrófagos à secreção de citocinas e expressão de moléculas de superfície,

com geração de mecanismos leishmanicidas (espécie reativas de oxigênio e intermediários de nitrogênio) são comprometidos (Ray, Gam *et al.*, 2000; De Souza, Esteves Pereira *et al.*, 2001; Bertholet, Dickensheets *et al.*, 2003; Engwerda, Ato *et al.*, 2004). O parasito afeta também as células dendríticas que são essenciais para a apresentação de antígenos, co-estimulação de células T, e eficiência da aquisição da resposta Th1 (Sacks e Noben-Trauth, 2002; Brandonisio, Spinelli *et al.*, 2004). Os efeitos sobre as células dendríticas são: inibição da migração, maturação e ativação, e produção de interleucina 12 (Sacks e Sher, 2002; Brandonisio, Spinelli *et al.*, 2004).

Lipofosfoliglicanos que interferem na função de macrófagos, células dendríticas, e metaloproteases de superfície da membrana como a gp63 representam dois fatores de virulência de promastigotas. A gp63 protege contra a lise mediada pelo complemento e permite a entrada do parasito no macrófago (Joshi, Kelly *et al.*, 2002). Homólogos do receptor de quinase C ativados podem induzir a supressão da resposta celular (Th2), CD4+ o que é essencial para o estabelecimento da infecção experimental de *Leishmania major* (Kelly, Stetson *et al.*, 2003).

2.3-Apresentação Clínica

2.3.1-Leishmaniose cutânea

A Leishmaniose cutânea inicia-se com uma área de vermelhidão em torno da região da picada que aumenta de tamanho. Após 3-4 semanas pode-se observar a lesão tipicamente incolor com úlcera plana e margens elevadas “lesão tipo vulcão”, como demonstrando na figura 2A. As lesões, em seu estágio inicial, são clinicamente indistinguíveis de uma reação comum a picada de inseto. As úlceras são encontradas em áreas da pele que normalmente são descobertas, tais como mãos, face, ou interior das pernas. Se não tratada, a cura para a Leishmaniose cutânea do Velho Mundo é observada em cerca de 6-12 semanas, com cicatrizes e deformações. Já nos casos situados no Novo

Mundo as Leishmanioses tendem a ser mais graves e a cura espontânea mais rara (Fischer, 2010). As lesões cutâneas observadas nas Leishmanioses no Novo Mundo podem variar amplamente de lesões pequenas e secas a grandes úlceras. A doença severa pode desenvolver nódulos queratócitos que comumente são confundidos com neoplasia (Neuber, 2008). Características clínicas como a resistência a medicamentos, tamanho e número de lesões e tempo de evolução da doença auxiliam no diagnóstico da Leishmaniose Cutânea.

2.3.2-Leishmaniose Mucocutânea

Infecções com *Leishmania braziliensis* podem acarretar em “metastase” em regiões de mucosa, como pode ser visto na figura 2B. Após o intervalo assintomático de meses ou anos a infecção pode provocar erosões e úlceras na região da nasofaringe. A razão pelo particular tropismo ainda é desconhecida (Neuber, 2008).

2.3.3-Leishmaniose Visceral

Dependendo do estado imunológico do hospedeiro e do tropismo do patógeno, pode ocorrer a Leishmaniose Visceral. Esta é a forma mais perigosa da doença, afetando os gânglios linfáticos, baço, fígado e medula óssea. O início da doença é atípico e o diagnóstico diferencial com Leishmaniose Cutânea é possível. A doença segue um curso insidioso e crônico. Quando os pacientes acreditam estar saudáveis devido a um período de tempo relativamente longo sem manifestações, a incidência aguda da doença pode ser fulminante. A morte é devido a hemorragia, complicações relacionadas à anemia ou ao sistema imunitário enfraquecido (Neuber, 2008). A figura 2C mostra um menino com o abdomen característico desta doença.

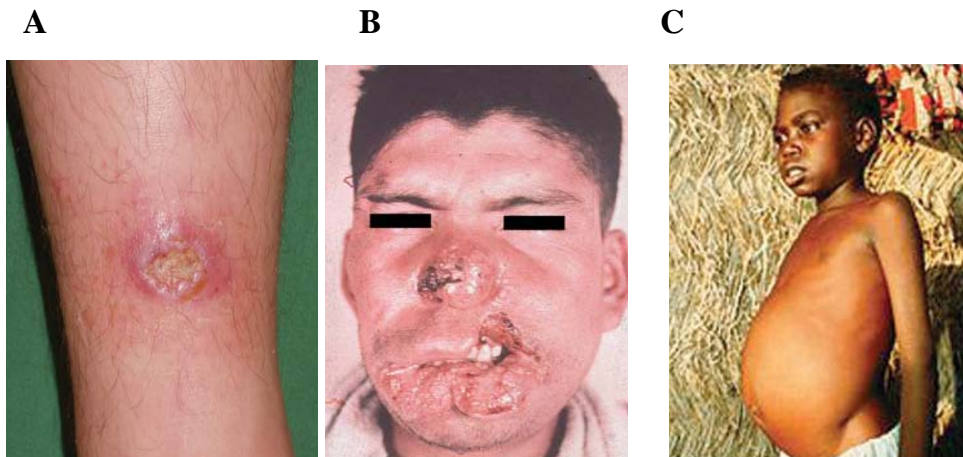


Figura 2: Fotos de pacientes com Leishmaniose: **A** - Paciente com Leishmaniose Cutânea, apresentando lesão típica; **B**–Paciente com Leishmaniose Mucocutânea apresentando metástase (Fotografia publicada com permissão do paciente); **C** – Paciente com Leishmaniose Visceral. Retirada da revisão feita por Neuber, 2008.

2.4-Papel dos cães na dinâmica da Leishmaniose

Em cães e canídeos silvestres, os parasitos são encontrados na epiderme dos animais e o controle epidemiológico atualmente envolve: eliminação dos cães soropositivos infectados, aplicação de inseticidas domésticos e peri-domésticos para o tratamento das habitações e tratamento em humanos (Tesh, 1995). Diferente dos cães e canídeos selvagens, o homem não é um hospedeiro típico para *Leishmania*, portanto, o tratamento se dá com quimioterapia e está mais relacionado à cura e sobrevivência dos pacientes, o que diminui a incidência em humanos, mas não interrompe a transmissão da doença (Tesh, 1995).

A eutanásia de cães soropositivos é amplamente praticada no Brasil e na China, como uma ferramenta de controle epidemiológico, mas é inaceitável na Europa. Programas de vigilância canina são muito trabalhosos, caros e exigem vigilância contínua (Tesh, 1995), assim como métodos de diagnóstico sorológico sensíveis e específicos, para serem eficazes (Courtenay, Quinnell *et al.*, 2002). Outro problema está relacionado com o alto número de cães infectados que se apresentam assintomáticos (Alvar, Molina *et al.*, 1994).

Além dos aspectos de proteção animal, existe um longo período de tempo entre o diagnóstico e eliminação dos cães que se apresentam como reservatório. A substituição de cães pelo proprietário e o papel de outros reservatórios fomentam a controvérsia entre os pesquisadores quanto à eliminação dos cães que se apresentam positivos, para a efetiva redução da incidência de Leishmaniose Visceral em humanos (Andrade, Queiroz *et al.*, 2007; Costa, Tapety *et al.*, 2007).

De acordo com Nunes e colaboradores (2010), a eutanásia do reservatório canino, associada a outras medidas de controle, está relacionada com a diminuição da incidência de Leishmaniose em homens, entretanto, a adoção de medidas preventivas para os cães tem a vantagem de evitar o incentivo a eutanásia dos cães.

Junto aos tratamentos que visam à eliminação do vetor, as vacinas destinadas a humanos e a cães contra a Leishmaniose são consideradas o melhor instrumento para a erradicação da doença, diminuindo o número de casos humanos e caninos (Dye, 1996). Embora existam muitas vacinas caninas testadas em ensaios de canil, algumas delas demonstrando eficácia em testes de campo contra o desafio natural, apenas a Leishmune[®] é licenciada (Palatnik-De-Sousa, Silva-Antunes *et al.*, 2009).

2.5-Tratamento com drogas

Vários são os fatores que influenciam na cura da Leishmaniose: o sistema imune do hospedeiro, cepa adquirida, forma clínica da doença e a droga utilizada no tratamento. Em todas as áreas endêmicas se observam casos que não respondem ao tratamento, como o uso de antimônios em paciente infectados com o isolado *L.(L) donovani* na Índia (Thakur, Narayan *et al.*, 2004).

Quando se trata de Leishmaniose, inicialmente pensa-se na utilização dos antimoniais pentavalentes (Sbv), que são utilizados a cerca de 80 anos e

podem apresentar efeitos colaterais graves, tais como hepatotoxicidade e arritmia cardíaca. Sendo no Velho Mundo o estiboglucanato de sódio (SAG) utilizado, e nas Américas o antimoniato de meglumina (Glucantime®) (Rey, 2002; Singh e Sivakumar, 2004). O mecanismo de ação dos antimoniais ainda não é completamente conhecido. Atuando como uma pró-droga, é necessário a sua conversão de antimônio pentavalente para a forma trivalente, ativa contra os parasitos (Croft e Coombs, 2003; Croft, Seifert *et al.*, 2006). Acredita-se que ele atue na diminuição dos níveis de adenosina trifosfato intracelular pela interferência na glicólise e também atue na oxidação de ácidos graxos (Croft e Coombs, 2003).

O índice de cura da Leishmaniose Visceral a partir da administração de antimônios no Brasil é considerado alto. Um estudo realizado na capital do Piauí, Teresina, revelou que apenas 5% dos pacientes não responderam ao tratamento e necessitaram da administração de drogas de segunda escolha (Santos, Marques *et al.*, 2002; Werneck, Batista *et al.*, 2003).

Outra importante droga administrada para o tratamento da Leishmaniose é a anfotericina B, um antifúngico que interage com a membrana plasmática substituindo as moléculas de esteróis, especialmente em membranas com alto conteúdo de ergosteróis (Baginski, Sternal *et al.*, 2005). Devido a isto ocorre um aumento da permeabilidade da membrana e conseqüente morte celular (Croft e Coombs, 2003).

Devido à resistência a drogas, toxicidade dos quimioterápicos, aumento da incidência da doença em indivíduos imunodeprimidos juntamente com a dificuldade do controle epidemiológico da doença embasado no sacrifício dos cães soropositivos, é de extrema necessidade a utilização de vacinas profiláticas (Palatnik-De-Sousa, 2008).

2.6-Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial da Leishmaniose pode ser parasitológico ou através de testes imunológicos. Os métodos parasitológicos consistem na pesquisa do parasito na lesão, podendo ser realizados pela observação direta do parasito ou por cultura do material da lesão. Esses métodos têm baixa sensibilidade e apresentam vários problemas, tais como a demora na obtenção dos resultados, a possibilidade de contaminação da cultura e a dificuldade para o crescimento do parasito. Por outro lado apresenta alta especificidade, com a vantagem de possibilitar a identificação entre espécies do parasito (Gontijo e De Carvalho Mde, 2003).

O teste de imunoflorescência indireta (IFAT) é recomendado para a confirmação diagnóstica da Leishmaniose canina, apresentando valores de sensibilidade e de especificidade que variam de 90 a 100% e 80 a 100%, respectivamente (Alves e Bevilacqua, 2004). Este teste é rápido, barato e viável. Entretanto esta técnica apresenta como limitação a possibilidade de resultado falso negativo em cães assintomáticos (Almeida, Jesus *et al.*, 2005), assim como reação cruzada com outros parasitos e com outras espécies de *Leishmania* (Schulz, Mellenthin *et al.*, 2003; Ferreira Ede, De Lana *et al.*, 2007). A técnica de IFAT é considerada inequívoca para soros com títulos menores que 1:40 quando se trata do soro negativo e título maior ou igual a 1:160 em caso de soro positivo, mas é ambígua para títulos de 1:80 e 1:40 avaliados, gerando resultados duvidosos (Ferroglio, 2002).

De acordo com alguns autores, a técnica de *Western Blot* é mais sensível que o IFAT e muitos sugerem sua utilização no diagnóstico de Leishmaniose canina (Fernandez-Perez, Mendez *et al.*, 1999). Infelizmente o *Western Blot* requer técnicos treinados e se limita a laboratórios de pesquisa, por isso não podem ser sugeridos para a rotina do diagnóstico (Ferroglio, Centaro *et al.*, 2007).

Considerando as limitações convencionais dos métodos, testes diagnósticos alternativos são necessários para Leishmaniose canina. Neste

contexto, a reação de polimerase em cadeia (PCR) tem se mostrado uma técnica rápida e sensível para a detecção de parasitas (Leontides, Saridomichelakis *et al.*, 2002; Cortes, Rolao *et al.*, 2004). O diagnóstico por PCR não depende do estado imunológico do cão e pode ser usado em casos de reações inconclusivas, anergia ou reações cruzadas em testes sorológicos, além de sua alta sensibilidade e especificidade (Ashford, Bozza *et al.*, 1995; Lachaud, Marchergui-Hammami *et al.*, 2002).

Apesar dos avanços em métodos moleculares voltados para o diagnóstico da *Leishmaniose*, os pacientes em geral são diagnosticados e tratados em ambientes rurais, já os diagnósticos moleculares dependem de laboratórios de referência localizados remotamente a estas áreas. Precauções devem ser tomadas durante a coleta de amostra, preservação e transporte para laboratórios. Tentativas incluem o uso de tampões para o transporte em temperatura ambiente (Castilho, Shaw *et al.*, 2003) e biópsia impressa em papel de filtro (Marques, Volpini *et al.*, 2001).

A baixa especificidade dos antígenos não purificados é uma desvantagem comum nos métodos diagnósticos, causada pela reatividade cruzada e persistência de anticorpos após a cura. Para tentar contornar esse problema, alguns antígenos purificados sintéticos ou recombinantes têm sido identificados. Entre eles estão as E-NTPDases.

A imunocromatografia aparece como uma alternativa aos métodos tradicionais, pois fundamenta-se na reação antígeno-anticorpo em uma única fase sólida, sendo esta mantida e utilizada a temperatura ambiente pelo agente de saúde. Além de possuir sensibilidade e especificidade elevadas, a imunocromatografia possui baixo custo, pois não exige equipamento ou treinamento específico para realizar o teste ou interpretar o resultado. Isto significa que tal tecnologia possibilita o diagnóstico de pacientes pelos próprios agentes de saúde, dispensando a coleta e o envio de material biológico para centros de saúde especializados ou para laboratórios de análises clínicas (<http://www.universia.com.br/materia/materia.jsp?id=12950>).

Embora o uso de anticorpos monoclonais seja restrito a laboratórios de pesquisa, um número considerável de anticorpos contra antígenos do gênero ou espécie-específico são disponíveis (Anthony, Grogl *et al.*, 1987). Eles podem ser usados na identificação de formas amastigotas em esfregaços ou amostras de biópsia, identificação de promastigotas em cultura e serem aplicados nos mais diferentes passos do desenvolvimento de *kits* e vacinas relacionados à Leishmaniose. Esta técnica é muito mais sensível e específica que as técnicas rotineiramente utilizadas (Salman, Rubeiz *et al.*, 1999).

Os anticorpos monoclonais (MAbs) e a eletroforese de enzimas são amplamente utilizados para identificação e classificação dos parasitas *Leishmania* do Novo Mundo (Cupolillo, Grimaldi *et al.*, 1994; Grimaldi e McMahon-Pratt, 1996): a eletroforese de enzimas, como padrão-ouro para identificação em nível de espécie, e os MAbs com maior capacidade discriminante para identificar populações de parasitas que pertencem à mesma espécie (Cupolillo, Grimaldi Junior *et al.*, 1993).

Muitos *kits* comerciais para detecção rápida de anticorpos anti-*Leishmania* foram e estão sendo desenvolvidos nas últimas décadas para o diagnóstico em seres humanos, porém, quando estes testes são usados em cães, a sua sensibilidade e especificidade parece ser menor em relação aos exames laboratoriais (Reithinger, Quinnell *et al.*, 2002; Mohebbali, Taran *et al.*, 2004). Um teste de diagnóstico rápido sensível e específico seria útil como parte do protocolo para o diagnóstico na clínica, sendo também extremamente valioso nas pesquisas de rastreamento em massa e campanhas de intervenção em áreas endêmicas. Para controlar a infecção é de suma importância uma resposta rápida dos testes clínicos na identificação dos cães assintomáticos que podem ser tão infectantes para os vetores como os sintomáticos (Alvar, Molina *et al.*, 1994). A detecção rápida e de baixo custo de cães infectados permitiria uma rápida implementação do controle de medidas e pode reduzir muito o risco da transmissão da doença (Ferroglia, Centaro *et al.*, 2007).

2.7-Vacinação

A primeira vacina contra a Leishmaniose foi desenvolvida por Adler, professor da Universidade Hebraica de Jerusalém, Israel, utilizando a antiga prática de inocular indivíduos não infectados com material infeccioso de lesões em regiões do corpo onde a cicatriz seria oculta. Esta prática já era desenvolvida pelas mães do Líbano, que expunham seus filhos quando novos à picada de flebotomíneos, pois intuitivamente sabiam que seus filhos seriam protegidos de uma doença mais grave no futuro (Gavron D, 1997).

Um método de cultura axênica do parasito foi estabelecido, tornando-se usual em Israel e na Rússia a prática da “Leishmunização” o que evoluiu para o uso da primeira geração de vacinas, compostas por um conjunto de parasitas mortos ou extratos destes. O processo “Leishmunização” foi interrompido devido ao não controle das lesões de longa duração na pele, a propagação do HIV, o uso de drogas imunossupressoras e a dificuldades no controle da qualidade do inóculo. Seu uso no momento é limitado a uma vacina registrada no Uzbequistão e no desafio de desenvolver uma vacina com eficácia em seres humanos no Irã (Khamesipour, Rafati *et al.*, 2006).

Gradualmente a “Leishmunização” foi substituída por vacinas de segunda geração, que têm sido desenvolvidas com base em bactérias ou vírus recombinantes portando genes referentes a antígeno de *Leishmania*, subunidades sintéticas ou recombinantes (Yang, Fairweather *et al.*, 1990; Gurunathan, Sacks *et al.*, 1997) e frações purificadas dos parasitos nativos (Palatnik, Borojevic *et al.*, 1989; Jardim, Tolson *et al.*, 1991). Muitas vacinas de segunda geração, tais como, proteínas recombinantes, poliproteínas, vacinas de DNA ou peptídeos de leishmania expostos por células dendríticas, tem sido testados. Como no caso da glicoproteína gp63, gp46 e PSA-2, presente em todas espécies de *Leishmania*, exeto em *L. brasiliensis*.

O uso de vacinas de terceira geração inclui genes que codificam para antígenos protetores e clones em vetores contendo promotores eucariotos, são

as mais recentes abordagens (Xu e Liew, 1994; Aguilar-Be, Da Silva Zardo *et al.*, 2005).

A previsão é que as vacinas para a Leishmaniose apresentem-se nos próximos 25 anos principalmente como as de segunda geração, composto de complexo de antígenos nativos e adjuvantes bem desenvolvidos (Palatnik-De-Sousa, 2008).

2.8-E-NTPDases

Os nucleotídeos podem ser sintetizados pela via de biossíntese de novo, e serem reciclados pela via de salvação, uma rota de reutilização, na qual a célula satisfaz suas necessidades purínicas a partir de fontes endógenas e/ou exógenas de purinas pré-formadas. Esses nucleotídeos são de vital importância para todos os organismos vivos, sendo necessários em altos níveis para eventos como a replicação. O parasito *Leishmania*, assim como a grande parte dos parasitos, não realiza a biossíntese de novo, e dependem da via de salvação para suprir seus requerimentos purínicos (El Kouni, 2003).

As apirases são proteínas do tipo E-NTPDases e descritas como proteínas de membrana ecto-localizadas ou produzidas de forma solúvel (excretada), que têm como principal função a degradação de nucleotídeos, especialmente extracelulares, di e/ou trifosfatados (Zimmermann, 2000). Desde a primeira descrição das apirases em endoparasitos sanguíneos, *T. gondii* (Asai, Miura *et al.*, 1995), estas enzimas tem sido estudadas e associada à via de salvação de purinas e a importantes relações parasito-hospedeiro.

Entre as enzimas envolvidas no metabolismo de ecto-nucleotídeos, as E-NTPDases são provavelmente as mais estudadas. A presença destas enzimas tem sido descrita em diferentes parasitas, incluindo *Toxoplasma gondii* (Asai, Miura *et al.*, 1995), o *Trypanosoma cruzi* (Bisaggio, Peres-Sampaio *et al.*, 2003; Fietto, Demarco *et al.*, 2004), *Tritrichomonas foetus* (De Jesus, De Sa Pinheiro

et al., 2002), *Entamoeba histolytica* (Barros, De Menezes *et al.*, 2000), e *Leishmania tropica* (Meyer-Fernandes, Dutra *et al.*, 1997).

O estudo do papel dos nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares como moléculas imunomoduladoras tem sido o foco de vários laboratórios ao longo da última década. O aumento das concentrações de ATP extracelular pode ser interpretado como sinal de "perigo" desencadeando uma resposta inflamatória. Por outro lado, a produção de adenosina é geralmente associada com a diminuição da inflamação (Coutinho-Silva, Monteiro Da Cruz *et al.*, 2007; Di Virgilio, 2007).

As enzimas ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDase) e 5'-nucleotidase sequencialmente hidrolisam ATP extracelular e ADP a AMP e AMP a adenosina, respectivamente (Robson, Sevigny *et al.*, 2006). Muitas evidências demonstram os efeitos pró-inflamatórios do ATP extracelular e consideram a adenosina como uma molécula com efeitos anti-inflamatórios, simulando esta cascata enzimática os parasitos poderiam suprimir a resposta imune do hospedeiro (Sansom, Robson *et al.*, 2008). Isto apoia a ideia de que as enzimas envolvidas no metabolismo extracelular de nucleotídeos também podem atuar como fatores de virulência de parasitos.

O ATP extracelular está envolvido em efeitos citostáticos e citotóxicos em vários tumores, além de ser necessário para a secreção de algumas citocinas (Langston, Ke *et al.*, 2003). O ADP extracelular estimula a agregação plaquetária, mas não mostra efeito sobre os linfócitos (Di Virgilio, 2005). Sabe-se que a adenosina e seu produto de degradação, a inosina, são reguladores do processo inflamatório e possuem efeitos imunomodulatórios. A adenosina suprime a produção de citocinas inflamatórias como IL-1, IL-2 e TNF α pelos monócitos e macrófagos bem como eleva a produção de IL-10 (Di Virgilio, 2005).

Foi observado que o parasito *L. amazonensis* oriundo de cultivo axênico, diminui ao longo do tempo sua capacidade infectiva e apresenta redução na atividade de hidrólise dos nucleotídeos ATP e AMP. Quando se incorpora ao meio de cultivo adenosina, a atividade hidrolítica cai ainda mais e os parasitos

se tornavam menos infectivos para o modelo de infecção em camundongos. A mesma relação foi encontrada nos distintos clones do parasito, mostrando uma relação direta entre a infecção do parasito em modelo murínico e a atividade hidrolítica dos nucleotídeos (De Souza, De Assis *et al.*, 2010). Estes dados reforçam relatos anteriores (Maioli, Takane *et al.*, 2004; Marques-Da-Silva, De Oliveira *et al.*, 2008) e suplementam a hipótese de que as enzimas da matriz extracelular envolvidas no metabolismo de nucleotídeos são importantes fatores de virulência de *Leishmania* (Berredo-Pinho, Peres-Sampaio *et al.*, 2001; Pinheiro, Martins-Duarte *et al.*, 2006).

Em análise molecular *in silico* duas prováveis isoformas de NTPDases foram identificadas no genoma de *L. major*, chamando-se NTPDase e GDPase, com massas moleculares previstas de 47,2 e 73,4 kDa, respectivamente (Fietto, Demarco *et al.*, 2004), sendo a isoforma menor objeto de estudo neste trabalho. Aqui denominaremos esta proteína como NTPDase 2, pois a isoforma maior (GDPase) é similar a NTPDase-1 de *T. Cruzi*, devendo ser denominada também como NTPDase-1.

A atividade catalítica desta família de enzima está relacionada com domínios muito bem conservados evolutivamente, sendo chamados Regiões Conservadas de Apirase (ACRs) (Handa e Guidotti, 1996). Mutagênese sítio-dirigida em resíduos de aminoácidos das regiões conservadas I e IV resulta na perda da atividade nucleotídica dessas enzimas (Smith e Kirley, 1999).

De acordo com a topografia da membrana as E-NTPDases podem ser separadas em dois grupos. Os membros do primeiro grupo incluem representantes em humanos: E-NTPDase1(CD39), E-NTPDase-2 (CD39L1), E-NTPDase 3 (CD39L2), E-NTPDase4 (UDPase), todas apresentam dois domínios transmembranas, um localizado na porção N-terminal e o outro na extremidade C-terminal. O segundo grupo inclui a NTPDase5 e uma possível NTPDase6 que são ancoradas à membrana por apenas um domínio hidrofóbico localizado na extremidade N-terminal, seguido ou não por um sinal de clivagem, podendo resultar numa forma solúvel e/ou secretada. Essas enzimas, de modo geral, hidrolisam não somente ATP e ADP, mas tem em comum uma ampla

especificidade de substrato para nucleotídeos purínicos e pirimidínicos, diferindo, entretanto, na relação à preferência por determinado nucleotídeo 5'-trifosfato ou nucleotídeo 5'-difosfato, conforme resumido na Figura 3, que também mostra outras enzimas do tipo ecto-nucleotidases, porém não pertencentes à família E-NTPDase (Zimmermann, 2000).

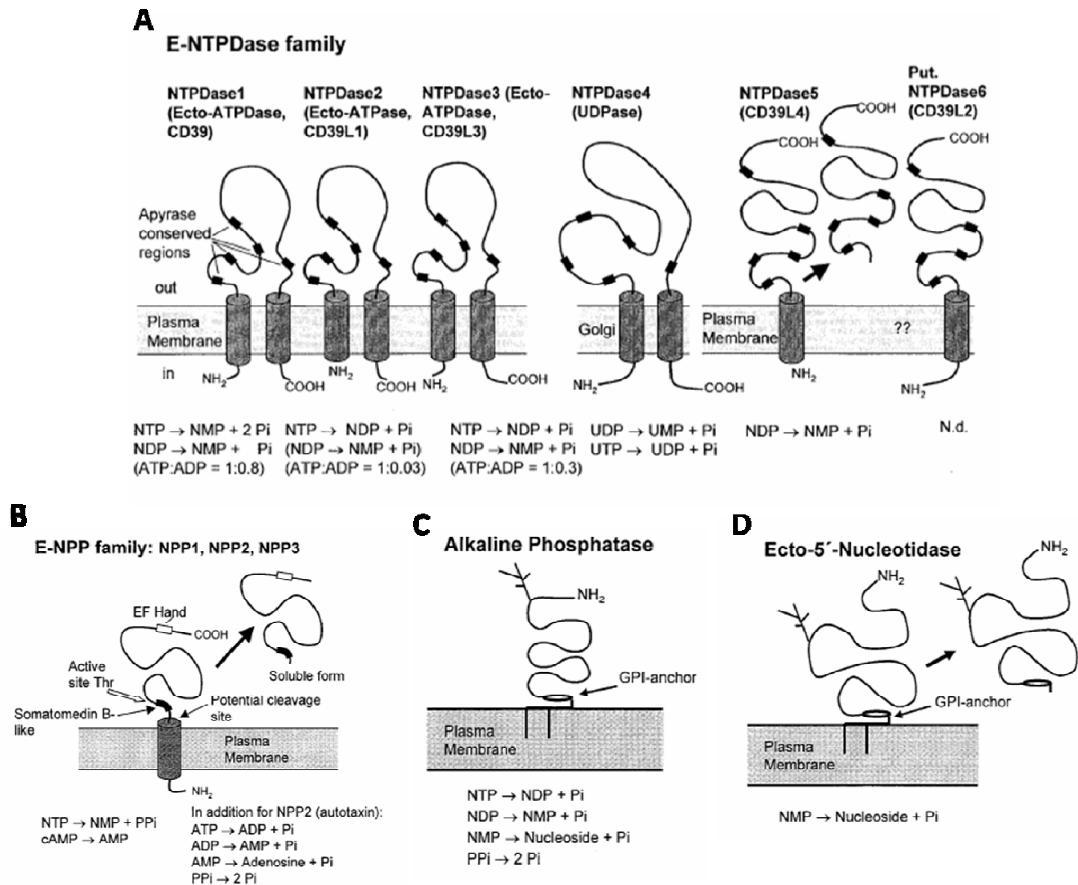


Figura 3: Topologia de membrana e propriedades catalíticas das diferentes famílias de ecto-nucleotidases. **(A)** Família E-NTPDase. As enzimas podem ocorrer como homodímeros. A NTPDase 5 pode ocorrer como uma proteína solúvel (seta). Uma possível NTPDase 6 solúvel, de estrutura primária conhecida está também representada. **(B)** Família E-NPP. As enzimas podem ocorrer como dímeros e podem se tornar solúveis através de clivagem proteolítica, indicados por setas. **(C)** Família das fosfatases alcalinas. **(D)** Família ecto-5'-nucleotidase de mamíferos. A enzima ocorre em dímeros e pode ser liberada da membrana por uma fosfolipase endógena GPI-específica (Zimmermann, 2000).

A sinalização purinérgica depende das interações entre nucleotídeos extracelulares com receptores ligados à membrana plasmática. Este tipo de sinalização, portanto, depende da liberação de nucleotídeos, metabolização pelas enzimas extracelularmente e presença de receptores que se ligam seletivamente os nucleotídeos, resultando na transdução do sinal para o interior da célula (Gounaris, 2002).

De acordo com a natureza da resposta imune durante o decorrer da inflamação a sinalização mediada por receptores pode sofrer alterações devido a uma expressão diferencial de receptores purinérgicos (Bours, Swennen *et al.*, 2006). Grande parte das células relacionadas ao sistema imune co-expressam ambos os subtipos de receptores P1 e P2, sugerindo uma dupla regulação da função celular pela sinalização purinérgica (Bours, Swennen *et al.*, 2006).

2.9-Anticorpos Monoclonais

Estudos relacionados à biologia celular e à genética ganharam grande impulso após o primeiro relato sobre a cultura de hibridomas oriundo da fusão espontânea de diferentes células somáticas ou tecidos (Barski, Sorieul *et al.*, 1960).

A injeção de óleo mineral na cavidade peritoneal de algumas linhagens de camundongos pode induzir a formação de mielomas, são as chamadas MOPC (plasmocitoma formado por óleo mineral), primeiramente induzidos em camundongos BALB/c (Potter, 1972). A linhagem Sp2/0-Ag14 é uma das linhagens oriundas de camundongos BALB/c mais utilizadas (Köhler, 1975).

Grande parte dos roedores pode ser utilizada para a produção de anticorpos monoclonais, entretanto a escolha pelo camundongo BALB/c se dá pela facilidade de manejo, compatibilidade com as células do mieloma e altos títulos de anticorpos produzidos por estes animais (Little, Kipriyanov *et al.*, 2000).

Com a primeira descrição feita Kohler & Milstein (1975) a respeito da metodologia para a produção de anticorpos monoclonais, várias formas de utilização destes anticorpos têm sido relatadas, incluindo a purificação e/ou detecção de antígenos específicos (Chaves, Soares *et al.*, 2003; Carson, Quinnell *et al.*, 2010; Tan, Hu *et al.*, 2010). Os anticorpos monoclonais oriundos do sobrenadante de cultura de hibridomas selecionados, reconhecem determinantes antigênicos únicos e podem ser selecionados para uma especificidade desejada, produzidos em grandes quantidades com boa qualidade e podem ser usados no desenvolvimento de testes diagnósticos específicos, mais rápidos e fáceis (Abbas A.K, 2005).

Os anticorpos monoclonais são oriundos de um hibridoma para reconhecimento de um determinado antígeno. Os hibridomas consistem em uma linhagem celular resultante da fusão de linfócitos B e células de mieloma (Abbas A.K, 2005). A figura 4 ilustra um esquema simplificado do processo de produção dos hibridomas produtores de anticorpos monoclonais.

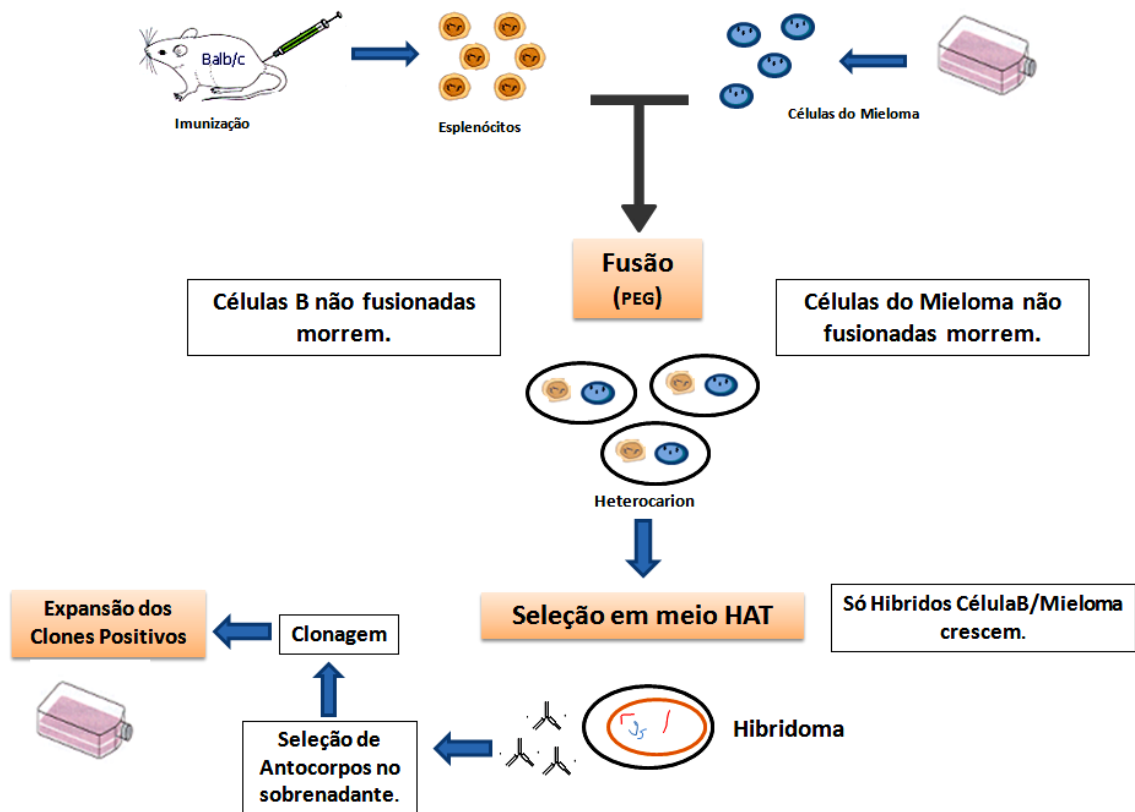


Figura 4: Desenho esquemático da técnica para a produção de hibridomas e clones secretores de anticorpos. Modificado da dissertação de Mestrado de Gómez, 2007 .

O polietilenoglicol atua como fusógeno no processo de produção de hibridoma. Essa substância proporciona condições particulares que permitem a fusão das membranas plasmáticas, o que culmina na formação de uma célula híbrida com dois núcleos. Em sequência, ocorre a fusão das membranas nucleares e formação de um heterocárie, permitindo desta maneira que o DNA durante o processo de mitose sofra segregação. Muitos cromossomos podem ser perdidos durante este evento devido ao maior número de cromossomos no compartimento celular. Essa perda pode gerar uma incapacidade do hibridoma em produzir imunoglobulinas ou rearranjos da fração variável das cadeias leve e pesada (Harlow, 1988b).

No caso dos anticorpos monoclonais que reconhecem a forma nativa da enzima NTPDase 3 em humanos, o grau de inibição pelos anticorpos

monoclonais não variam com a concentração de substrato, sugerindo que o mecanismo de inibição desses não ocorra devido ao impedimento estérico do sítio ativo, mas pode ser devido a restrição dos movimentos da enzima ou deformação do sítio ativo (Munkonda, Pelletier *et al.*, 2009).

Estudos recentes demonstram que os anticorpos monoclonais contra a NTPDases-II de *Toxoplasma gondii*, tem a capacidade de reduzir a replicação dos taquizoídeos, bem como a habilidade de inibir a atividade da enzima, indicando que o efeito antiproliferativo observado é devido a inibição da NTPDase (Nakaar, Samuel *et al.*, 1999; Tan, Hu *et al.*, 2010). Os estudos realizados por Tan e colaboradores (2010) com camundongos pré-imunizados por anticorpos monoclonais revelam que esses animais apresentaram uma sobrevivência significativamente maior em comparação com grupo controle, existindo ainda uma diferença entre o anticorpo MNT1 e MNT2. Os animais imunizados com MNT1 sobreviveram mais do que aqueles imunizados com MNT2. Estes resultados indicam que esses dois anticorpos monoclonais contra a NTPDase-II tem um papel importante na proteção do hospedeiro a infecção pelo *T. gondii*. Assim, esses anticorpos não podem impedir a invasão, mas podem reduzir a replicação do taquizoídeo de *T. gondii*. Embora o mecanismo de inibição por anticorpos monoclonais não seja claro, eles representam novas perspectivas para o desenvolvimento de vacinas e medicamentos (Tan, Hu *et al.*, 2010).

Muitas informações sobre a epidemiologia das diferentes espécies de *Leishmania* do Novo Mundo foram possíveis através da aplicação de técnicas que empregam anticorpos monoclonais específicos, bem como critérios moleculares para identificação e classificação de isolados de *Leishmania ssp* em comparação com linhagens de referência padrão (Grimaldi, Tesh *et al.*, 1989).

A investigação do padrão de expressão das subclasses de IgG como modo de aproximação da resposta Th1 é muito atraente para os estudos de imunogenicidade de vacinas em cães. O perfil das subclasses de IgG em relação análise clínica dos cães atualmente não é clara (Carson, Quinnell *et al.*,

2010). Alguns estudos mostram maiores níveis de elevação de IgG2 e IgG1 em cães assintomáticos comparados com infecções sintomáticas (Iniesta, Gallego *et al.*, 2005; Carrillo, Ahmed *et al.*, 2007; Ramos, Alonso *et al.*, 2008), enquanto outros autores mostram a associação oposta (Cardoso, Schallig *et al.*, 2007; Iniesta, Gallego *et al.*, 2007). Uma das razões para estes resultados inconsistentes se fundamenta na falta de especificidade dos anticorpos policlonais conjugados, disponíveis comercialmente e utilizado nos estudos (Day, 2007). Desta forma a utilização de anticorpos monoclonais com alta especificidade para as subclasses de IgG canina tem como intuito resolver este problema (Mazza, Duffus *et al.*, 1993; Day, 2007).

Anticorpo monoclonal também foi desenvolvido no intuito de diferenciar a fases promastigota metacíclica do parasito. Desta maneira o anticorpo 3A1-La foi aplicado em cultura heterogênia de fase estacionária para a purificação de promastigotas metacíclicos de *L. major* (Chaves, Soares *et al.*, 2003). Este anticorpo monoclonal foi capaz de aglutinar parasitos procíclicos indiferenciados permitindo a seleção negativa das formas metacíclicas (Qi, Popov *et al.*, 2001; Norsworthy, Sun *et al.*, 2004).

Em síntese, os anticorpos monoclonais têm sido extensivamente empregados para a identificação de espécies de *Leishmania*, desenvolvimento de testes diagnósticos, investigação de moléculas associadas com a virulência do parasita e/ou patogenicidade, também na caracterização de antígenos definidos de *Leishmania* que devem ser capazes de produzir imunoproteção após a vacinação (Grimaldi e Tesh, 1993). Todas estas já comprovadas aplicações poderão ser testadas usando os monoclonais produzidos neste trabalho, o que justifica sua produção.

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Obter hibridomas produtores de anticorpos monoclonais contra a NTPDase 2 de *L. major* para serem usados em diversas aplicações biológicas e biotecnológicas.

3.2 - Objetivos específicos

Amplificar, clonar e sequenciar a região gênica de *L. major* responsável pela codificação do domínio extracelular solúvel da proteína E-NTPDase-2.

Expressar heterologicamente em sistema bacteriano (pET21b/*E.coli* BL21) o domínio solúvel da proteína E-NTPDase2 de *L. major* (cepa IFLA/BR/67/PH8).

Padronizar a purificação da proteína heteróloga em coluna de afinidade contendo Ni⁺⁺ (NTI-agarose-QIAGEN).

Imunizar camundongos BALB/c com a proteína purificada.

Obter o título dos anticorpos policlonais no soro hiperimune.

Cultivar células de mieloma para a fusão com os linfócitos B dos camundongos imunizados com a proteína E-NTPDase2 de *L. major*.

Obter hibridomas que produzam anticorpos monoclonais contra a proteína E-NTPDase2 de *L. major*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Local

Os procedimentos laboratoriais referentes a este estudo foram realizados no Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA) - BIOAGRO e no biotério do Centro de Ciências Biológicas, sendo os dois localizados na Universidade Federal de Viçosa.

4.2 - Animais experimentais

Este estudo foi realizado em conformidade com as normas éticas para a pesquisa com animais decorrentes do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Viçosa (Anexo 1). Foram utilizadas seis fêmeas de camundongos BALB/c com cinco semanas de idade oriundas do Biotério Central da UFV situado no Departamento de Veterinária. Estes receberam água e ração comercial peletizada com composição nutricional adequada para a espécie animal, *ad libitum*, durante o decorrer do estudo. Os animais foram mantidos no biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde em gaiolas com cama de maravalha, em condições adequadas de higiene, temperatura (ambiente 21-22 °C, ± 2 °C) e luz (doze horas na presença de luz e doze horas na ausência).

4.3 – Expressão heteróloga da NTPDase-2 de *L. major* em sistema bacteriano

4.3.1- Desenho dos iniciadores para retirada do peptídeo sinal

A realização deste passo se justifica na necessidade de retirada da sequência nucleotídica que codifica uma provável região transmembrana

presente na porção amino-terminal da proteína E-NTPDase-2 de *L. major* (Figura 4.1).

Foi desenhado um par de iniciadores, contendo um oligonucleotídeo direto e um reverso, mostrados na tabela 2. Este par de iniciadores foi desenhado de forma a permitir a inserção do amplicon na região de clonagem do plasmídeo. Sua síntese foi realizada pela empresa XXIDT® (Integrated DNA Technologies). O *site* consultado para auxiliar no desenho foi o SDSC Work Bench. Inicialmente foi feita uma análise de padrão de restrição com endonucleases, para seleção de possíveis enzimas de restrição presentes no sítio de clonagem do vetor pET21b e ausentes na sequência codificante da E-NTPDase-2 de *L. major*. Para esta etapa foi utilizado o programa TACG (*Analyze a NS for Restriction Enzyme Sites*). Assim foram escolhidas seqüências a serem reconhecidas por duas enzimas diferentes (E1 e E2). Essas seqüências foram adicionados à porção 5' e 3' dos iniciadores direto e reverso respectivamente (Figura 5) . A análise do número de nucleotídeos extras necessários nas extremidades dos iniciadores, como forma de garantir a eficiência do ancoramento das enzimas de restrição dos produtos de amplificação, se deu pela opção *Base pairs from End* do mesmo *site*.

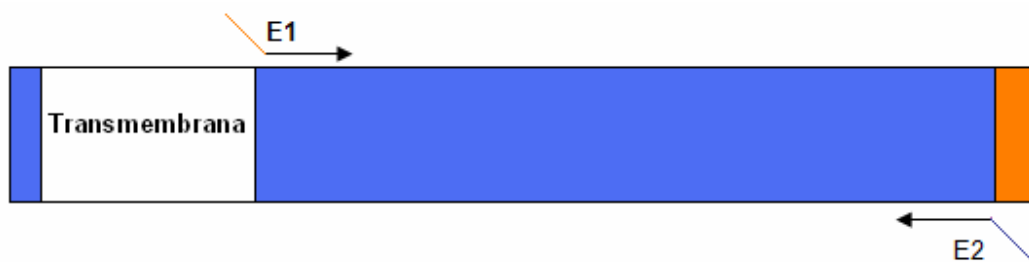


Figura 5: Esquema da região codificante da E-NTPDase2 de *L. major* e da posição dos iniciadores usados na amplificação da região codificante da porção solúvel da proteína.. As setas indicam a posição dos iniciadores direto e reverso. E1 indica o sítio de restrição para a enzima NheI no *primer* direto e E2, o sítio de restrição para EcoRI adicionado ao *primer* reverso. O bloco laranja indica a posição do códon de parada.

Para expressão usando o sistema pET-21b, foi necessária a retirada do *stop-codon* da NTPDase-2, uma vez que o vetor apresenta fusão carboxiterminal com a região codificante da cauda polihistidina. Foi também

necessária a inserção do códon iniciador ATG, referente à metionina inicial no iniciador direto, que assinala o início do evento de tradução da cadeia peptídica de interesse. A sequência dos iniciadores está mostrada na Tabela 2.

Tabela 2 – Sequências dos iniciadores utilizados para ampliações do amplicon codificante da porção solúvel da NTPDase-2 de *L. major*.

<i>Primers</i>	Sequencias 5' ---- 3'
<i>Primer forward</i>	GCTAGCATGTCCCATGTGACTC
<i>Primer reverse</i>	ACTTGAATTCGTTCCATCTTGAGC

4.3.2 – Amplificação da sequência codificante da porção solúvel da NTPDase-2 de *L. major* por PCR (Reação da Polimerase em Cadeia)

A reação para amplificação do fragmento foi realizada em um volume total de 50 µL contendo: 2 µL (aproximadamente 2 µg) do DNA total anteriormente clonado no laboratório (pET-21b + inserto contendo a porção transmembrana), 5 unidades da enzima Pfu DNA Polimerase-recombinante (Fermentas[®]), 0,2 mM de cada dNTP, tampão 1x da Pfu e 20 pmol de cada um dos *primers* específicos em uma temperatura inicial de desnaturação de 94°C por 5 minutos, seguido de 34 ciclos de 94°C por 30 segundos; 60°C por 30 segundos e 72°C por 90 segundos para extensão das fitas pela polimerase. Ao final dos ciclos foi realizada uma extensão final de 5 minutos à 72°C.

Os produtos amplificados pela PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, imerso em tampão TBE (Tris-borato 0,09M e EDTA 2mM), em cuba horizontal, a 100V. O padrão de tamanho molecular utilizado foi o 1kb plus DNA ladder (Invitrogen[®]). As bandas de DNA foram coradas com brometo de etídeo (1µg/mL) e visualizadas através do uso de um transluminador UV.

4.3.3- Purificação do fragmento de DNA do gel de agarose

Após a eletroforese, o amplicon de cerca de 1053 pares de base referente a banda de interesse foi extraído com o *kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega[®]). A metodologia de extração se deu de acordo com o manual do fabricante.

A solução contendo os fragmentos de DNA purificados do gel de agarose foram estocados a -20°C até o momento do uso para reação de ligação em vetor plasmidial.

4.3.4 - Vetores de Clonagem e de Expressão

Foi utilizado o vetor pJET-Blunt (Fermentas[®]) ilustrado na figura 6, destinado à clonagem direta do produto de PCR e consequente amplificação para extração e purificação para a passagem para o vetor de expressão pET21b. Esta etapa foi realizada, pois a digestão direta do produto de PCR não foi bem sucedida, então foi utilizada a estratégia de sub-clonar em vetor pJET-Blunt com posterior clonagem em vetor pET21b.

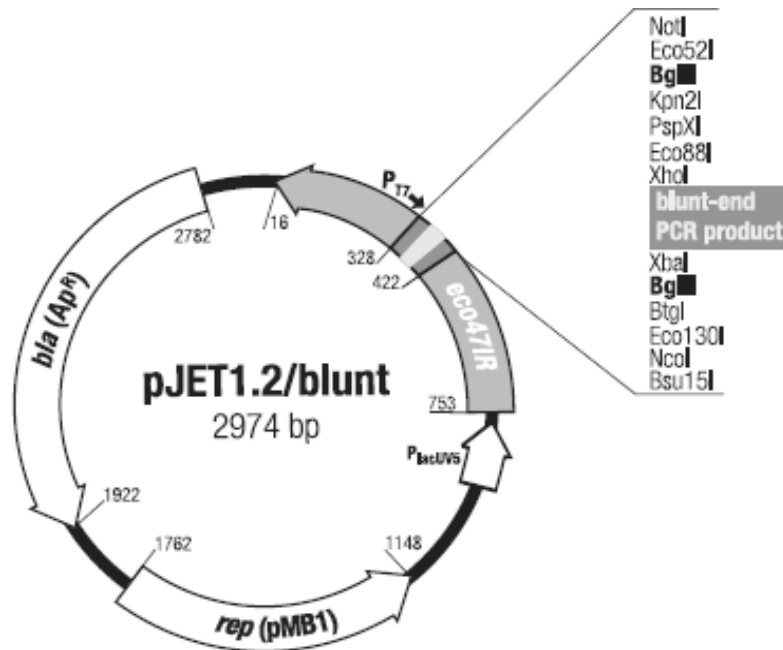


Figura 6: Mapa físico do vetor de clonagem pJET-Blunt (Fermentas[®]).

Foi utilizado o vetor pET21b (Novagen®), destinado à expressão intracelular de proteínas em sistema bacteriano *Escherichia coli* BL21-DE3 (Figura 7).

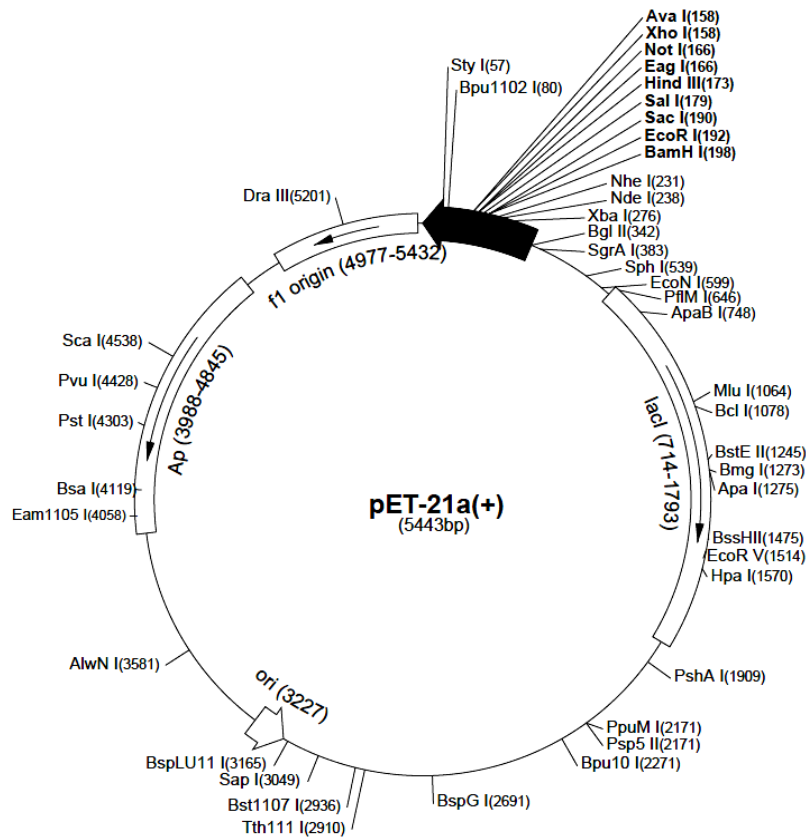


Figura 7: Mapa físico do vetor de expressão pET21b (Novagen®).

O vetor pET21b possui 5443 pb e vários sítios de restrição únicos destinado à inserção do gene de interesse. A seleção de indivíduos transformantes é possível devido ao gene de resistência ao antibiótico ampicilina.

4.3.5- Clonagem em vetor de entrada pJET-Blunt com extremidade cega

A clonagem do produto de PCR *blunt-ended* gerado pela Pfu polimerase (Fermentas[®]), extraído do gel, foi realizada por meio do *kit* comercial CloneJET™ PCR Cloning Kit, de acordo com manual do fabricante. O CloneJET™ PCR Clonagem Kit foi escolhido por apresentar um sistema de seleção positiva para a clonagem de produtos de PCR gerados com qualquer DNA polimerase termoestável. Além disso, qualquer fragmento de DNA sem extremidade coesiva pode ser clonado, sendo aplicável a DNA fosforilado ou não-fosforilado.

A reação de ligação para o vetor de amplificação pJET1.2-Blunt foi realizada com a enzima T4 DNA ligase (Promega[®]). Foi utilizado 50 ng do produto de PCR purificado. A reação depois de homogeneizada por pipetagem foi mantida à temperatura ambiente por cinco minutos.

4.3.6- Clonagem em vetor de expressão pET21b com extremidades coesivas

No caso do vetor de expressão pET21b, primeiramente foi realizada a digestão enzimática do vetor de expressão e do vetor de amplificação contendo o inserto de interesse (descrito no item anterior). As digestões foram realizadas de acordo com o item 4.3.10.

Em seguida, foi feita a reação de ligação utilizando 1 unidade da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen[®]), de acordo com as especificações do fabricante, 30 ng do DNA plasmidial e 90 ng do DNA alvo purificado. Logo após essa etapa, as células de *E. coli* DH5α foram transformadas com a reação de ligação segundo método proposto por Inoue e colaboradores (1990).

4.3.7- Transformação de células de *E. coli* competentes pelo método de choque térmico

As células hospedeiras *Escherichia coli* linhagem DH5 α utilizadas para clonagem nesse trabalho foram feitas de acordo com Inoue e colaboradores (1990). Para a reação de transformação, inicialmente as alíquotas de 200 μ L de células competentes foram mantidas em banho de gelo para seu descongelamento gradual. Cada tubo contendo as células recebeu 5 μ L de reação de ligação, sendo logo após lentamente homogeneizado e mantido no gelo por trinta minutos. Em seguida, as células foram submetidas a choque térmico: primeiro, colocadas a 42°C por 90 segundos e, em seguida, a 4°C por 2 minutos. Adicionou-se então 800 μ L de meio SOC sem adição do antibiótico e deixou-se por 1 hora a 37°C, sob agitação de 180 x g. Placas de petri com meio LB sólido suplementado com 100 μ g/mL de ampicilina e 100 μ L de IPTG a 100mM (usado somente para as transformações com pJET-Blunt) foram semeadas com 100 μ L de células transformadas. As placas foram fechadas, invertidas e mantidas em estufa a 37°C durante 17 horas. Somente as colônias portadoras do inserto foram capazes de crescer em meio com ampicilina.

A clonagem foi então confirmada por uma reação de PCR feita nos mesmos moldes da PCR para amplificação inicial do inserto descrita no item 4.3.2 e pela reação de clivagem com as enzimas NheI (Fermentas[®]) e EcoRI (Fermentas[®]) em amostras de minipreparação plasmidial extraídas das células transformadas selecionadas.

4.3.8 - Extração de DNA plasmidial

O *kit* Invisorb[®] Spin Plasmid Mini Two (Invitex[®]) foi utilizado nas extrações de DNA plasmidial, sendo todos os procedimentos feitos de acordo com o manual do fabricante.

4.3.9 - Crescimento bacteriano em meio líquido e estoque dos clones

As colônias transformadas, que tiveram confirmada a inserção do fragmento de interesse, foram crescidas em meio Luria-Bertani (LB) líquido (10g/L triptona, 5g/L extrato de levedura, 10 g/L e cloreto de sódio) suplementado com 50 µg/mL de ampicilina. Em condições estéreis, as colônias positivas foram transferidas para tubos devidamente identificados, contendo 5 mL de meio LB e em seguida, foram colocadas no agitador com rotação de 180 x g a 37°C por cerca de 16 h.

As células crescidas foram estocadas em alíquotas com 15% de glicerol (Sigma®) e congeladas rapidamente em nitrogênio líquido (-196°C), seguido do armazenamento em freezer a - 80°C, até o momento do uso.

4.3.10 - Clivagens enzimáticas

Em ambos os casos de clonagem, em pJET-Blunt ou pET21b, as confirmações se deram por clivagem enzimática com as enzimas NheI (Fermentas®) e EcoRI (Fermentas®). Os processos de clivagem enzimática foram realizados com incubação de duas horas a 37 °C para cada uma das enzimas. Foi necessária a realização da dupla clivagem de forma seqüencial devido à atividade ótima catalítica das enzimas em tampão Tango, 1X para NheI e 2X para EcoRI. Os produtos da digestão foram analisados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, foi utilizado para captura das imagens o aparelho Eagle Eye Stratagene sob luz UV.

4.3.11 - Sequenciamento

O sequenciamento do DNA plasmidial referente à construção pET21b-NTPDase extraídos de clones de *E.coli* BL-21 foram feitos no Laboratório de

Genômica do BIOAGRO (UFV), usando sequenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences) pelo método enzimático descrito por SANGER *et al.* (1977), utilizando-se o *kit Dyeamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Pharmacia Biotech).

4.3.12 - Indução da expressão protéica

As células portadoras do plasmídeo foram pré-inoculadas em 10 mL de meio LB líquido (10 g/L triptona, 5 g/L extrato de levedura e 10 g/L cloreto de sódio) suplementado com 50 µg/mL de ampicilina e crescidas por cerca de 16 horas em *shaker*, a uma temperatura de 37°C. No dia seguinte foi realizada a expansão do pré-inóculo na proporção de 1:100 em 500 mL de meio SOC líquido, composto por meio SOB (2g de triptona; 0,05g de NaCl; 0,5g de extrato de levedura; e 0,0625 mL de cloreto de potássio 2,5 mM pH 7,0) acrescidos, no momento do uso, de 20mL de glicose 1M e 10mL de cloreto de magnésio 1M. O inóculo foi incubado em *shaker*, a 37°C, até as culturas alcançarem valores de densidade ótica (DO₆₀₀) entre 0,6 a 0,8. Ao atingir a DO desejada, foi adicionado IPTG (Isopropyl β-D-1 thiogalactopyranoside - SIGMA®), o indutor sintético da expressão em uma concentração no meio de 0,5 mM e tempo de duas horas para indução. Após este período, os inóculos foram centrifugados em tubos estéreis a 3000 x g durante 10 minutos à temperatura ambiente. Como a expressão protéica é intracelular, o *pellet* foi acondicionado a -80°C até o momento do uso.

4.4- Purificação da proteína recombinante

O *pellet* recolhido do ensaio de expressão protéica foi suspenso em 4 mL de tampão de lise (Tris 50mM pH 8,0; NaCl 100mM; 10mM de EDTA) contendo inibidores de protease (aprotinina 1µg/mL; pepsistatina 1µg/mL; leupeptina 1µg/mL) e lisozima (1mg/mL). As amostras foram deixadas no gelo por trinta minutos e logo após lisadas por sonicação em sonicador Ultrassônico (Misonix®).

Foram feitas seis sonicações de dez pulsos, cada um por dez segundos, com uma amplitude de vinte por um minuto. Prosseguiu-se a centrifugação das amostras por quinze minutos a 1.100 x g a 4°C. A fração solúvel foi reservada e o *pellet* recuperado e lavado duas vezes com 20 mL de tampão de lavagem (Tris 50mM pH 8,0; NaCl 500mM; 10mM de β-mercaptoetanol e 2M de uréia), sendo o sobrenadante obtido em cada passo coletado para avaliação posterior. O *pellet* foi suspenso em 1mL de tampão "X" (50mM de Tris pH 8,0; 500mM de NaCl; 10mM de β-mercaptoetanol e 8M de uréia) e submetido ao processo de purificação em resina de afinidade ligada a níquel.

O extrato contendo a proteína pré-purificada foi submetido a cromatografia de afinidade em resina contendo Ni²⁺ (NTI-agarose-QUIAGEN), usando processo manual estabelecido por Santos e colaboradores 2009. Inicialmente a resina foi equilibrada por duas lavagens em tampão de amostra (50mM de Tris pH 8,0; 500mM de NaCl; 10mM de β-mercaptoetanol e 8M de uréia), seguida de centrifugação por cinco minutos a 1.100 x g e 4°C. O sobrenadante foi descartado e neste momento foi adicionada a proteína. O sistema permaneceu por uma hora e meia em banho de gelo, sob agitação constante, para a ligação da proteína à resina. Terminado este passo, foi realizada uma centrifugação por cinco minutos a 1.100 x g e 4°C e o sobrenadante foi armazenado (volume não ligado). A coluna foi lavada três vezes em tampão de lavagem (50mM de Tris pH 8,0; 100mM NaCl; 20mM de imidazol e água) e em cada uma das lavagens o sobrenadante foi recolhido (lavagens 1, 2 e 3). A eluição se deu em quatro repetições com o tampão de eluição (50 mM de Tris pH 8,0; 100 mM NaCl; 250 mM de imidazol) e sucessivas centrifugações de cinco minutos a 1.100 x g e 4°C, sendo as alíquotas devidamente coletadas (eluições 1, 2, 3 e 4). No final do processo, foi feita a lavagem da resina com três volumes de água, centrifugação, cinco volumes de guanidina 6M, centrifugação, e por fim, três volumes de água, centrifugação e armazenamento da resina em solução de etanol 20%.

Todas as amostras foram analisadas em gel SDS-PAGE 15% corado com coomassie blue e com prata. As frações protéicas do extrato celular de *E. coli*

BL-21 induzida, não induzida, purificada e dos diferentes passos envolvidos na purificação da proteína, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE).

A eletroforese foi realizada utilizando-se o sistema *Mini Protean III Dual Slab Cell* Bio-Rad®, por duas horas a 100 volts.

Os padrões de massa molecular utilizados foram: Color Plus Prestained Protein Marker pré-corado (BioLabs®), usado quando o gel em questão foi empregado no *western blotting*, e PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas®) e/ou Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas®), quando se tratava apenas da avaliação em gel das etapas envolvidas na pré-purificação e na purificação protéica. Após a corrida eletroforética, o gel foi transferido para solução corante (50% etanol; 12% ácido acético e 0,1% do corante Azul de Coomassie brilhante R250 - Vetec®). Após quatro horas, a solução corante foi substituída pela solução descorante (50% etanol; 12% ácido acético) e o gel deixado sob agitação até descoloração adequada para visualização dos perfis protéicos. Todos os procedimentos foram feitos de acordo com Sambrook (1987).

4.4.1- SDS-PAGE e coloração por nitrato de prata

Após a corrida eletroforética, o gel foi fixado em metanol 50% e formaldeído 37% por uma hora. Realizaram-se três lavagens de 5 minutos em água. Logo após, foi adicionado para o pré-tratamento uma solução de tiosulfato de sódio 0,02% por 1 minuto. O gel foi novamente lavado três vezes com água por 5 minutos. A impregnação foi feita em solução de nitrato de prata 0,2% por 20 minutos sob agitação lenta e livre da presença de luz. Em sequência, seguiu-se mais um ciclo de lavagens e incubou-se o gel com a solução reveladora (3% de NaOH e 0,5% de formaldeído e água q.s.p para 100mL e 2mL de solução tiosulfato de sódio 0,02%) até o aparecimento das bandas. A reação foi paralisada com 50% de metanol e 50% de ácido acético quando foram

visualizadas as bandas protéicas. O gel corado foi então digitalizado e as imagens analisadas.

4.4.2 - Western blot

Após a separação das frações protéicas em gel de poliacrilamida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose de 0,45 μ m (Millipore[®]), por duas horas a duzentos volts, como descrito por Sambrook *et al* (2001). O uso de padrão de massa molecular pré-corado auxiliou na verificação da eficiência do processo de transferência.

Ao término da transferência, a membrana de nitrocelulose foi tratada com solução de bloqueio (3% de BSA em PBS-Tween 0,05%) *overnight* e em seguida lavada por três vezes com PBS-Tween 0,05%. A membrana foi então incubada por cinco horas à temperatura ambiente com anticorpo primário monoclonal anti-poli-histidina produzido em camundongo, na diluição de 1: 6000 (Sigma[®]). Um novo ciclo de três lavagens foi realizado usando PBS-Tween 0,05% e então foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a FITC (Sigma[®]), na diluição de 1: 8000 e deixado por duas horas à temperatura ambiente. Seguiram-se mais duas lavagens com PBS-Tween 0,05%. A fluorescência do FITC foi observada em um foto documentador de fluorescência FLA 5100 (Fujifilm[®]).

4.4.3 - Dosagem de proteínas pelo método de Bradford

Os teores de proteínas nas amostras foram quantificados conforme descrito por Bradford (1976). O método de Bradford é um método colorimétrico baseado na interação entre o corante Coomassie Brilliant Blue R e proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (Zaia, 1998).

A cada uma das amostras oriundas de diferentes passos do processo de purificação foram adicionados 900µL do reagente de Bradford (Sigma®). A absorvância foi lida a 595nm em espectrofotômetro previamente calibrado com 100µL da solução tampão e 900µL do reativo de Bradford. A cada leitura, tomou-se o cuidado de limpar a cubeta com álcool etílico e após, com água destilada. Os valores de absorvância foram convertidos em concentração de proteínas, utilizando a curva padrão $Y = 0,28X - 0,025$, $r^2 = 0,9814$, construída com soluções em diferentes concentrações de BSA (Albumin Bovine - Sigma®).

4.5 – Imunização dos animais

4.5.1- Inoculação dos animais

Os animais foram inoculados por via subcutânea, a cada quinze dias, em um número total de doses igual a três. O adjuvante utilizado na primeira inoculação foi o adjuvante completo de Freud (Sigma®) em uma proporção de 1:1 com o extrato protéico purificado em concentração de 60 µg por dose. As outras duas imunizações foram feitas com adjuvante incompleto de Freud (Sigma®) em uma proporção de 1:1 com o extrato protéico purificado em concentração de 10µg por dose.

4.5.2 - Coleta de sangue

As amostras de sangue foram coletadas sem uso de anticoagulante através do plexo retro-orbital e depois centrifugadas para a separação do soro que foi armazenado a -20°C até a realização do DOT-ELISA para averiguação da produção de anticorpos específicos pelos camundongos frente as inoculações da proteína E-NTPDase-2 de *L. major*.

Vale lembrar que as atividades experimentais que envolveram os animais foram realizadas por um médico veterinário durante todo o trabalho e seguindo o Código de Ética Profissional, os Princípios Éticos na Experimentação Animal

adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e a legislação vigente. Abaixo segue um esquema do processo de imunização utilizado.

Cronograma de Inoculações e Coletas

Tempo zero	15 dias	30 dias	45 dias
Coleta 1 Inoculação 1	Inoculação 2	Inoculação 3	Coleta 2

Figura 8 – Cronograma de inoculação e coleta do sangue

4.6 - Cultivo das células de mieloma SP2/0

As células de mieloma da série plasmocitária não secretoras de imunoglobulinas (SP2/0) (Shulman, Wilde *et al.*, 1978), foram cedidas pelo Dr. Luís Carlos Crocco Afonso, coordenador do Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), e cultivadas de acordo com a metodologia descrita por Rocha (2000).

Os criotubos contendo os mielomas foram retirados do nitrogênio líquido e posteriormente aquecidos em banho-maria, de 2 a 5 minutos a 37°C. O material descongelado foi transferido para tubo de centrifuga e o volume completado para 10mL com meio RPMI incompleto. O tubo foi centrifugado a 182 x g e 4°C por 5 minutos e posteriormente o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi desprendido com meio RPMI - 10% de soro fetal bovino (SFB-Cultilab®) e homogeneizado. Logo após foram transferidos 500µL para garrafa de cultivo de 25cm² contendo 10mL de meio RPMI - 10% SFB. A garrafa foi mantida em estufa a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂ e repicada a cada 48 – 72 horas até se obter número suficiente de células para a realização do

processo de fusão, que foi de 250.000 células/mL. O meio foi trocado após centrifugação a 182 x g por 5 minutos.

4.7 - Contagem das células

A contagem de células se deu utilizando câmara de Neubauer. A suspensão celular foi centrifugada a 182 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a células suspensas em 1mL de meio RPMI incompleto. Dessa suspensão, foram retirados 10µL e a este volume foram acrescentados 10µL de Azul de Tripán a 1000 µL de água. Dez microlitros dessa solução foram colocadas em câmara de Neubauer para a contagem celular. As células que não estavam coradas pelo reagente Azul de Tripán estavam viáveis e as coradas, não viáveis. Os resultados das contagem foram obtidos utilizando o seguinte cálculo descrito por Kalks (2008):

X = Média das células viáveis contadas (número de células/ número de quadrados)

Células por mL = X x 10⁴ x fator de diluição

4.8 – DOT-ELISA para avaliação da produção de anticorpos específicos no soro dos camundongos

Inicialmente, foi colocada sobre a membrana de nitrocelulose, devidamente cortada em pequenos círculos, uma alíquota de 2µL da proteína E-NTPDase-2 de *L. major* que correspondia a uma concentração final de 0,5µg/µL, seguido do processo de secagem à temperatura ambiente por trinta minutos, sendo posteriormente incubada com solução de bloqueio - caseína 0,3% em PBS pH 7,6 (NaCl 8 g/L, KCl 0,2g/L, Na₂HPO₄ 1,44g/L, KH₂PO₄ 0,24g/L) por trinta minutos à temperatura ambiente. O soro dos camundongos foi diluído em PBS pH 7,6 em concentrações de 1:100; 1:200; 1:400; 1:800,

assim como o soro pré-imune coletado anteriormente às inoculações. Em seguida, 200 μ L cada diluição foram adicionados nos poços, mantendo-se durante 1 h sobre mesa agitadora. Os poços foram lavados três vezes com tampão de lavagem (1000 mL de PBS pH 7,6; 0,5mL Tween 20) e procedeu-se a incubação, por trinta minutos à 37°C, do anticorpo secundário – IgG de coelho anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma[®], título 1:2.000) diluída em tampão de incubação no volume de 200 μ L/*well*. Mais uma vez os poços foram lavados três vezes com tampão de lavagem e adicionou-se a solução reveladora (10mg de DAB – Sigma[®]; 10 μ L de H₂O₂; 10mL de Tris-HCl pH 7,6 e 1 mL NiCl₂ 0,3%) no volume de 200 μ L/*well*. A interpretação dos resultados foi feita visualmente, com base na intensidade de coloração dos discos de nitrocelulose, comparando sempre com os controles negativos.

4.9 - Coleta dos linfócitos

A coleta dos linfócitos foi realizada nos camundongos que se demonstraram positivos pela metodologia de DOT-ELISA. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Posteriormente, foram mergulhados em solução de álcool etílico 70% v/v por 3 minutos para a desinfecção. Os animais foram fixados em prancha de isopor, dentro de capela de fluxo, previamente descontaminada. A pele do abdômen foi rebatida com auxílio de uma pinça e tesoura estéreis. Logo após, foi realizada a esplenotomia e o baço foi colocado em placa de Petri estéril, com 10mL de meio RPMI-1640 incompleto. O sobrenadante resultante de uma centrifugação a 182 x g foi descartado e o *pellet* suspenso em solução de lise de hemácias. Novamente, o tubo foi centrifugado e o sobrenadante descartado. Este procedimento foi realizado três vezes. Posteriormente foi feito o descarte do sobrenadante e o *pellet* suspenso em 10mL de meio RPMI-1640 – 10% SFB. A contagem de células se deu utilizando câmara de Neubauer, em uma diluição de 1:100 com água e Azul de Tripán, conforme descrito no item 4.7.

4.10 - Fusão

A fusão das células de mieloma com os linfócitos foi feita de acordo com Sharon (1979). As células foram colocadas em tubo de centrífuga com meio RPMI incompleto para centrifugação em uma proporção de 10^7 e 10^8 células, respectivamente de acordo com Sharon (1979). As células de mieloma foram coletadas das garrafas de cultivo e adicionadas em um tubo de centrífuga, onde foram centrifugadas a $349 \times g$ por 5 minutos. Após a centrifugação as células foram ressuspensas em 5mL de meio RPMI incompleto. Foi retirada uma alíquota de $10 \mu\text{L}$, para a contagem das células sendo o processo de contagem realizado como já descrito.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* resultante desprendido por pipetagem e incubado em banho-maria a 37°C . Com uma micropipeta foi adicionado, gota a gota, 1mL de polietilenoglicol 50% (PEG), a temperatura ambiente durante o intervalo de 1 minuto. Após este procedimento adicionou-se meio RPMI incompleto, à temperatura ambiente, do mesmo modo em que foi realizada a adição de PEG. Os híbridos recém formados foram então centrifugados a $182 \times g$ por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi suspenso em 10mL de meio RPMI completo (meio com 10% SFB, com sulfato de gentamicina, anfotericina, glutamina e HAT-1X). Em seguida, o volume foi completado para 50mL de meio, e, com uma micropipeta multicanal, os híbridos foram distribuídos em placas de cultivo. Cada poço recebeu $100\mu\text{L}$ da suspensão de hibridomas. As placas foram incubadas em estufa com atmosfera de CO_2 5% (Thermo®). Após 48 horas, os híbridos foram realimentados com mais $100\mu\text{L}$ de meio RPMI completo com HAT, e a cada 72h, foram trocados $100\mu\text{L}$ do meio de cultivo. Este procedimento foi repetido por 15 dias. Após este período, 50% do meio de cultivo foi trocado por meio RPMI completo com HT.

4.11 - Coleta de sobrenadante do cultivo celular

Passados 15 dias do procedimento de fusão, foram coletados 100µL de sobrenadante de cada poço das placas em cultivo. Esse sobrenadante foi recolhido com o auxílio de uma micropipeta multicanal, tomando-se o cuidado para não ocorrer perda dos hibridomas durante o processo. O meio coletado foi então acondicionado em placas de 96 *wells* e armazenados a -20°C até a realização do ELISA para a detecção de anticorpos anti-NTPDase, como descrito por Kalks (2008).

4.12 - ELISA para avaliação do sobrenadante

Para avaliação dos níveis de anticorpos contra a proteína NTPDase-2 de *L. major*, foi realizado o testes de ELISA indireto, como citado por Gómez (2007) seguindo as técnicas descritas por Lima (1998) e Barros (2001). Resumidamente, as placas de ELISA foram sensibilizadas com uma solução de tampão carbonato pH 9,6 (0,159g Na₂CO₃; 0,293g NaHCO₃; H₂O deionizada q.s.p. 100mL) na qual o a proteína NTPDase-2 de *L. major* foi diluída na quantidade de 1µg/*well*, deixando-se adsorver em repouso à 4°C por um tempo médio de 12 h. Decorrido este período, as placas foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem PBS-T (NaCl 8g/L, KCl 0,2g/L, Na₂HPO₄ 1,44g/L, KH₂PO₄ 0,24g/L, 0,1% v/v Tween 20, pH 7,4)., sendo em seguida incubadas com a solução de bloqueio – caseína 2% em PBS pH 7,6 (NaCl 8g/L, KCl 0,2 g/L, Na₂HPO₄ 1,44g/L, KH₂PO₄ 0,24 g/L, 0,1% v/v) por uma hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas duas vezes e, posteriormente, foram adicionados 200 µL/*well* dos soros dos animais do experimento diluídos 1:100 em tampão de incubação (87,5 mL de PBS pH 7,6; 12,5 mL de caseína 2% em PBS pH 7,6; 50µL de Tween 20), deixando-se incubar por duas horas à 37°C. As placas foram lavadas seis vezes com tampão de lavagem e procedeu-se a incubação, por duas horas à 37°C, do anticorpo secundário – IgG de coelho anti-IgG de camundongo conjugada com peroxidase (Sigma[®] título 1:40.000)

diluída em tampão de incubação no volume de 100 $\mu\text{L}/\text{well}$. As placas foram lavadas seis vezes com tampão de lavagem e a reação colorimétrica foi desenvolvida utilizando 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ da solução que contém o substrato cromogênico (10 mL de tampão citrato fosfato 0,1M, pH 5; 4mg de O.P.D. (o-Phenylenediamine - $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2$, 98%, AGROS ORGANICS); 5 μL de H_2O_2 30 %). A reação foi incubada, protegida da luz, por 10 minutos à temperatura ambiente. O desenvolvimento da cor foi paralisado com 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ de solução de H_2SO_4 1,5M e a presença de anticorpos foi determinada através da leitura da absorvância com um comprimento de onda de 492 nm (DO492nm) em leitora de placa *Thermo Plate* (Leitora de Microplaca – TP-Reader). Os controles negativos consistiram nos poços incubados com meio RPMI completo no lugar do sobrenadante das culturas.

Para discriminar o ponto de corte entre positivo e negativo para a resposta sorológica mensurada no teste de ELISA, foi utilizada a adição de dois desvios padrões aos controles negativos (especificidade de 95%).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos desenvolvidos por De Souza e colaboradores (2010) demonstraram que distintos clones do parasito *Leishmania* apresentam uma relação direta entre a infecção do parasito em modelo murino e a atividade hidrolítica dos nucleotídeos. Estes dados reforçam relatos anteriores (Maioli, Takane *et al.*, 2004; Marques-Da-Silva, De Oliveira *et al.*, 2008) e suplementam a hipótese de que as enzimas da matriz extracelular envolvidas no metabolismo de nucleotídeos são importantes fatores de virulência de *Leishmania* (Berredo-Pinho, Peres-Sampaio *et al.*, 2001; Pinheiro, Martins-Duarte *et al.*, 2006). As enzimas ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase) e 5'-nucleotidase, seqüencialmente, hidrolisam ATP extracelular a adenosina (Robson, Seigny *et al.*, 2006). As apirases, proteínas do tipo E-NTPDases, têm como principal função a degradação de nucleotídeos, especialmente extracelulares, di e/ou trifosfatados. Este trabalho visou à produção de hibridomas para a obtenção de anticorpos monoclonais contra a proteína E-NTPDase2 (nucleosídeo difosfatase) de *L. major*.

5.1 – Clonagem nos vetores pJET-Blunt e pET-21b

No início do presente trabalho, nosso laboratório já havia clonado o fragmento gênico responsável pela codificação da proteína E-NTPDase-2 de *L. major* (Gi - 157866723) em vetor de clonagem pGEM. Foi necessário o desenho de *primers* específicos, *primer forward*: 5'GCTAGCATGTCCCCATGTGACTC3'; *primer reverse*: 5'ACTTGAATTCCGTTCCATCTTGAGC3', para a retirada dos nucleotídeos correspondentes a uma provável região transmembrana presente na porção amino-terminal da proteína E-NTPDase-2. Este par de *primers* foi desenhado de forma a permitir a inserção do amplicon na região de clonagem do plasmídeo pET-21b (Novagen®).

Sabe-se que a família 5'- ectonucleotidase é caracterizada por um grupo de enzimas que pode estar localizada no citosol, na matriz mitocondrial ou

ancorada à membrana celular (Zimmermann, 1992; Hunsucker, Mitchell *et al.*, 2005). O sítio catalítico dessas enzimas está voltado para o meio extracelular e algumas destas estão presentes em membranas de organelas (Zimmermann, 2000). As NTPDases de superfície (E-NTPDase) são responsáveis pela modulação da sinalização nas terminações purinérgicas (Zebisch e Strater, 2007).

A figura 9 mostra a sequência nucleotídica e aminoacídica da proteína E-NTPDase-2 de *L.major*, que serviu como molde para a confecção dos *primers*. Em amarelo, a região de anelamento do iniciador direto para a retirada da possível porção transmembrana, possibilitando desta maneira a obtenção da proteína solúvel. Em cinza a região responsável pela codificação do domínio solúvel da E-NTPDase-2.

```

M R P Y S S V R R M T Q Q S K R L R V A
1 atg cgtccgtactcctcgggtcggcgcatgactcaacaatcgaagcgcctgcgcgtcgcc 60
S T L V L S A L V I F G F L V Y H Q S P
61 agcacccttgcttagcgcgcttgatcttcgggttctcgtctaccatcaaagcct 120
L F S P C D S A Y A N V Y D V V I D A G
121 ttgttc tcccatgtgactcggcgtagcgaatgtatacgcgctcgtcatcgacgctggc 180
S T G S R V H V F Q Y E R G R T G F V L
181 agcactggctcacgtgtgcatgtatttcagtagcgcggccgaccggtttcgtactt 240
L R E R F K R A E P D L S S F A T D L D
241 ctgagagagcgttcaaacgagcagagccggatctgtcctctttcgccaccgacctggac 300
G A K A S L E G L L R F A D T V V P Q S
301 ggcgccaaggcgtcgttgaggggttctgcgctttgcggtacgggttccgcagagc 360
Y Q K C T S V T L K A T A G L R L L P E
361 taccagaagtgcacctctgtcactctcaaggccaccgcccgccttaggctcctacctgag 420
S A Q Q A L L D V A Q H T L N A S P F Q
421 tccgcccagcaggcgtgctggacgttgcccagcacacactcaacgcacatctccatttcag 480
S R G A S I I S G A Q E G V Y G W L T V
481 tctcggcgccctccatcatctctggcgctcaagagggcgtctacgggtgctgacggtg 540
N Y L L D R L D T D V A T V A T I D M G
541 aactacctgctggacagactcgacacggacgttgccaccgtcgcgacctcgatatggga 600
G A S T Q V V F E T A P T S G E W L P F
601 ggcgcctcgacacaggtcgtcttcgagacggcgcccacgtctggagaatggctgcccttc 660
N Y A Y Q L R T P K R T I A M Y Q H S Y
661 aactatgcctaccagctgcgcacaccaaagcgcacgatcgccatgtatcagcacagctac 720
L G L G M N E A K K K L M T L F A E A N
721 ctcgcccttgggatgaacgaggcgaagaagaagcttatgacgttggttcgccgaagcgaac 780
G T L S F P C F P R G Y T K R V N G V E
781 gggacgttgctcttcccggtcttcccgagaggggtatacgaagcgcgtaaacggtgtggaa 840
L R N N D A T D F N A C V G L F R E H V
841 cttcgaaacaatgacgccacagactttaacgcgtgtgtaggactatcttcgagacatgctc 900
I T T S T C R F D A C G A R G V P Q P L
901 ataacaacgtcgacctgcaggtttgatgcgtgtggcgcgctggcgctgcccagccgctg 960
F P S R R H P V Y A F S Y F Y D R L Y H
961 ttccatcaaggcggcacccttaccgcttctcctacttttatgaccgactctaccac 1020
F H K E G R P V Y V S L Y K E V G K E V
1021 ttccacaaggaggggaggccagctctacgtctcggtgtacaaggaggtcgggaaagaggtg 1080
C H R E S A S R A T T P E E T A C M E L
1081 tgccaccgggaatctgcgagtcggggccaccacctgaggaaacagcctgcatggagctg 1140
A Y L Y S F L T D G L G L
1141 gcgtacctgtacagcttcttgacagacgggctagggcctg 1180

```

Figura 9: Sequência nucleotídica e aminoacídica da E-NTPDase2 de *L.major* (Gi-157866723).

Uma reação de PCR foi realizada utilizando-se os iniciadores específicos, o que levou a formação de um amplicon de aproximadamente 1053 pb, como era esperado. Para garantir a inexistência de contaminantes na reação foi realizado o controle negativo utilizando água no lugar de DNA. Os resultados confirmam a presença do amplicon de interesse e ausência de contaminantes na reação, como pode ser visto na figura 10.1. Foi realizada uma eletroforese com 80 µL da reação de PCR em gel de agarose 1%, o fragmento

de 1053 pb referente ao gene da E-NTPDase-2 foi purificado como observado na figura 10.2 e descrito no item 4.3.3. Tanto a reação da PCR como a purificação da banda no gel foram feitas em duplicatas para obtenção de quantidades necessárias do produto de PCR, bem como eliminação de erros na prática do procedimento.

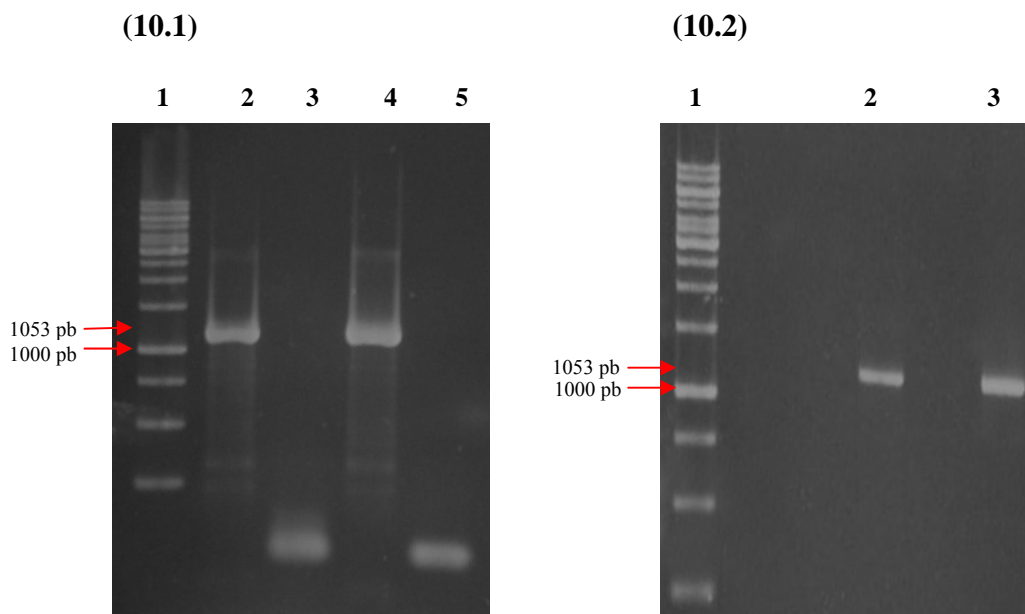


Figura 10: Amplificação e purificação do gene referente à E-NTPDases 2 de *Leishmania major*. **10.1)** Análise eletroforética em gel de agarose 1% (p/v) do produto de amplificação da E-NTPDases 2 de *L. major*. Canaletas: 1) Padrão de tamanho molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen®); 2 e 4) Produto da reação de PCR (5 µL) utilizando os *primers forward* NTPDase e *reverse* NTPDase correspondentes ao gene da E-NTPDases 2 de *L. major* (~1053 pb); 3 e 5) Controle da reação de PCR, utilizando-se água no lugar de DNA. **10.2)** Análise eletroforética em gel de agarose 1% (p/v) do produto de amplificação do gene da E-NTPDases 2 de *L. major* purificado. Canaletas: 1) Padrão de tamanho molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen®); 2 e 3) 5 µL do produto de amplificação purificado. A visualização foi feita com coloração por brometo de etídio sob luz UV.

O passo subsequente à obtenção do produto de PCR purificado foi sua inserção em vetor de clonagem pJET-Blunt, uma vez que a ligação direta do fragmento em vetor de expressão pET21-b não obteve êxito (dados não mostrados). O vetor pJET-Blunt contém um gene letal que é interrompido pela ligação do inserto de DNA no sítio de clonagem. Como resultado, apenas células com plasmídeos recombinantes são capazes de se propagar,

eliminando a necessidade de seleção por diferenciação da cor das colônias azul/branco. O vetor contém um sítio de clonagem múltipla expandida, bem como um promotor T7 para transcrição *in vitro*. Não houve necessidade de clivagem do fragmento gênico nem do próprio vetor devido a extremidade cega do pJET-Blunt que permite a ligação direta do produto da PCR no vetor. Estas informações estão de acordo com o manual do fabricante.

Procedeu-se as análises experimentais com a transformação de *E.coli* DH5- α competente com o DNA recombinante, crescimento e extração do DNA plasmidial para a observação em gel de agarose 1%, como mostrado na figura 11.1. Foi possível a visualização de três bandas referentes aos três graus de enovelamento do DNA plasmidial, evidenciando uma boa extração.

A confirmação da clonagem se deu por uma reação de clivagem com as enzimas de restrição NheI e EcoRI, o que gerou duas bandas, uma com tamanho de 2974 pb referente a banda do vetor, e outra de 1053 condizente ao tamanho do fragmento gênico da E-NTPDase-2, como pode ser visto na figura 11.2. Os iniciadores foram desenhados de forma a inserirem estrategicamente sítio de restrição para estas enzimas flanqueando o inserto.

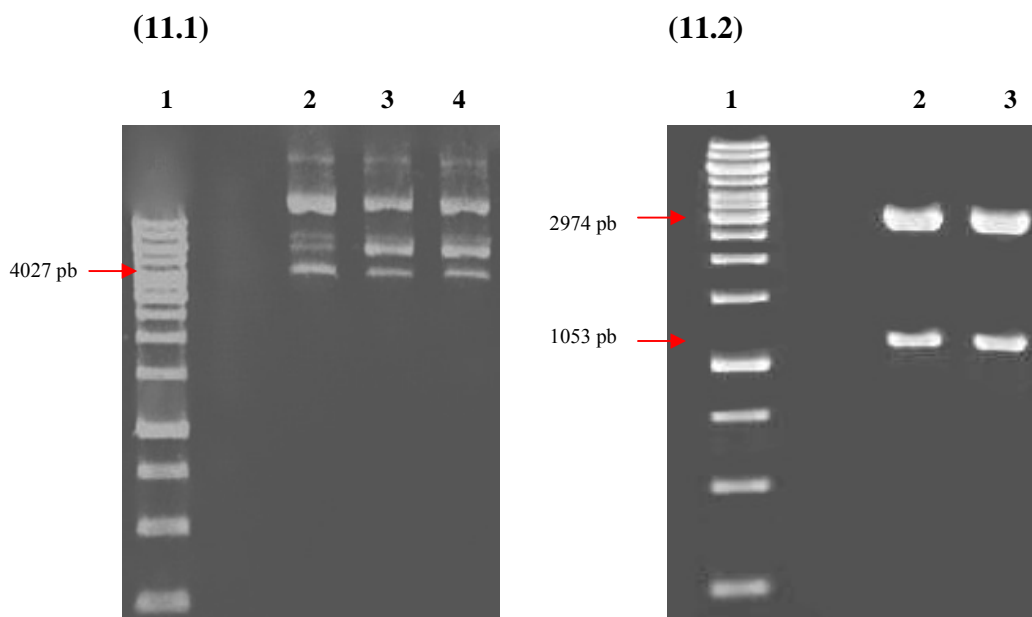


Figura 11: Extração do DNA plasmidial e clivagem enzimática do DNA recombinante
11.1) Análise eletroforética em gel de agarose 1% (p/v) do produto da extração do DNA plasmidial. Canaletas: 1) Padrão de tamanho molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen®); 2, 3 e 4) Produto da extração do DNA plasmidial (5 µL) da construção pJET-Blunt/E-NTPDaes 2 de *L. major* (~4027 pb);
11.2) Análise eletroforética em gel de agarose 1% (p/v) do produto da clivagem do DNA recombinante pJET-Blunt/E-NTPDaes 2 de *L. major*. Canaletas: 1) Padrão de tamanho molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen®); 2 e 3) 5 µL da reação de clivagem enzimática do DNA recombinante pJET-Blunt/E-NTPDaes 2 de *L. major* com as enzimas *NheI* e *EcoRI*. A visualização foi feita com coloração por brometo de etídio sob luz UV.

Após confirmação da clonagem, procedeu-se a digestão do vetor de expressão pET-21b com as mesmas enzimas, visto a necessidade da formação de extremidades coesivas tanto para o vetor como para o inserto, o que é observado na figura 12.1. O DNA plasmidial pET-21b e o inserto foram submetidos a purificação em gel (figura 12.2) tendo como alvo a ligação dos fragmentos purificados para obtenção de um novo DNA recombinante, DNA este com capacidade de expressão de proteína E-NTPDase-2.

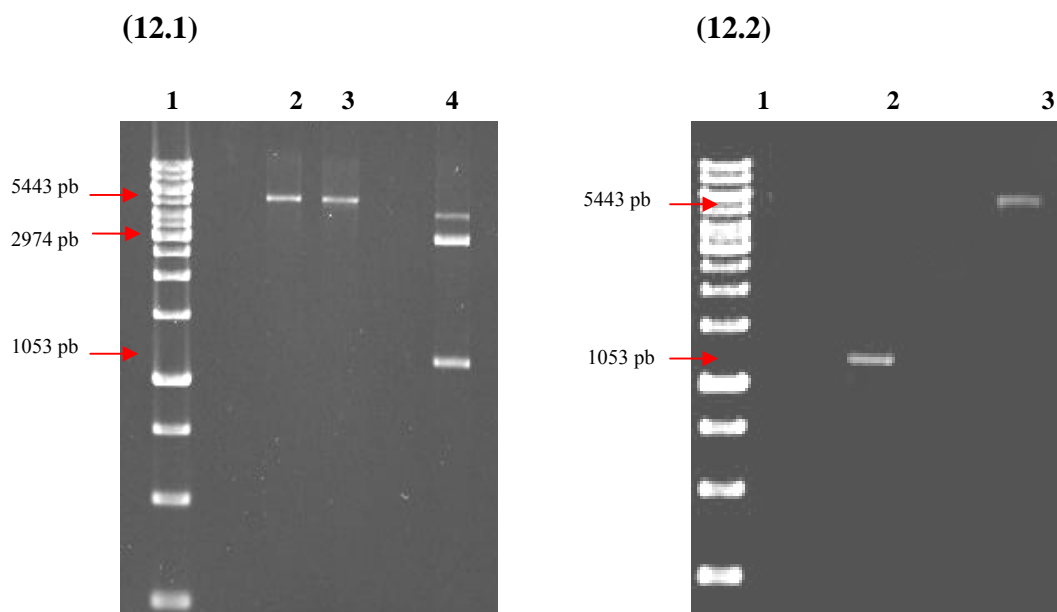


Figura 12: Extração do DNA plasmidial, clivagem enzimática do vetor e purificação das sequências de interesse. **12.1)** Análise eletroforética em gel de agarose 1% (p/v) do produto da extração do DNA plasmidial do vetor pET-21b e digestão do DNA recombinante pJET-Blunt/E-NTPDaes 2 de *L. major*. Canaletas: 1) Padrão de tamanho molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen®); 2 e 3) Produto da extração do DNA plasmidial do vetor pET-21b (5 µL); 4) Digestão da construção pJET-Blunt/E-NTPDaes 2 de *L. major* (~4027 pb); **12.2)** Análise eletroforética em gel de agarose 1% (p/v) do produto da clivagem do DNA recombinante pJET-Blunt/E-NTPDaes 2 de *L. major*. Canaletas: 1) Padrão de tamanho molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen®); 2) 5 µL do produto da purificação da sequência referente a E-NTPDaes 2 de *L. major* ; 3) 5 µL do produto da purificação do DNA plasmidial do vetor pET-21b. A visualização foi feita com coloração por brometo de etídio sob luz UV.

Uma vez obtidos o fragmento referente à E-NTPDase-2 e o vetor pET-21b purificados procedeu-se a reação de ligação e posterior transformação das células de *E.coli* competentes DH5- α .

As colônias portadoras do inserto são capazes de crescer em meio sólido com ampicilina, entretanto, as células não transformadas não resistem a este meio com o antibiótico. Desta maneira, as colônias observadas foram crescidas em meio LB líquido para subsequentes trabalhos, iniciando-se com a extração do DNA plasmidial da colônias transformantes, com aproximadamente 6496 pb, como pode ser visto na figura 13.1. A digestão com as enzimas NheI e EcoRI

foi realizada como primeira confirmação da clonagem e é demonstrada na figura 13.2, seguida de uma PCR com intuito de reforçar a constatação anterior da presença do inserto (figura 13.3).

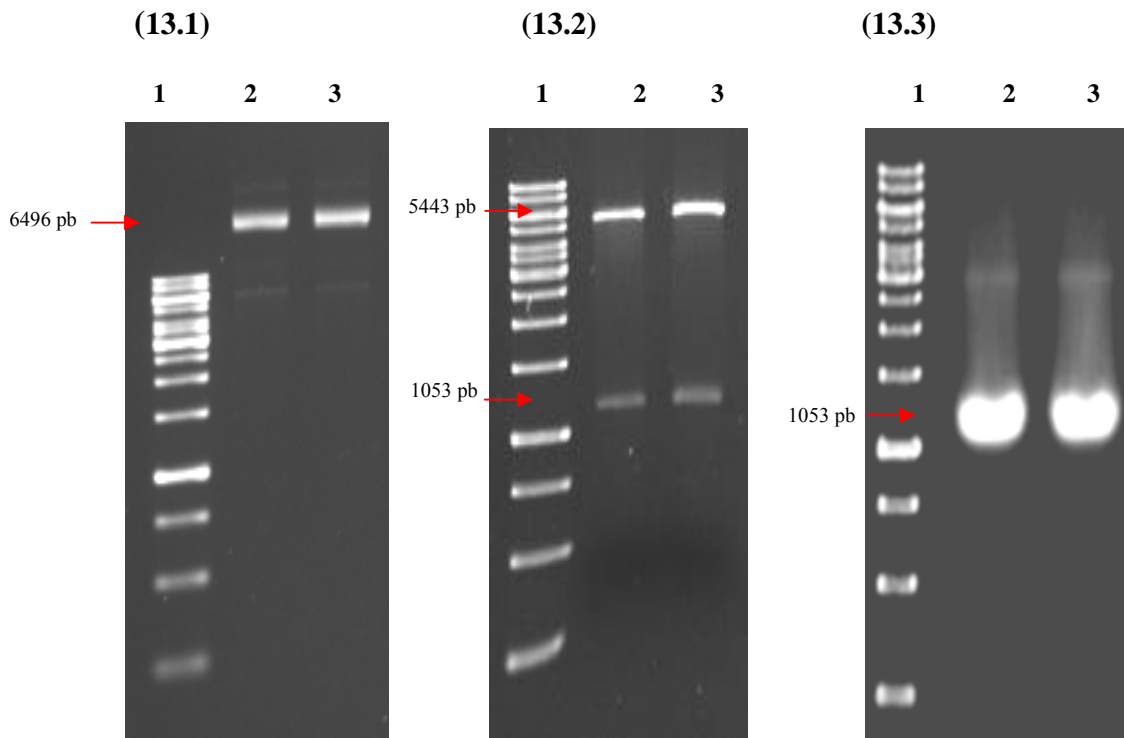


Figura 13: Confirmação da clonagem do amplicon referente a NTPDase-2 em vetor de expressão pET-21b. **13.1)** Análise eletroforética em gel de agarose 1% (p/v) do produto da extração do DNA recombinante pET-21b/E-NTPDase 2 de *L. major*. Canaletas: 1) Padrão de tamanho molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen®); 2 e 3) Produto da extração do DNA recombinante pET-21b/E-NTPDase-2 de *L. major* (~ 6496 pb) (5 µL); **13.2)** Análise eletroforética em gel de agarose 1% (p/v) do produto da clivagem do DNA recombinante pET21b/E-NTPDase 2 de *L. major*. Canaletas: 1) Padrão de tamanho molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen®); 2 e 3) 5 µL do produto da clivagem do pET21b/E-NTPDase-2 de *L. major*. **13.3)** Produto da reação de PCR (5 µL) utilizando os *primers forward* NTPDase e *reverse* NTPDase correspondentes ao gene da E-NTPDase 2 de *L. major* (~1053 pb). A visualização foi feita com coloração por brometo de etídio sob luz UV.

O seqüenciamento confirmou o sucesso da clonagem do amplicon referente a E-NTPDase-2 de *L.major* em pET-21b, como demonstrado no anexo 2.

5.2 – Expressão e purificação da proteína E-NTPDase-2 de *L.major*

Sabe-se que a membrana plasmática dos parasitos contém enzimas com sítios ativos voltados para o meio externo em maior proporção do que aqueles voltados para o meio interno (Meyer-Fernandes, Saad-Nehme *et al.*, 2004). Várias destas moléculas localizadas na membrana celular de endoparasitos estão envolvidas no metabolismo extracelular e na interação com hospedeiros e desempenham funções importantes na interação parasito-hospedeiro. Desta maneira as proteínas E-NTPDase foram identificadas e caracterizadas em diversos parasitos, confirmando sua função na adesão celular (Bisaggio, Peres-Sampaio *et al.*, 2003), sobrevivência intracelular e escape da resposta imune do hospedeiro (De Almeida Marques-Da-Silva, De Oliveira *et al.*, 2008) além da relação direta com o fenômeno da virulência (Santos, 2009).

A apirase recombinante de *L. major* (E-NTPDase-2), de aproximadamente 43 kDa, foi expressa em sistema heterólogo bacteriano, utilizando como indutor sintético o IPTG na concentração de 0,5 mM durante duas horas. As células expressando a proteína foram lisadas, e seguiu-se a pré-purificação, conforme especificações do fabricante da resina (Sigma®). A figura 14 mostra na canaleta 3 uma alta concentração da proteína, o que é condizente com o método pois, neste passo, se utiliza uma concentração de 8M de uréia o que permite a desnaturação da proteína e solubilização desta. Os dois passos subseqüentes, canaletas 4 e 5, revelam a proteína após renaturação com concentração do meio de 400mM de uréia.

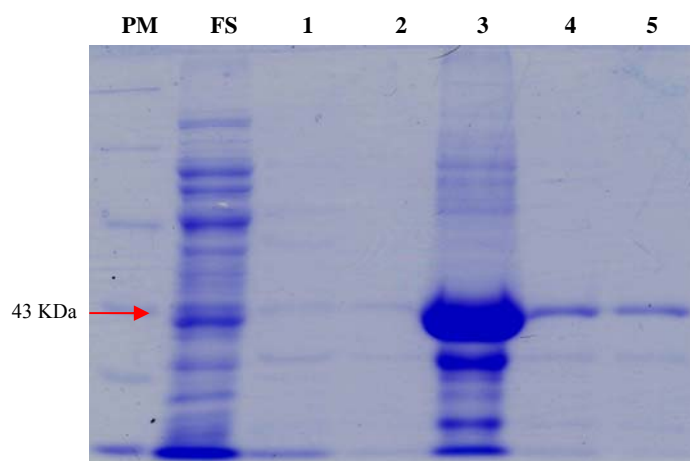


Figura 14 – Purificação dos corpos de inclusão contendo a proteína heteróloga E-NTPDase-2 de *L.major*. Uma amostra de 15 μ L de cada passo da purificação, fita por centrifugação e lavagem foi aplicada em uma das canaletas. O agente desnaturante utilizado foi Uréia. PM) Padrão de tamanho molecular; Unstained Protein Molecular Weight marker; FS) Fração Solúvel; 1 e 2) Lavagens sem uréia; 3) Lavagem com 8M de uréia; 4 e 5) Lavagens com 400mM de uréia. A visualização das bandas do gel de SDS-PAGE 10% se deu pela coloração com Azul de Coomassie.

A amostra oriunda da solubilização com 8M de uréia foi utilizada para dar seguimento ao evento de purificação da proteína. A cromatografia de afinidade foi desenvolvida conforme descrito por Santos e seus colaboradores (2009), que trabalharam com E-NTPDase-1 de *T. cruzi*. A massa molecular observada para a E-NTPDase-2 recombinante purificada está de acordo com a proteína predita pelo programa Protparam para a sequência da E-NTPDase-2 heteróloga solúvel (sem a sequência hidrofóbica aminoterminal previsto por Fietto e colaboradores (2004) e adicionados os aminoácidos derivados do vetor de clonagem contendo a cauda de hexa-histidina). A análise da purificação pode ser vista nas figuras 15.1 e 15.2 que revelam o gel de SDS-PAGE 10% corado com azul de coomassie e com prata, respectivamente. A coloração com prata se fundamenta na necessidade de confirmação da pureza da proteína, visto que

esta metodologia de coloração é cerca de cinquenta vezes mais sensível que a coloração com coomassie (Bio-Rad[®] Silver Stain).

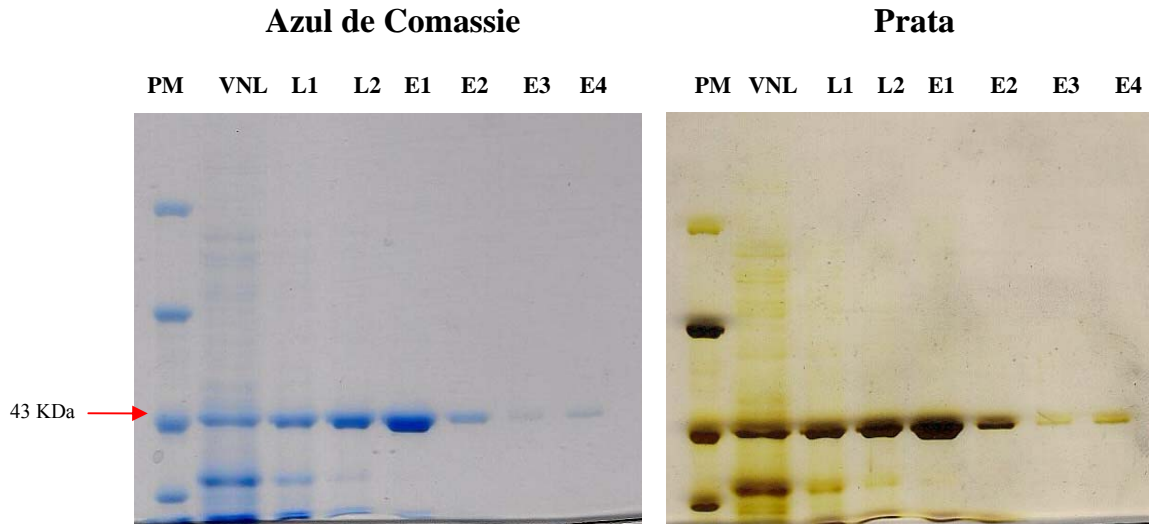


Figura 15 – Purificação em coluna de afinidadeda da proteína heteróloga E-NTPDase-2 de *L. major*. Uma amostra contendo 15 μ L de cada passo da purificação foi aplicada em cada uma das canaletas. **15.1)** PM) Padrão de tamanho molecular Unstained Protein Molecular Weight marker; VNL) Volume não ligado; L1 e L2) Lavagens; E1, E2, E3, E4) Eluições. A visualização das bandas do gel de SDS-PAGE 10% se deu pela coloração com Azul de Coomassie e com Prata.

5.3 - Análise protéica por *Western blot*

Western blot foi feito empregando-se a proteína E-NTPDase-2 de *L. major* purificada, o volume não ligado onde se encontrava a proteína junto a outras que não interagiram com a coluna de níquel, o lisado celular de BL-21 transformada com o DNA recombinante e induzidas com IPTG, e o lisado de células competentes BL-21 não transformadas, para averiguação da expressão da proteína heteróloga E-NTPDase-2 de *L. major*. Como anticorpo primário foi utilizado um anticorpo monoclonal anti-poli-histidina produzido em camundongo (Sigma[®]). Os resultados são observados na figura 16.

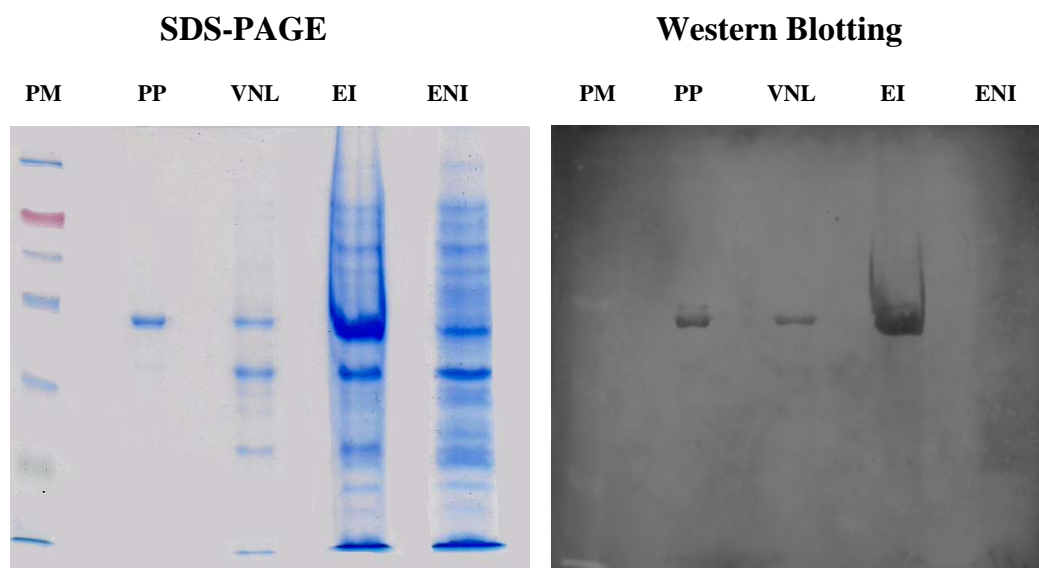


Figura 16 – Western blot. Em cada uma das canaletas foi adicionado 15 μ L de amostra. A proteína pura foi obtida da purificação em coluna de afinidade, bem como, o volume não ligado. O extrato celular induzido e não induzido foram primeiramente sonificados para que pudessem ser utilizados no SDS-PAGE. Gel de SDS-PAGE 10%, complementar ao gel do *Western blot*. PM) Peso molecular: Color Plus Prestained Protein Marker (Biolab).; PP) Proteína pura; VNL) Volume não ligado E1) Extrato celular induzido; E2) Extrato celular não induzido.

Fica claro o reconhecimento específico da proteína E-NTPDase-2 de *L. major* pelo anticorpo monoclonal anti-poli-histidina permitindo inferir que a proteína foi expressa de forma correta, ou seja, traduzida no *frame* de leitura correto, uma vez que o vetor pET-21b insere uma cauda de 6 resíduos de histidina na porção N-terminal da proteína heteróloga.

5.4 Imunização dos camundongos BALB/c

Os camundongos BALB/c foram inoculados pela via subcutânea, de acordo com Harlow e Lane (1988a). Na primeira inoculação foi utilizado 60 μ g da E-NTPDase-2 recombinante pura e para as imunizações seguintes foram

utilizadas 20µg. A determinação do volume a ser inoculado em cada camundongo levou em consideração as concentrações protéicas determinadas pelo método de Bradford. Assim, foi possível determinar o volume necessário de cada emulsão (E-NTPDase-2 + adjuvante de Freud) para a inoculação dos animais.

Foi realizado um DOT-ELISA para averiguação da resposta imune humoral contra a proteína E-NTPDase-2 recombinante. Foi utilizando o soro dos animais após a terceira imunização. Como controle negativo, empregou-se o mix do soro pré-imune obtido anteriormente a primeira inoculação da proteína. Os cinco animais imunizados responderam de forma satisfatória as imunizações como pode ser observado na figura 17.

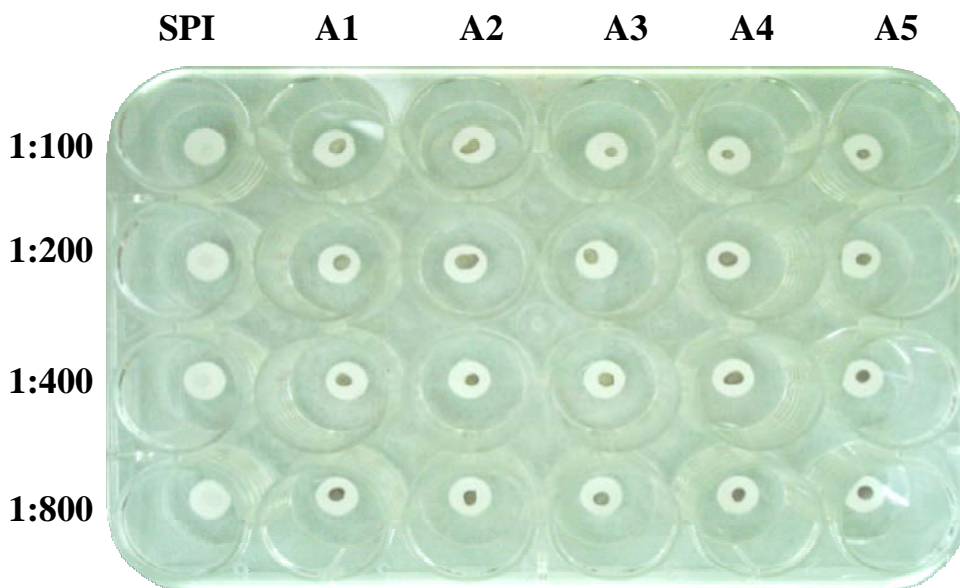


Figura 17 – DOT-ELISA do soro dos camundongos imunizados com a proteína E-NTPDase-2 de *L. major*. SPI) Mix do soro pré-imune dos camundongos; A1, A2, A3, A4 e A5) Soro dos animais 1, 2, 3, 4, e 5 respectivamente, após a inoculação.

5.5- Titulação do soro hiperimune

Uma vez que todos os animais responderam bem as imunizações, o animal 1 foi sacrificado para a obtenção dos linfócitos produtores de anticorpos que foram utilizados para realização do experimento de fusão. O sangue do animal foi utilizado para a obtenção do soro hiperimune.

A titulação do soro demonstrou que o esquema de imunizações resultou em uma excelente resposta imune humoral contra a proteína E-NTPDase-2 de *L. major*, podendo-se observar o reconhecimento dos anticorpos policlonais contra a proteína previamente fixada em membrana de nitrocelulose, em um título de 1:160000 no DOT-ELISA, como observado na figura 18. Os poços referentes à diluição de 1:100; 1:200 e 1:400 do soro pré-imune revelaram um discreto *background*, o que pode ser explicado pela baixa diluição do soro nestes poços, podendo ter acontecido ligações cruzadas. Desta maneira adotou-se título de 1:40000 para os testes futuros em que esse soro foi empregado.

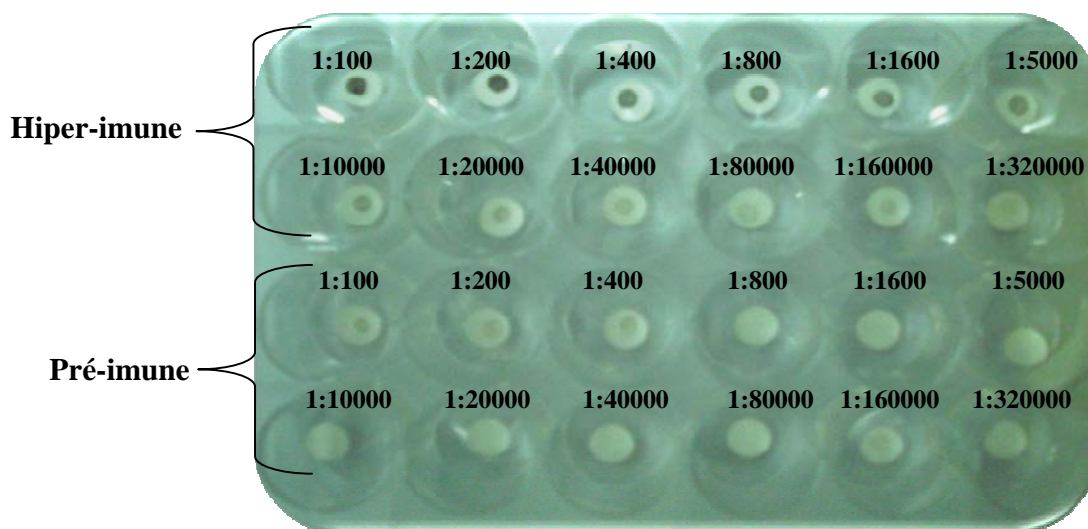


Figura 18 – DOT-ELISA da titulação do soro. DOT-ELISA da titulação do soro hiperimune dos camundongos BALB/c imunizados com a proteína E-NTPDase-2 de *L. major* e titulação do mix do soro pré-imune dos camundongos BALB/c.

5.6- Produção dos hibridomas produtores de anticorpos monoclonais

O grande interesse na utilização dos anticorpos monoclonais se fundamenta em uma enorme potencialidade de emprego desta ferramenta imunológica nos mais variados campos da pesquisa, tais como estudos relacionados à epidemiologia da *Leishmania*, desenvolvimento de testes diagnósticos além de serem considerados promissores candidatos vacinais. Entretanto há de se ressaltar a complexidade existente no cultivo de células híbridas, o que se tornou um desafio momentâneo no prosseguimento deste trabalho para a produção dos anticorpos monoclonais contra a proteína E-NTPDase-2 de *L. major*.

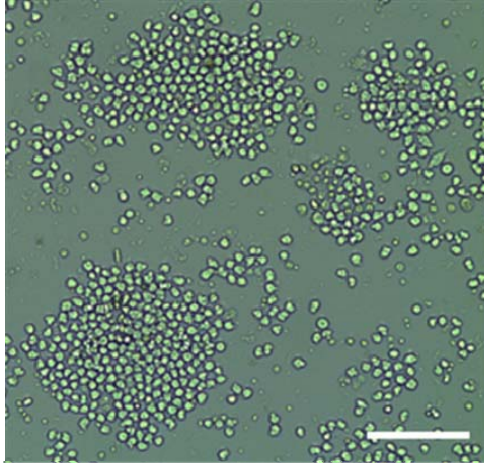
Estudos desenvolvidos por Norsworthy e colaboradores (2004) utilizando anticorpos monoclonais permitiram a seleção negativa da forma metacíclica do parasito *L. amazonensis* a partir da aglutinação desses anticorpos a formas procíclicas indiferenciadas.

Outro bom exemplo da aplicabilidade dos anticorpos monoclonais, relacionados a E-NTPDase, foi descrito por Tan e colaboradores (2010) em estudos desenvolvidos com o parasito *T. gondii*. Eles observaram que camundongos pré-imunizados com o anticorpo anti-NTPDase apresentaram uma sobrevivência significativa em comparação com grupo controle não imunizado, o que indica que estes anticorpos podem ser potenciais ferramentas vacinais.

5.6.1 - Cultivo do mieloma

O cultivo das células de mieloma da série plasmocitária não secretoras de imunoglobulinas (SP2/0) (Shulman, Wilde *et al.*, 1978) procedeu-se de forma satisfatória, com a obtenção de células em ótimo estado para utilização nos passos subseqüentes. As figuras 19.1 e 19.2 mostram fotos obtidas em microscópio invertido. Nota-se o crescimento em grupos, característico destas células.

(19.1)



(19.2)

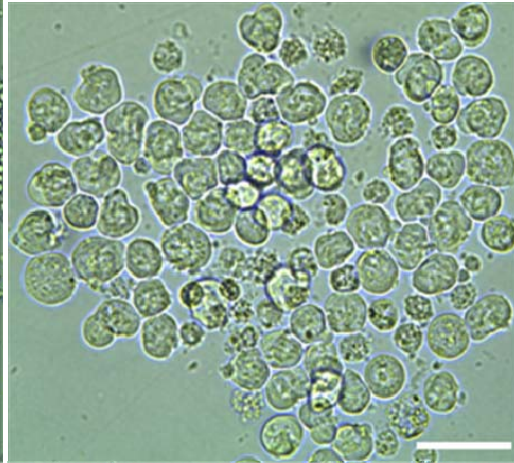


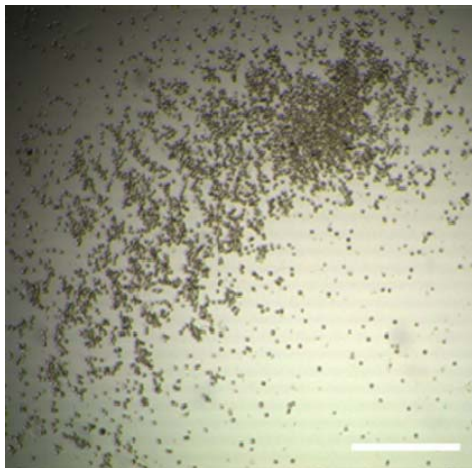
Figura 19: Mieloma. Foto das células de mieloma cultivadas em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino. **19.1)** Aumento de 10x. Barra = 0,4 milímetros; **19.2)** Aumento de 40x. Barra = 0,1 milímetros.

5.6.2- Fusão

Foi realizada uma fusão bem sucedida, demonstrando crescimento inicial dos hibridomas e eliminação das células que não apresentaram um padrão de fusão correto bem como as não fusionadas durante o período de utilização do meio seletivo HAT.

Abaixo, podemos observar nas figuras 20.1 e 20.2 a fotografia de um poço com hibridomas no 15^o dia, último dia da utilização do meio seletivo HAT-RPMI. Após este dia foram feitas duas trocas de meio utilizando HT-RPMI para que as células se adaptassem a nova condição do meio. Logo após, iniciou-se a utilização apenas do meio RPMI com 10% de soro fetal bovino.

(20.1)



(20.2)

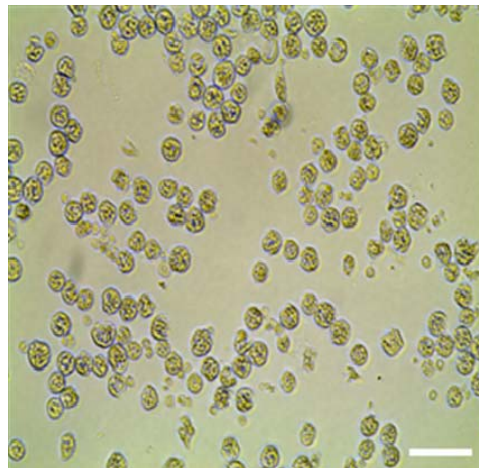


Figura 20: Hibridoma. Foto das células de hibridomas cultivadas em meio HAT-RPMI com 10% de soro fetal bovino no 15º dia. **20.1)** Aumento de 4x. Barra = 1 milímetro; **20.2)** Aumento de 20X. Barra = 02, milímetros.

No 15º dia foram coletados os sobrenadantes da cultura de hibridomas e procedeu-se o ensaio de imunoadsorção indireta (ELISA) para seleção dos poços produtores dos anticorpos monoclonais contra a proteína E-NTPDase-2 recombinante de *L. major*. A figura 21 mostra o resultado do ELISA, onde podemos observar que cinco poços apresentaram valores de absorvância superiores ao *cut off* (0,072), o que nos levou a concluir que estes eram poços contendo hibridomas produtores de anticorpos monoclonais contra a proteína de interesse.

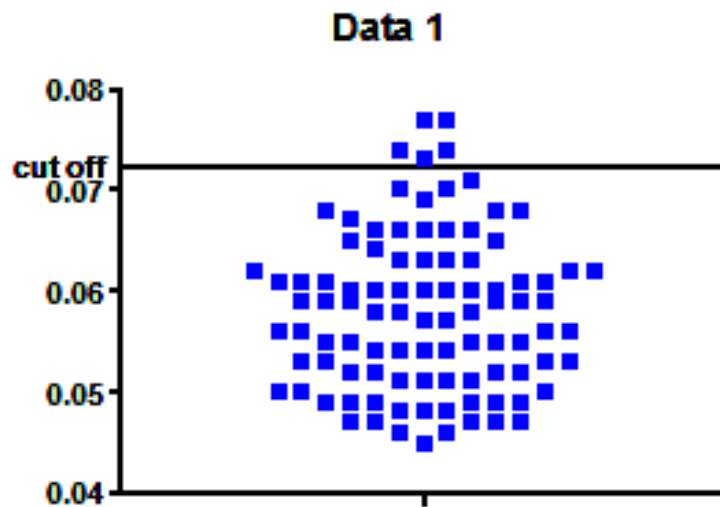


Figura 21: Ensaio de ELISA. Grafico de ELISA para o sobrenadante do cultivo de hibridomas.

Infelizmente após a retirada do meio seletivo HAT-RPMI com 10% de soro fetal bovino e inicio do uso do meio RPMI com 10% de soro fetal bovino, os hibridomas estagnaram o seu crescimento, sendo possível apenas a manutenção dos mesmos em bom estado.

6. Conclusões

Após análise detalhada dos resultados obtidos nesta dissertação podemos concluir que:

Os *primers* desenhados foram capazes de reconhecer e amplificar a região gênica correspondente a E-NTPDase-2 de *L. major*.

As clonagens e a indução da expressão se procederam de forma adequada que possibilitou a obtenção da proteína E-NTPDase-2 de *L. major*.

Foi possível a obtenção da proteína E-NTPDase-2 de *L. major* purificada por cromatografia de afinidade, evidenciando a correta inserção da cauda de histidina pelo vetor pET-21b.

Os camundongos BALB/c imunizados apresentaram resposta imune humoral contra a E-NTPDase-2 de *L. major*.

A obtenção dos hibridomas produtores de anticorpos monoclonais foi satisfatória e confirmada.

6.1- Perspectivas futuras

Temos como perspectivas futuras a seleção dos hibridomas produtores dos anticorpos monoclonais por diluição limitante, bem como a otimização da produção dos anticorpos monoclonais pelos hibridomas selecionados, seja por adição de fatores de crescimento celular ao meio de cultivo ou pela indução de ascite em camundongos.

Outra proposta que temos é a de realizar ensaios de imunofluorescência para a identificação da localização intracelular do parasito em células infectadas *in vitro* assim como para a imunolocalização da proteína no parasito.

Será realizada a retirada da porção constante do anticorpo monoclonal por hidrólise para utilização da porção variável em ensaios de infectividade no qual iremos induzir infecção *in vitro* em macrófago pelo parasito *L. major* pré-incubado com os anticorpos monoclonais selecionados.

Temos também como perspectivas a realização de testes de atividade enzimática da proteína E-NTPDase-2 de *L. major* na presença dos anticorpos monoclonais para averiguação de sua influência.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas A.K, Linchtman. A. H., Pober, J.S.; **Imunologia celular e molecular**. Elsevier, p.580. 2005.

Aguilar-Be, I., R. Da Silva Zardo, E. Paraguai De Souza, G. P. Borja-Cabrera, M. Rosado-Vallado, M. Mut-Martin, R. Garcia-Miss Mdel, C. B. Palatnik De Sousa e E. Dumonteil. Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v.73, n.2, Feb, p.812-9. 2005.

Almeida, M. A., E. E. Jesus, M. L. Sousa-Atta, L. C. Alves, M. E. Berne e A. M. Atta. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v.127, n.3-4, Feb 28, p.227-32. 2005.

Alvar, J., R. Molina, M. San Andres, M. Tesouro, J. Nieto, M. Vitutia, F. Gonzalez, M. D. San Andres, J. Boggio, F. Rodriguez. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.88, n.4, Aug, p.371-8. 1994.

Alves, W. A. e P. D. Bevilacqua. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v.20, n.1, Jan-Feb, p.259-65. 2004.

Andrade, A. M., L. H. Queiroz, G. R. Nunes, S. H. Perri e C. M. Nunes. Dog replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.5, Sep-Oct, p.594-5. 2007.

Anthony, R. L., M. Grogl, J. B. Sacci e R. W. Ballou. Rapid detection of *Leishmania* amastigotes in fluid aspirates and biozsies of human tissues. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.37, n.2, Sep, p.271-6. 1987.

Asai, T., S. Miura, L. D. Sibley, H. Okabayashi e T. Takeuchi. Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, n.19, May 12, p.11391-7. 1995.

Ashford, D. A., M. Bozza, M. Freire, J. C. Miranda, I. Sherlock, C. Eulalio, U. Lopes, O. Fernandes, W. Degrave, R. H. Barker, Jr. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.53, n.3, Sep, p.251-5. 1995.

Aviles, H., A. Belli, *et al.* PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. **Journal of Parasitology**, v.85, n.2, Apr, p.181-7. 1999.

Baginski, M., K. Sternal, J. Czub e E. Borowski. Molecular modelling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic. **Acta Biochimica Polonica**, v.52, n.3, p.655-8. 2005.

Barros, D. M. ELISA e DOT-ELISA para a detecção de anticorpos para o vírus da doença infecciosa bursal. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)** Departamento de Veterinária. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2001.

Barros, F. S., L. F. De Menezes, A. A. Pinheiro, E. F. Silva, A. H. Lopes, W. De Souza e J. R. Meyer-Fernandes. Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in *Entamoeba histolytica*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.375, n.2, Mar 15, p.304-14. 2000.

Barski, G., S. Sorieul e F. Cornefert. Production of cells of a "hybrid" nature in cultures in vitro of 2 cellular strains in combination. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences**, v.251, Oct 24, p.1825-7. 1960.

Berreto-Pinho, M., C. E. Peres-Sampaio, P. P. Chispim, R. Belmont-Firpo, A. P. Lemos, A. Martiny, M. A. Vannier-Santos e J. R. Meyer-Fernandes. A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.391, n.1, Jul 1, p.16-24. 2001.

Bertholet, S., H. L. Dickensheets, F. Sheikh, A. A. Gam, R. P. Donnelly e R. T. Kenney. *Leishmania donovani*-induced expression of suppressor of cytokine signaling 3 in human macrophages: a novel mechanism for intracellular parasite suppression of activation. **Infection and Immunity**, v.71, n.4, Apr, p.2095-101. 2003.

Bhattacharya, S. K., D. Sur e J. Karbwang. Childhood visceral leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, v.123, n.3, Mar, p.353-6. 2006.

Bisaggio, D. F., C. E. Peres-Sampaio, J. R. Meyer-Fernandes e T. Souto-Padron. Ecto-ATPase activity on the surface of *Trypanosoma cruzi* and its possible role in the parasite-host cell interaction. **Parasitology Research**, v.91, n.4, Oct, p.273-82. 2003.

Bours, M. J., E. L. Swennen, F. Di Virgilio, B. N. Cronstein e P. C. Dagnelie. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in

immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v.112, n.2, Nov, p.358-404. 2006.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. **Analytical biochemistry**, v.72, p.248-254. 1976.

Brandonisio, O., R. Spinelli e M. Pepe. Dendritic cells in *Leishmania* infection. **Microbes and Infection**, v.6, n.15, Dec, p.1402-9. 2004.

Bryceson, A. Tropical medicine for the 21st century. Tropical medicine should be concerned with medical problems endemic to the tropics. **British Medical Journal**, v.312, n.7025, Jan 27, p.247. 1996.

Buates, S. e G. Matlashewski. General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection. **Journal of Immunology**, v.166, n.5, Mar 1, p.3416-22. 2001.

Cardoso, L., H. D. Schallig, A. Cordeiro-Da-Silva, M. Cabral, J. M. Alunda e M. Rodrigues. Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.117, n.1-2, May 15, p.35-41. 2007.

Carrillo, E., S. Ahmed, K. Goldsmith-Pestana, J. Nieto, Y. Osorio, B. Travi, J. Moreno e D. McMahon-Pratt. Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v.25, n.8, Feb 9, p.1534-43. 2007.

Carson, C., R. J. Quinnell, M. J. Day e O. Courtenay. Comparison of monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of canine IgG1 and IgG2, and associations with infection outcome in *Leishmania infantum* naturally infected dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.133, n.2-4, Feb 15, p.264-8. 2010.

Carvalho, G. M., J. D. Andrade Filho, A. L. Falcao, A. C. Rocha Lima e C. M. Gontijo. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v.8, n.3, Jun, p.407-14. 2008.

Castilho, T. M., J. J. Shaw e L. M. Floeter-Winter. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.2, Feb, p.540-6. 2003.

Chaves, C. S., D. C. Soares, R. P. Da Silva e E. M. Saraiva. Characterization of the species- and stage-specificity of two monoclonal antibodies against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v.103, n.3-4, Mar-Apr, p.152-9. 2003.

Cortes, S., N. Rolao, J. Ramada e L. Campino. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.98, n.1, Jan, p.12-7. 2004.

Costa, C. H. Characterization and speculations on the urbanization of visceral Leishmaniasis in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v.24, p.2959 - 2963. 2008.

Costa, C. H., C. M. Tapety e G. L. Werneck. Control of visceral leishmaniasis in urban areas: randomized factorial intervention trial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.4, Jul-Aug, p.415-9. 2007.

Costa, J. M. L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v.75, p.1-17. 2005.

Courtenay, O., R. J. Quinnell, L. M. Garcez, J. J. Shaw e C. Dye. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **Journal of Infectious Diseases**, v.186, n.9, Nov 1, p.1314-20. 2002.

Coutinho-Silva, R., C. Monteiro Da Cruz, P. M. Persechini e D. M. Ojcius. The role of P2 receptors in controlling infections by intracellular pathogens. **Purinergic Signal**, v.3, n.1-2, Mar, p.83-90. 2007.

Croft, S. L. e G. H. Coombs. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends of Parasitology**, v.19, n.11, Nov, p.502-8. 2003.

Croft, S. L., K. Seifert e V. Yardley. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, v.123, n.3, Mar, p.399-410. 2006.

Cupolillo, E., G. Grimaldi, Jr. e H. Momen. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.50, n.3, Mar, p.296-311. 1994.

Cupolillo, E., G. Grimaldi, Jr. e H. Momen. Discriminatory ability of typing systems in *Leishmania*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.87, n.1, Jan-Feb, p.116-7. 1993.

Dantas-Torres, F. e S. P. Brandao-Filho. Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.4, Jul-Aug, p.352-6. 2006.

Day, M. J. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniasis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. **Veterinary Parasitology**, v.147, n.1-2, Jun 20, p.2-8. 2007.

De Almeida Marques-Da-Silva, E., J. C. De Oliveira, A. B. Figueiredo, D. De Souza Lima Junior, C. M. Carneiro, J. L. Rangel Fietto e L. C. Crocco Afonso. Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. **Microbes and Infection**, v.10, n.8, Jul, p.850-7. 2008.

De Carvalho, M. R., B. S. Lima, J. F. Marinho-Junior, F. J. Da Silva, H. F. Valenca, A. Almeida Fde, A. L. Da Silva e S. P. Brandao-Filho. Phlebotomine sandfly species from an American visceral leishmaniasis area in the Northern Rainforest region of Pernambuco State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v.23, n.5, May, p.1227-32. 2007.

De Jesus, J. B., A. A. De Sa Pinheiro, A. H. Lopes e J. R. Meyer-Fernandes. An ectonucleotide ATP-diphosphohydrolase activity in *Trichomonas vaginalis* stimulated by galactose and its possible role in virulence. **Z Naturforsch C**, v.57, n.9-10, Sep-Oct, p.890-6. 2002.

De Pita-Pereira, D., M. A. Cardoso, C. R. Alves, R. P. Brazil e C. Britto. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica**, v.107, n.1, Jul, p.66-9. 2008.

De Souza, E. P., A. P. Esteves Pereira, F. C. Machado, M. F. Melo, T. Souto-Padron, M. Palatnik e C. B. Palatnik-De-Sousa. Occurrence of *Leishmania donovani* parasitemia in plasma of infected hamsters. **Acta Tropica**, v.80, n.1, Sep 1, p.69-75. 2001.

De Souza, M. C., E. A. De Assis, R. S. Gomes, E. D. Marques Da Silva, M. N. Melo, J. L. Fietto e L. C. Afonso. The influence of ecto-nucleotidases on *Leishmania amazonensis* infection and immune response in C57B/6 mice. **Acta Tropica**, Apr 24. 2010.

Deane, M. P. e L. M. Deane. Experimental *Phlebotomus longipalpis* infection in a human case of visceral leishmaniasis. **Hospital (Rio J)**, v.46, n.5, Nov, p.487-9. 1954.

Di Virgilio, F. Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. **Purinergic Signal**, v.1, n.3, Sep, p.205-9. 2005.

Di Virgilio, F. Purinergic signalling in the immune system. A brief update. **Purinergic Signal**, v.3, n.1-2, Mar, p.1-3. 2007.

Duarte, M. I. S. Patologia das principais doenças tropicais no Brasil. Leishmaniose (calazar). **Bogliolo Patologia**, v.6 ed, p.1215-1275. 2000.

Dye, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.55, n.2, Aug, p.125-30. 1996.

El Kouni, M. H. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. **Pharmacology & Therapeutics**, v.99, n.3, Sep, p.283-309. 2003.

Engwerda, C. R., M. Ato e P. M. Kaye. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v.20, n.11, Nov, p.524-30. 2004.

Fernandez-Perez, F. J., S. Mendez, C. De La Fuente, M. Cuquerella, M. T. Gomez e J. M. Alunda. Value of Western blotting in the clinical follow-up of canine leishmaniasis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** , v.11, n.2, Mar, p.170-3. 1999.

Ferreira Ede, C., M. De Lana, M. Carneiro, A. B. Reis, D. V. Paes, E. S. Da Silva, H. Schallig e C. M. Gontijo. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology**, v.146, n.3-4, May 31, p.235-41. 2007.

Ferroglio, E., E. Centaro, W. Mignone e A. Trisciuglio. Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and *Western blot*. **Veterinary Parasitology**, v.144, n.1-2, Mar 15, p.162-6. 2007.

Ferroglio, E., Trisciuglio, A., Gastaldo, S., Mignone, W., Delle Piane, M. Comparison of ELISA IFAT and Western blot for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog. **Parasitologia**. 2002.

Fietto, J. L., R. Demarco, I. P. Nascimento, I. M. Castro, T. M. Carvalho, W. De Souza, M. T. Bahia, M. J.Alves e S.Verjovski-Almeida. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.316, n.2, Apr 2, p.454-60. 2004.

Fischer, M. T., S. Reinel Die. kutane Leishmaniose in der Erfahrungen aus Afghanistan und dem brasilianischen Amazonasgebiet. **Website Bernhard-Nocht-Institut**. . 2010.

Gavron D, S. A. Pioneer of tropical medicine. **Rehovot,Israel: Balaban Publishers**. 1997.

Gómez, S. Y. M. Produção de clones secretores de anticorpos (IgG) contra o vírus da doença infecciosa bursal. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)**, Departamento de Veterinária. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2007.

Gontijo, B. e L. De Carvalho Mde. American cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.1, Jan-Feb, p.71-80. 2003.

Gounaris, K. Nucleotidase cascades are catalyzed by secreted proteins of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. **Infection and Immunity**, v.70, n.9, Sep, p.4917-24. 2002.

Grimaldi, G., Jr. e R. B. Tesh. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v.6, n.3, Jul, p.230-50. 1993.

Grimaldi, G., Jr., R. B. Tesh e D. McMahon-Pratt. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.41, n.6, Dec, p.687-725. 1989.

Grimaldi, G. e D. McMahon-Pratt. Monoclonal antibodies for the identification of New World *Leishmania* species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.91, n.1, Jan-Feb, p.37-42. 1996.

Gurunathan, S., D. L. Sacks, D. R. Brown, S. L. Reiner, H. Charest, N. Glaichenhaus e R. A. Seder. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. **Journal of Experimental Medicine**, v.186, n.7, Oct 6, p.1137-47. 1997.

Handa, M. e G. Guidotti. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.218, n.3, Jan 26, p.916-23. 1996.

Harlow, E.D.L. **Antibody a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, p.726. 1988.

Harms, G. Leishmaniosen. **Dermatologische Infektiologie**, p.521-530. 2003.

Herwaldt, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v.354, n.9185, Oct 2, p.1191-9. 1999.

Hunsucker, S. A., B. S. Mitchell e J. Spsychala. The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. **Pharmacology & Therapeutics**, v.107, n.1, Jul, p.1-30. 2005.

Iniesta, L., M. Gallego e M. Portus. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.103, n.1-2, Jan 10, p.77-81. 2005.

Iniesta, L., M. Gallego e M. Portus. Idiotype expression of IgG1 and IgG2 in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.119, n.3-4, Oct 15, p.189-97. 2007.

Inoue, H., H. Nojima e H. Okayama. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v.96, n.1, Nov 30, p.23-8. 1990.

Jardim, A., D. L. Tolson, S. J. Turco, T. W. Pearson e R. W. Olafson. The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan T lymphocyte-reactive component is a tightly associated protein complex. **Journal of Immunology**, v.147, n.10, Nov 15, p.3538-44. 1991.

Joshi, P. B., B. L. Kelly, S. Kamhawi, D. L. Sacks e W. R. McMaster. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.120, n.1, Mar, p.33-40. 2002.

Kalks, K. H. M. Produção de anticorpos monoclonais anti-SBm7462. **Monografia**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Viçosa. 2008.

Kelly, B. L., D. B. Stetson, *et al.* *Leishmania major* LACK antigen is required for efficient vertebrate parasitization. **Journal of Experimental Medicine**, v.198, n.11, Dec 1, p.1689-98. 2003.

Khamesipour, A., S. Rafati, N. Davoudi, F. Maboudi e F. Modabber. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. **Indian Journal of Medical Research**, v.123, n.3, Mar, p.423-38. 2006.

Köhler, G. M., C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v.256, p.495-497. 1975.

Lachaud, L., S. Marchergui-Hammami, E. Chabbert, J. Dereure, J. P. Dedet e P. Bastien. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.1, Jan, p.210-5. 2002.

Lainson, R. e E. F. Rangel. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.8, Dec, p.811-27. 2005.

Lainson, R., Shaw, J.J. New World leishmaniasis. **Microbiology and Microbial Infections**, p. 313–349. 2005.

Langston, H. P., Y. Ke, A. T. Gewirtz, K. E. Dombrowski e J. A. Kapp. Secretion of IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4, by antigen-specific T cells requires

extracellular ATP. **Journal of Immunology**, v.170, n.6, Mar 15, p.2962-70. 2003.

Leontides, L. S., M. N. Saridomichelakis, C. Billinis, V. Kontos, A. F. Koutinas, A. D. Galatos e M. E. Mylonakis. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Veterinary Parasitology**, v.109, n.1-2, Oct 16, p.19-27. 2002.

Lima, A. M. C. Desenvolvimento e padronização de ensaios imunoenzimáticos ELISA e DOT-ELISA para a detecção de anticorpos anti-pneumovírus aviário. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) Departamento de Veterinária. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1998.

Little, M., S. M. Kipriyanov, F. Le Gall e G. Moldenhauer. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. **Immunology Today**, v.21, n.8, Aug, p.364-70. 2000.

Maioli, T. U., E. Takane, R. M. Arantes, J. L. Fietto e L. C. Afonso. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. **Parasitology research**, v.94, n.3, Oct, p.207-12. 2004.

Marques-Da-Silva, E. A., J. C. De Oliveira, A. B. Figueiredo, D. De Souza Lima Junior, C. M. Carneiro, J. L. Rangel Fietto e L. C. Crocco Afonso. Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. **Microbes and Infection**, v.10, n.8, Jul, p.850-7. 2008.

Marques, M. J., A. C. Volpini, O. Genaro, W. Mayrink e A. J. Romanha. Simple form of clinical sample preservation and *Leishmania* DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.65, n.6, Dec, p.902-6. 2001.

Mazza, G., W. P. Duffus, *et al.* Mazza, G., W. P. Duffus, C. J. Elson, C. R. Stokes, A. D. Wilson e A. H. Whiting. The separation and identification by monoclonal antibodies of dog IgG fractions. **Journal of Immunology Methods**, v.161, n.2, May 26, p.193-203. 1993.

Mcmahon-Pratt, D. e J. Alexander. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? **Immunological Reviews**, v.201, Oct, p.206-24. 2004.

Meyer-Fernandes, J. R., P. M. Dutra, C. O. Rodrigues, J. Saad-Nehme e A. H. Lopes. Mg-dependent ecto-ATPase activity in *Leishmania tropica*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.341, n.1, May 1, p.40-6. 1997.

Meyer-Fernandes, J. R., J. Saad-Nehme, C. E. Peres-Sampaio, R. Belmont-Firpo, D. F. Bisaggio, L. C. Do Couto, A. L. Fonseca De Souza, A. H. Lopes e T. Souto-Padron. A Mg-dependent ecto-ATPase is increased in the infective stages of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology research**, v.93, n.1, May, p.41-50. 2004.

Mohebbali, M., M. Taran e Z. Zarei. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination. **Veterinary Parasitology**, v.121, n.3-4, May 26, p.239-45. 2004.

Molyneux, D. H. K.-K., R. Morphology, ultrastructure and life Cycle. **The Leishmaniases in Biology and Medicine**, p.1-119. 1987.

Munkonda, M. N., J. Pelletier, V. V. Ivanenkov, M. Fausther, A. Tremblay, B. Kunzli, T. L. Kirley e J. Sevigny. Characterization of a monoclonal antibody as the first specific inhibitor of human NTP diphosphohydrolase-3. **Federation of European Biochemical Societies**, v.276, n.2, Jan, p.479-496. 2009.

Murray, H. W., J. D. Berman, *et al.* Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v.366, n.9496, Oct 29-Nov 4, p.1561-77. 2005.

Nakaar, V., B. U. Samuel, E. O. Ngo e K. A. Joiner. Targeted reduction of nucleoside triphosphate hydrolase by antisense RNA inhibits *Toxoplasma gondii* proliferation. **Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.8, Feb 19, p.5083-7. 1999.

Neuber, H. Leishmaniasis. **Journal of the German Society of Dermatology**, v.6, n.9, Sep, p.754-65. 2008.

Norsworthy, N. B., J. Sun, D. Elnaiem, G. Lanzaro e L. Soong. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. **Infection and Immunity**, v.72, n.3, Mar, p.1240-7. 2004.

Nunes, C. M., M. M. Pires, K. M. Da Silva, F. D. Assis, J. Goncalves Filho e S. H. Perri. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. **Veterinary Parasitology**, v.170, n.1-2, May 28, p.131-3. 2010.

Palatnik-De-Sousa, C. B. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. **Vaccine**, v.26, n.14, Mar 25, p.1709-24. 2008.

Palatnik-De-Sousa, C. B., I. Silva-Antunes, A. Morgado Ade, I. Menz, M. Palatnik e C. Lavor. Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune in Brazilian endemic areas. **Vaccine**, v.27, n.27, Jun 2, p.3505-12. 2009.

Palatnik, C. B., R. Borojevic, J. O. Previato e L. Mendonca-Previato. Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote internalization into murine macrophages by chemically defined parasite glycoconjugate ligands. **Infection and Immunity**, v.57, n.3, Mar, p.754-63. 1989.

Pearson, R. D. Pathology of Leishmaniasis. **Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections**. 3 ed., Oxford.Blackwell Scientific publications, p.71-86. 1993.

Pinheiro, C. M., E. S. Martins-Duarte, R. B. Ferraro, A. L. Fonseca De Souza, M. T. Gomes, A. H. Lopes, M. A. Vannier-Santos, A. L. Santos e J. R. Meyer-Fernandes. Biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. **Experimental Parasitology**, v.114, n.1, Sep, p.16-25. 2006.

Potter, M. Immunoglobulin-producing tumors and myeloma proteins of mice. **Physiological Reviews**, v.52, n.3, Jul, p.631-719. 1972.

Qi, H., V. Popov e L. Soong. *Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions in vitro and the priming of parasite-specific CD4(+) T cells in vivo. **Journal of Immunology**, v.167, n.8, Oct 15, p.4534-42. 2001.

Ramos, I., A. Alonso, J. M. Marcen, A. Peris, J. A. Castillo, M. Colmenares e V. Larraga. Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. **Vaccine**, v.26, n.3, Jan 17, p.333-44. 2008.

Ray, M., A. A. Gam, R. A. Boykins e R. T. Kenney. Inhibition of interferon-gamma signaling by *Leishmania donovani*. **Journal of Infectious Diseases**, v.181, n.3, Mar, p.1121-8. 2000.

Reithinger, R., R. J. Quinnell, B. Alexander e C. R. Davies. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.7, Jul, p.2352-6. 2002.

Rey, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 2002.

Robson, S. C., J. Seigny e H. Zimmermann.. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signal**, v.2, n.2, Jun, p.409-30. 2006.

Rocha, F. T. R. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra a glicoproteína S1 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)** - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2000.

Sacks, D. e N. Noben-Trauth. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology** , v.2, n.11, Nov, p.845-58. 2002.

Sacks, D. e A. Sher. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**, v.3, n.11, Nov, p.1041-7. 2002.

Salman, S. M., N. G. Rubeiz e A. G. Kibbi.. Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis. **Clinics in Dermatology**, v.17, n.3, May-Jun, p.291-6. 1999.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. **Molecular cloning. A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Pr. 1987.

Sambrook, J. e D. W. Russel. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. In: (Ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory, v.3, 2001. Molecular Cloning: a laboratory manual., p.18-49

Sanger, F. N., S.; Coulson, A. R. DNA Sequence with chain-termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.74, p.5463-5467. 1977.

Sanger institute. Disponivel em: <http://www.sanger.ac.uk/Projects/L_major/>; acessado em 10 de julho de 2010.

Sansom, F. M., S. C. Robson e E. L. Hartland. Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions. **Microbiology Microbiology and Molecular Biology Reviews** , v.72, n.4, Dec, p.765-81, Table of Contents. 2008.

Santos, R. F., M. A. Possa, et al. Influence of Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence. **PLoS neglected tropical diseases** , v.3, n.3, p.e387. 2009.

Santos, M. A., R. C. Marques, C. A. Farias, D. M. Vasconcelos, J. M. Stewart, D. L. Costa e C. H. Costa. Predictors of an unsatisfactory response to pentavalent antimony in the treatment of American visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.6, Nov-Dec, p.629-33. 2002.

Schulz, A., K. Mellenthin, G. Schonian, B. Fleischer e C. Drosten. Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic *leishmania* organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.4, Apr, p.1529-35. 2003.

Shulman, M., C. D. Wilde e G. Kohler. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. **Nature**, v.276, n.5685, Nov 16, p.269-70. 1978.

Silva, O. A., P. B. Silva, O. V. Silva, G. M. Braga, A. Albuquerque Junior, V. Queiros Neto, M. E. Rocha e E. F. Silva. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: epidemiological aspects. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, v.100, n.1, Feb, p.49-50. 2007.

Singh, S. e R. Sivakumar. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.10, n.6, Dec, p.307-15. 2004.

Smith, T. M. e T. L. Kirley. Site-directed mutagenesis of a human brain ecto-pyrase: evidence that the E-type ATPases are related to the actin/heat shock 70/sugar kinase superfamily. **Biochemistry**, v.38, n.1, Jan 5, p.321-8. 1999.

Tan, F., X. Hu, C. W. Pan, J. Q. Ding e X. G. Chen. Monoclonal antibodies against nucleoside triphosphate hydrolase-II can reduce the replication of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology International**, v.59, n.2, Jun, p.141-6. 2010.

Terabe, M., T. Kuramochi, M. Ito, T. Hatabu, C. Sanjoba, K. P. Chang, T. Onodera e Y. Matsumoto. CD4(+) cells are indispensable for ulcer development in murine cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v.68, n.8, Aug, p.4574-7. 2000.

Tesh, R. Control of zoonotic visceral leishmaniasis. Is it time to change strategies? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v.52. 1995.

Thakur, C. P., S. Narayan e A. Ranjan. Epidemiological, clinical & pharmacological study of antimony-resistant visceral leishmaniasis in Bihar, India. **Indian Journal of Medical Research**, v.120, n.3, Sep, p.166-72. 2004.

Werneck, G. L., M. S. Batista, J. R. Gomes, D. L. Costa e C. H. Costa. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Infection**, v.31, n.3, Jun, p.174-7. 2003.

World Health Organization WHO/OMS. Disponivel em: <<http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>> Acesso em: 17 de maio de 2010.

Xu, D. e F. Y. Liew. Genetic vaccination against leishmaniasis. **Vaccine**, v.12, n.16, Dec, p.1534-6. 1994.

Yang, D. M., N. Fairweather, L. L. Button, W. R. McMaster, L. P. Kahl e F. Y. Liew. Oral Salmonella typhimurium (AroA-) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (gp63) preferentially induces T helper 1 cells and protective immunity against leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v.145, n.7, Oct 1, p.2281-5. 1990.

Zaia, D. A. M., Zaia, C.T.B.V., Lichtig, J.,. Determination of total protein by spectrophotometry: Advantages and disadvantages of proposed methods. . **Química Nova**, p.787-793. 1998.

Zebisch, M. e N. Strater. Characterization of Rat NTPDase1, -2, and -3 ectodomains refolded from bacterial inclusion bodies. **Biochemistry**, v.46, n.42, Oct 23, p.11945-56. 2007.

Zimmermann, H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. **Biochemical journal**, v.285 (Pt 2), Jul 15, p.345-65. 1992.

Zimmermann, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.362, n.4-5, Nov, p.299-309. 2000.

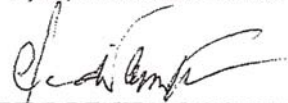
CERTIFICADO

A Comissão de Ética do DVT / UFV certifica que o processo n. ° 49/2009, intitulado “**Produção de hibridomas para obtenção de anticorpos monoclonais contra a proteína E-NTPDase2 (nucleosídeo difosfatase) de *Leishmania amazonensis***” coordenado pela Professora Juliana Lopes Range Fietto do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular está de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em 4/9/2009.

CERTIFICATE

The Ethic Committee of DVT / UFV certify that the process number 49/2009, named “Production of hibridomas to obtain monoclonal antibodies against the protein E-NTPDase2 (Nucleosides difosfatase) in *Leishmania amazonensis*” is in agreement with the Medical Veterinary Professional Ethics Code, with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and with actual Brazilian legislation. This Departmental Commission on September 4, 2009 approved this process.

Viçosa, 4 de setembro de 2009



Presidente da Comissão de Ética
Depto. de Veterinária / UFV

NTPDase GenBank	ATGCGTCCGT	ACTCCTCGGT	GCGGCGCATG	ACTCAACAAT	CGAAGCGCCT	GCGCGTCGCC	AGCACCCCTG	TGCTT	75
NTPDase Clonagem	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Consensus	ATGCGTCCGT	ACTCCTCGGT	GCGGCGCATG	ACTCAACAAT	CGAAGCGCCT	GCGCGTCGCC	AGCACCCCTG	TGCTT	
NTPDase GenBank	AGCGCGCTTG	TTATCTTCGG	TTTCCTCGTC	TACCATCAAA	GCCCTTTGTT	CTCCCCATGT	GACTCGGCCT	ACGGG	150
NTPDase Clonagem	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	24
Consensus	AGCGCGCTTG	TTATCTTCGG	TTTCCTCGTC	TACCATCAAA	GCCCTTTGTT	CTCCCCATGT	GACTCGGCCT	ACGGG	
NTPDase GenBank	AATGTATACG	ACGTCGTCAT	CGACGCTGCC	AGCATCGGCT	CACGTGTGCA	TGTATTTTCA	TACGAGCCGC	GCCGC	225
NTPDase Clonagem	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	99
Consensus	AATGTATACG	ACGTCGTCAT	CGACGCTGCC	AGCATCGGCT	CACGTGTGCA	TGTATTTTCA	TACGAGCCGC	GCCGC	
NTPDase GenBank	ACCGGTTTCG	TACTTCTGAG	AGAGCGCTTC	AAACGAGCAG	AGCCGGATCT	GTCCCTCTTC	GCCACCGACC	TGGAC	300
NTPDase Clonagem	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	174
Consensus	ACCGGTTTCG	TACTTCTGAG	AGAGCGCTTC	AAACGAGCAG	AGCCGGATCT	GTCCCTCTTC	GCCACCGACC	TGGAC	
NTPDase GenBank	GGCGCAAGG	CGTCGCTTGA	GGGGCTTCTG	CGCTTTGCGG	ATACGGTGGT	TCCGCAGAGC	TACCAGAAGT	GCACC	375
NTPDase Clonagem	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	249
Consensus	GGCGCAAGG	CGTCGCTTGA	GGGGCTTCTG	CGCTTTGCGG	ATACGGTGGT	TCCGCAGAGC	TACCAGAAGT	GCACC	
NTPDase GenBank	TCTGTCACTC	TCAAGGCCAC	CGCCGGCCCT	AGGCTCCTAC	CTGAGTCCCG	CCAGCAGGCG	CTGCTNGACG	TTGCC	450
NTPDase Clonagem	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	324
Consensus	TCTGTCACTC	TCAAGGCCAC	CGCCGGCCCT	AGGCTCCTAC	CTGAGTCCCG	CCAGCAGGCG	CTGCTNGACG	TTGCC	
NTPDase GenBank	CAGCANACAC	TCAACGCATC	TCCATNTCAG	TCTCGCGGCG	CTCCATCAT	NTCTGGCGCT	CAAGAGGGCG	TCTAC	525
NTPDase Clonagem	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	398
Consensus	CAGCANACAC	TCAACGCATC	TCCATNTCAG	TCTCGCGGCG	CTCCATCAT	NTCTGGCGCT	CAAGAGGGCG	TCTAC	
NTPDase GenBank	GGGTGGCTGA	CGGTGAACCTA	CCTGCTNGAC	AGACTCGACA	CGGACGTTGC	CACCGTCGCG	ACCATCGATA	TGGGA	600
NTPDase Clonagem	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	473
Consensus	GGGTGGCTGA	CGGTGAACCTA	CCTGCTNGAC	AGACTCGACA	CGGACGTTGC	CACCGTCGCG	ACCATCGATA	TGGGA	
NTPDase GenBank	GGCGCCTCGA	CACAGGTCGT	CTTCGAGACG	NCGCCACGCT	CTGGAGAATG	GCTGCCCTTC	AACTATGCCT	ACCA	675
NTPDase Clonagem	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	548
Consensus	GGCGCCTCGA	CACAGGTCGT	CTTCGAGACG	NCGCCACGCT	CTGGAGAATG	GCTGCCCTTC	AACTATGCCT	ACCA	
NTPDase GenBank	CTGCGCACAC	CAAAGCGCAC	GATCGCCATG	TATCAGCACA	GCTACTCTCG	CCTTGGGATG	AACGAGCGCA	AGAAG	750
NTPDase Clonagem	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	623
Consensus	CTGCGCACAC	CAAAGCGCAC	GATCGCCATG	TATCAGCACA	GCTACTCTCG	CCTTGGGATG	AACGAGCGCA	AGAAG	
NTPDase GenBank	AGGCTTATGA	CGTTGTTCCG	CGAAGCGAAC	GGGACGTTGT	CTTCCCGTGT	CTTCCCGAGA	GGTATACGA	AGCGC	825
NTPDase Clonagem	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	698
Consensus	AGGCTTATGA	CGTTGTTCCG	CGAAGCGAAC	GGGACGTTGT	CTTCCCGTGT	CTTCCCGAGA	GGTATACGA	AGCGC	
NTPDase GenBank	GTAACCGTGT	TGGAACCTTC	AAACAGTGAC	GCCACGGACT	TAAACCGGTG	TGCAGGACTA	TTTCGGGAAC	ATGTC	900
NTPDase Clonagem	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	773
Consensus	GTAACCGTGT	TGGAACCTTC	AAACAGTGAC	GCCACGGACT	TAAACCGGTG	TGCAGGACTA	TTTCGGGAAC	ATGTC	
NTPDase GenBank	ATAACAACGT	CGACCTGCAA	GTTTGATGCC	TGTGGCGCCC	GCGGCGTGCC	GCAGCCGCTG	TTTCCTGCAA	GGCGG	975
NTPDase Clonagem	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	848
Consensus	ATAACAACGT	CGACCTGCAA	GTTTGATGCC	TGTGGCGCCC	GCGGCGTGCC	GCAGCCGCTG	TTTCCTGCAA	GGCGG	
NTPDase GenBank	CATCCCATCT	ACGCCCTTCT	CTACTTTTAC	AACCGCCTCT	ACGACTTCCCT	CAAGGAGGGG	AGCCAGGTCT	ACGTC	1050
NTPDase Clonagem	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	923
Consensus	CATCCCATCT	ACGCCCTTCT	CTACTTTTAC	AACCGCCTCT	ACGACTTCCCT	CAAGGAGGGG	AGCCAGGTCT	ACGTC	
NTPDase GenBank	TCCTCGTACA	AGGAGGTCGG	GCAAGAGGTG	TGCCACGGG	AATCTGCGAG	GCGGACCACC	GCCCCTGAGG	AAACT	1125
NTPDase Clonagem	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	998
Consensus	TCCTCGTACA	AGGAGGTCGG	GCAAGAGGTG	TGCCACGGG	AATCTGCGAG	GCGGACCACC	GCCCCTGAGG	AAACT	
NTPDase GenBank	GCTTGCATGG	AACTGGCGTA	CATGTACAGC	TTCTTGACGT	ACGGGCTAGG	GCTTAGTGAC	GCCACGGTTC	TCACC	1200
NTPDase Clonagem	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1073
Consensus	GCTTGCATGG	AACTGGCGTA	CATGTACAGC	TTCTTGACGT	ACGGGCTAGG	GCTTAGTGAC	GCCACGGTTC	TCACC	
NTPDase GenBank	GTGCCAACC	GCATCGAGGG	TATGGCGGTT	TCTGGTCTCT	TTGGCTCCTC	TCTCTCCTNC	CTGCTCAAGA	TGGAA	1275
NTPDase Clonagem	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1148
Consensus	GTGCCAACC	GCATCGAGGG	TATGGCGGTT	TCTGGTCTCT	TTGGCTCCTC	TCTCTCCTNC	CTGCTCAAGA	TGGAA	
NTPDase GenBank	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1278
NTPDase Clonagem	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1150
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
NTPDase GenBank	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1278
NTPDase Clonagem	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1150
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)