

Purificação da nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1 (NTPDase 1) antigênica de *Leishmania infantum*¹

Purification of the antigenic Leishmania infantum nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase 1)

Ana Carolina Ribeiro Gomes Maia²

Michelle de Lima Detoni³

Leonardo Ramos Quellis⁴

Gabriane Nascimento Porcino⁴

Danielle Gomes Marconato⁵

Nayara Braga Emídio⁵

Laura Lavorato Soldati⁵

Wagner Faria Messias⁵

Anna Cecília Quirino Teixeira⁵

Marcos José Marques⁶

Priscila de Faria Pinto⁷

Eveline Gomes Vasconcelos⁸

DOI: <https://doi.org/10.34019/2179-3700.2018.v18.29857>

Resumo

As NTPDases (nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases) são enzimas que hidrolisam nucleosídeos di- e trifosfatados sob ativação de íons bivalentes. Uma atividade NTPDásica foi caracterizada em promastigotas de *Leishmania infantum*, um protozoário causador de leishmaniose visceral. Neste trabalho, a NTPDase 1 foi purificada de preparação de promastigotas usando como estratégia eletroforese em gel não-desnaturante e os detergentes deoxicolato de sódio e Triton X-100, os

¹ Trabalho premiado no Seminário de Iniciação Científica da UFJF de 2014.

² Bolsista PROQUALI/UFJF, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil.

³ Bolsista FAPEMIG, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil.

⁴ Bolsista CAPES/REUNI, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil.

⁵ Bolsista BIC/UFJF, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil.

⁶ Departamento de Patologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, UNIFAL, Alfenas, MG, Brasil.

⁷ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil.

⁸ Professora Orientadora do Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil.



quais preservam a atividade fosfohidrolítica desta enzima. Após eletroforese, incubação do gel com ATP e inibidor de ATPases do tipo P permitiu a visualização de uma única banda com depósito branco de fosfato de cálcio. Esta banda ativa foi isolada e por SDS-PAGE e coloração pela prata foi identificada como polipeptídeos de 50 e 47 kDa. Por Western blot, os dois polipeptídeos foram reconhecidos pelo soro imune anti-LbB1LJ, o qual reconhece especificamente a porção N-terminal do domínio B de NTPDases 1 de *Leishmania*. Por espectrometria de massas, a identidade da NTPDase 1 foi confirmada pela identificação de seis peptídeos trípticos coincidentes com a NTPDase 1 anotada em seu genoma (NCBI gi|134068433), uma cobertura de 19% de sua sequência primária. As atividades ATPásica ($555 \pm 93 \text{ nmol Pi} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) e ADPásica ($644 \pm 38 \text{ nmol Pi} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) revelaram um índice de purificação de aproximadamente 62 vezes e uma razão de atividade ATPase/ADPase de aproximadamente 1, confirmando a efetividade desta estratégia para o isolamento da NTPDase 1 de promastigotas de *L. infantum*.

Palavras-chave: NTPDase. ATP difosfohidrolase. *Leishmaniainfantum*. Leishmaniose visceral.

Abstract

The NTPDases (nucleoside triphosphate diphosphohydrolases) are enzymes that hydrolyze di- and triphosphate nucleosides under activation of bivalent ions. An NTPDase activity was characterized in *Leishmaniainfantum* promastigotes, a protozoan parasite that causes visceral leishmaniasis. In this work, NTPDase 1 was purified from the promastigotes preparation using a strategy non-denaturing gel electrophoresis and detergents sodium deoxycholate and Triton X-100, which preserve the phosphohydrolytic activity of this enzyme. After electrophoresis, incubation of the gel with ATP and P-type ATPase inhibitor allowed visualization of a single band with white deposit of calcium phosphate. This active band was isolated, and by SDS-PAGE and silver staining it was identified as 50 and 47 kDa polypeptides. By Western blot, both polypeptides were recognized by anti-LbB1LJ immune serum, which specifically recognizes N-terminal portion of the domain B from the *Leishmania*NTPDases 1. By mass spectrometry, NTPDase 1 identity was confirmed by the identification of six tryptic peptides coinciding with *L. infantum*NTPDase annotated in its genome (NCBI gi|134068433), coverage of 19% of its primary sequence. The ATPase ($555 \pm 93 \text{ nmol Pi} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) and ADPase ($644 \pm 38 \text{ nmol Pi} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) activities revealed an index of approximately 62-fold purification and an ATPase/ADPase activity ratio of approximately 1, confirming effectiveness of this strategy for isolation of the NTPDase 1 from *L. infantum* promastigote.

Keywords: ATP diphosphohydrolase. NTPDase. *Leishmania infantum*. Visceral leishmaniasis.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a leishmaniose visceral é uma doença causada principalmente pelo protozoário *Leishmania infantum*, e tem como vetor o flebotomíneo infectado que, por meio de sua picada, transmite o parasito aos seres humanos, cães e outros animais domésticos ou selvagens. É uma doença zoonótica, endêmica e grave, cujo tratamento não assegura cura total, e estratégias para diagnosticar e prevenir a infecção e a doença estão em desenvolvimento (MAIA, 2015; TRAVI et al., 2018).

Recentemente, uma nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1 (NTPDase 1) foi identificada em *L. infantum* (MAIA et al., 2013). Esta proteína, pertencente à família das NTPDases (KNOWLES, 2011), hidrolisa nucleosídeos di- e trifosfatados e é ativada por

íons bivalentes, sendo o cálcio o íon de melhor efetividade para a hidrólise de ATP e ADP (MAIA et al., 2013). As NTPDases podem existir como isoformas no mesmo organismo, com diferentes especificidades para os seus substratos e íons bivalentes, e estão relacionadas à recuperação de purinas e/ou a mecanismos de proteção contra o organismo hospedeiro controlando os níveis dos nucleotídeos em diferentes processos fisiológicos tais como agregação plaquetária, respostas imunes, virulência, infectividade e adesão celular (KNOWLES, 2011; MARCONATO et al., 2017; PAES-VIEIRA et al., 2018).

As sequências de aminoácidos de NTPDases de diversos organismos foram alinhadas e analisadas. Além das regiões conservadas comuns a estas proteínas (ACRs; “apyrase conserved regions”), um domínio adicional de 40 aminoácidos de alta identidade e altamente conservado foi particularmente identificado em NTPDases de plantas e organismos patogênicos de linhagens filogenéticas distintas, e foi chamado domínio B (FARIA-PINTO et al., 2008; MAIA et al., 2011). Um polipeptídeo recombinante e peptídeos sintéticos derivados deste domínio B foram obtidos e caracterizados como ricos em epitopos de células B, justificando a antigenicidade encontrada em NTPDases de *Schistosoma mansoni*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *L. infantum*, bem como a reatividade cruzada com as apirases de batata (*Solanum tuberosum*) e esponjinha (*Calliandra brevipes*), proteínas de plantas também pertencentes à família das NTPDases (FARIA-PINTO et al., 2008; REZENDE-SOARES et al., 2010; MENDES et al., 2011; PORCINO et al., 2012; DETONI et al., 2012, 2013; MAIA et al., 2011, 2013, 2019a, 2019b). Atentos aos diferentes ciclos de vida e a localização destas proteínas em parasitos, a antigenicidade de epitopos específicos das NTPDases tem sido estudada por nós, assim como a suscetibilidade da proteína e dos respectivos parasitos a anticorpos antiproliferativos e a novos compostos leishmanicidas.

Visando a triagem e estudo dos modos de ação de novos compostos leishmanicidas, foi de nosso interesse a obtenção da NTPDase 1 de *L. infantum* na sua forma pura e nativa, e as estratégias metodológicas empregadas estão descritas neste trabalho.

2 METODOLOGIA

2.1 Obtenção de promastigotas de *L. infantum* e determinação da atividade fosfohidrolítica. A obtenção, o cultivo e a preparação do homogeneizado de

promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR/1972/BH46) foram realizados como previamente descrito (MAIA et al., 2013). Para a medida da atividade enzimática, a preparação de promastigotas (0,1 mg de proteína/mL) foi incubada a 37°C em tampão MOPS 50 mM, pH 7,4, 100 µM de ortovanadato de sódio e 1 mM de CaCl₂. A reação foi iniciada pela adição de 3 mM do substrato ATP ou ADP e interrompida aos 60 minutos pela adição de HCl 0,1 N. Reação colorimétrica foi desenvolvida para a medida da quantidade do fosfato inorgânico (Pi) liberado (MAIA et al., 2013). Foram feitos dois experimentos em duplicata.

2.2 Purificação da NTPDase 1 por eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante. A eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante foi realizada conforme descrito previamente (MAIA et al., 2013), com pequenas modificações. Brevemente, uma alíquota da preparação de promastigotas foi homogeneizada em Tampão MOPS 50 mM, pH 7,4, suplementado com CaCl₂ 1 mM, Triton X-100 0,2% e DOC 0,2%. Tampão de amostra para eletroforese (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, glicerol 10% e azul de bromofenol 5%) foi adicionado a este homogeneizado. Alíquotas de 100 µg de proteína total foram aplicadas em poços de géis de poliacrilamida 6% preparados com a adição de Triton X-100 0,1% e deoxicolato de sódio (DOC) 0,1%. A eletroforese foi feita em equipamento Mini-Protean III Cell (BioRad) a 130 V a 4°C por 4 horas, usando um tampão de corrida contendo estas mesmas concentrações de detergentes. Após a corrida, os géis foram lavados por 40 minutos em tampão MOPS 50 mM, pH 7,4, com troca de tampão por duas vezes, e incubados por duas horas a 37°C em meio de reação (MOPS 50 mM, pH 7,4, ortovanadato de sódio 100 µM, CaCl₂ 10 mM) e 5 mM de ATP. Um precipitado de fosfato de cálcio branco foi identificado sobre a banda com atividade fosfohidrolítica, e o gel foi fotografado contra um fundo escuro. A região do gel correspondente ao centro da banda ativa foi cortada e os pedaços de gel agrupados. Após eletroeluição, dessalinização e liofilização, o conteúdo proteico foi medido (Pierce BCA Protein Assay Kit; Thermo Scientific, USA).

Para verificar a eficiência da purificação e identificação da NTPDase 1, alíquotas (1 µg de proteína) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% com dodecil sulfato de sódio 0,1% (SDS-PAGE 10%), e parte do gel foi corada pela prata e Coomassie blue, e a outra parte teve suas proteínas eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose para realização de Western blots (MAIA et al., 2013). A membrana foi bloqueada (tampão fosfato 0,15 M, pH 7,4, Tween 20 0,3% e caseína 2%) e incubada por

6 horas à temperatura ambiente com o soro policlonal de camundongo anti-LbB1LJ diluído 1:200 usando procedimentos padrão (MAIA et al., 2013). A reatividade foi revelada por quimioluminescência usando anticorpos secundários anti-IgG de camundongos acoplados à peroxidase e o Luminol como substrato (Kit ECL Western blotting System; GE Healthcare Life Sciences, São Paulo, Brasil) e exposição a filmes de raio X.

Para análise por espectrometria de massas, após SDS-PAGE 10% e coloração pelo Coomassie blue, a banda de aproximadamente 50 kDa foi cortada, descorada, desidratada, reduzida por ditione (DTT), alquilada por iodoacetamida e digerida por tripsina (<http://lnbio.cnpem.br/facilities/mass-spectrometry/sample-preparation/>). Os peptídeos tripticos foram separados por C18 (100 mm x 100 mm) RP-nanoUPLC (nanoAcquity, Waters) acoplada ao espectrômetro de massa Q-TOF-Premier (Waters), e os espectros foram obtidos usando Waters MassLynx™ v.4.1 Software (ARAGÃO et al., 2012). Os arquivos de dados brutos foram convertidos em um formato de lista de picos (mgf) sem soma das varreduras pelo Mascot Distiller v. 2.3.2.0 (2009; Matrix Science Ltd.), e investigados contra a sequência da ATP difosfohidrolase de *L. infantum* (NCBI; gi|134068433) usando Mascot engine 2.3.01 (Matrix Science Ltd.). Os parâmetros de pesquisa foram a carbamidometilação como modificação fixa; oxidação de metionina ou histidina ou fosforilação de serina ou treonina como modificações variáveis; uma clivagem perdida na tripsinização e tolerância MS/MS de 0,3 Da. Apenas os peptídeos com um mínimo de cinco resíduos de aminoácidos ($p < 0,05$) foram considerados nos resultados. A análise de espectrometria de massas foi realizada nas instalações do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), em Campinas, São Paulo, Brasil.

2.3 Medida de atividade fosfohidrolítica da NTPDase 1 pura. Outros géis não-desnaturantes foram desenvolvidos nas mesmas condições experimentais já descritas. Para a identificação da banda com atividade fosfohidrolítica, o primeiro poço do gel foi cortado e, após incubação com o substrato ATP e identificação da banda contendo o precipitado de fosfato de cálcio, foi pareado com o restante do gel para o recorte da área correspondente ao centro da banda ativa. A atividade fosfohidrolítica da NTPDase 1 pura (0,3 µg) aprisionada em corte de gel foi testada em tubo usando meio de reação contendo MOPS 50 mM, pH 7,4, C12E9 1 mg/mL e CaCl₂ 5 mM. A reação foi iniciada pela adição de 3 mM de ATP ou ADP, a 37°C, e após 60 minutos foi interrompida pela adição de HCl

0,1 N. Como branco, foram usados recortes de outra região do gel. A quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado foi determinada por reação colorimétrica (MAIA et al., 2013). Foram feitos dois experimentos em duplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

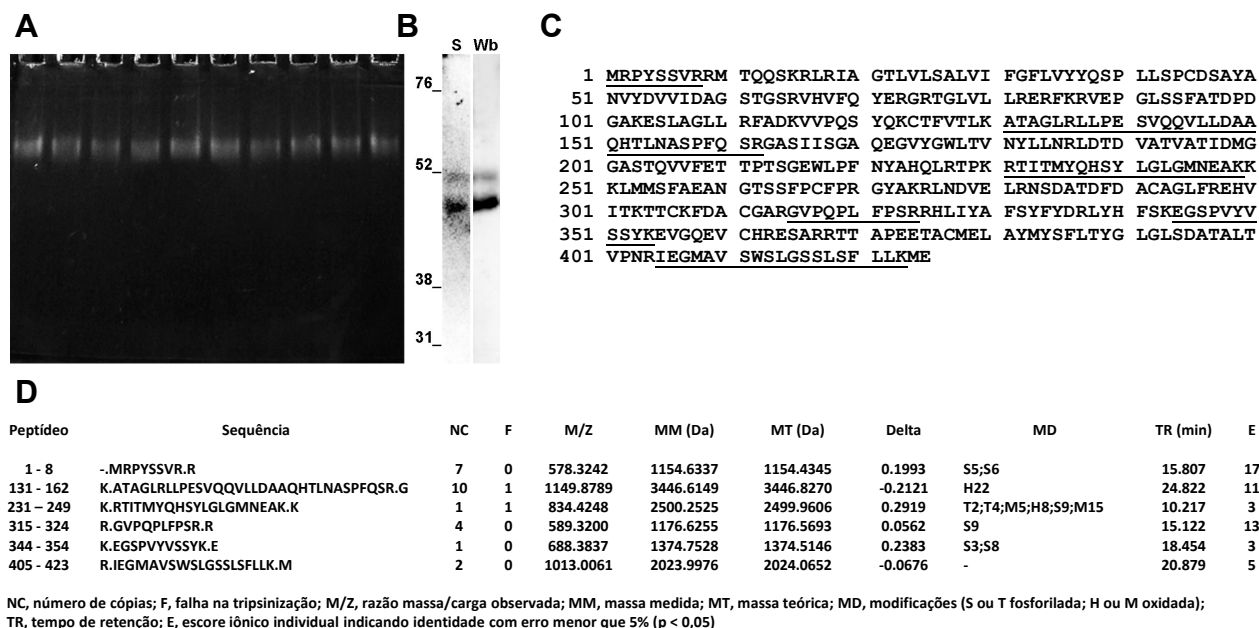
Este trabalho teve como objetivo estabelecer um método de obtenção da NTPDase 1 de *L. infantum* com elevado grau de pureza, preservando ainda a sua atividade catalítica. Para isso, uma eletroforese em gel não-desnaturante foi idealizada, na qual o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS; aniônico) utilizado em SDS-PAGE foi substituído por deoxicolato de sódio (DOC; aniônico) e Triton X-100 (não iônico), ambos testados previamente em concentrações variadas (MAIA, 2015). Assim, uma preparação de promastigotas solubilizada em DOC e Triton X-100 0,2% foi aplicada em gel não-desnaturante (100 µg/poço). Após a corrida eletroforética, o gel foi revelado com o substrato ATP na presença de cálcio e, como mostrado, foi evidenciada a NTPDase 1 pelo aparecimento de depósito branco de fosfato de cálcio sobre uma única banda com atividade ATPásica (Figura 1A). A revelação conduzida na presença de 100 µM de ortovanadato no meio de reação descartou o aparecimento de bandas de ATPases do tipo P, enzimas também presentes no gênero *Leishmania* (COIMBRA et al., 2008).

A região central de cada banda de atividade foi cortada. Estes recortes foram reunidos e submetidos à eletroeluição, dessalinização e liofilização. O conteúdo proteico foi mensurado, o que permitiu estimar o valor de 0,3 µg de NTPDase 1 em cada 100 µg de preparação de promastigotas.

Após SDS-PAGE 10% e coloração pela prata, somente duas bandas de aproximadamente 50 e 47 kDa foram visualizadas (Figura 1B, S), ambas identificadas como NTPDase 1 por Western blot usando o soro imune anti-LbB1LJ (Figura 1B, Wb), o qual reconhece especificamente a porção N-terminal (r82-103) do domínio B (r82-121) de NTPDase 1 de *Leishmania*. Portanto, as bandas reativas de 50 e 47 kDa correspondem a NTPDase 1 anotada no genoma de *L. infantum* (CAM66723; MW 47222.93) e, possivelmente, são formas da mesma proteína sob processamento pós-traducional, o que foi preservado neste processo de purificação (MAIA et al., 2013). A banda de 50 kDa, proteína íntegra com suas possíveis modificações pós-tradução e livre de possível proteólise inespecífica durante o processamento, foi preparada para análises espectrométricas, usando Q-TOF-Premier. A identidade da NTPDase 1 de *L. infantum* foi

confirmada por meio dos espectros de seis peptídeos coincidentes com a NTPDase1 anotada em seu genoma (NCBI; gi|134068433), resultando em uma cobertura de 19% de sua sequência primária (Figura 1, C e D).

Figura 1– Isolamento e identificação de NTPDase 1 ativa. (A) A NTPDase 1 de preparação de promastigotas foi identificada por eletroforese em gel não-desnaturante pelo depósito branco de fosfato de cálcio, resultado da hidrólise de ATP. O gel foi fotografado contra um fundo preto (MAIA, 2015). (B) SDS-PAGE 10% e coloração pela prata (S) ou Western blot (Wb) usando soro imune anti-LbB1LJ. (C) Sequência primária da NTPDase 1 de *L. infantum* (gi|134068433) e (D) análise por espectrometria de massa de peptídeos tripticos da banda de 50 kDa, que identificou os espectros de 6 peptídeos coincidentes (19% de cobertura), sublinhados em sua sequência primária

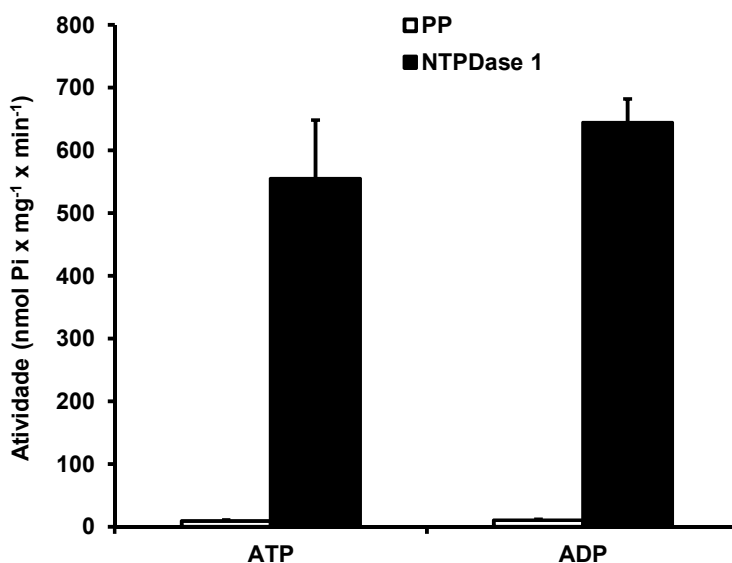


Fonte: elaboração própria; MAIA, 2015.

Para a medida da atividade catalítica da NTPDase 1 purificada, novos géis não-desnaturantes como aquele mostrado na Figura 1 foram feitos. Nestes géis, apenas o primeiro poço foi isolado e revelado com ATP. Após visualização da banda de atividade, o restante do gel foi pareado e usado para o recorte da área correspondente ao centro da banda ativa. Neste experimento, DOC e o Triton X-100 foram removidos e substituídos

por imersão dos géis em meio contendo C12E9, detergente não iônico que também preserva o dobramento adequado e a atividade catalítica desta enzima (MAIA et al., 2013). Os pedaços de gel contendo a NTPDase 1 aprisionada (0,3 µg) foram ensaiados por método colorimétrico usando ATP ou ADP como substrato (Figura 2). As atividades ATPásica e ADPásica foram 555 ± 93 e 644 ± 38 nmol Pi x mg⁻¹ x min⁻¹, respectivamente (Figura 2). Esta atividade revela um índice de purificação de aproximadamente 62 vezes quando comparada a atividade fosfohidrolítica da preparação de promastigotas usada (Figura 2; PP, ATPase, $9,01 \pm 1,47$ nmol Pi x mg⁻¹ x min⁻¹; ADPase, $10,18 \pm 2,50$ nmol Pi x mg⁻¹ x min⁻¹) e uma razão de atividade ATPase/ADPase de aproximadamente 1, confirmando a efetividade desta estratégia de isolamento da NTPDase 1 de *L. infantum*.

Figura 2– Atividade da NTPDase 1 pura. A atividade da preparação de promastigotas (PP) e da NTPDase 1 nativa contida em pedaço de gel (NTPDase 1) foi medida por espectrofotometria, conforme descrito em Metodologia. A figura mostra a média ± desvio padrão de 2 experimentos feitos em duplicata



Fonte: elaboração própria.

4 CONCLUSÃO

A estratégia de purificação da NTPDase 1 *L. infantum* usando eletroforese em gel não-

desnaturante foi bem-sucedida, como comprovado por SDS-PAGE, Western blot, espectrometria de massas e medida de atividade enzimática. Esta proteína é obtida em sua forma nativa e com atividade catalítica, e está sendo usada em testes de suscetibilidade a novos compostos leishmanicidas, o que permitirá contribuir na descoberta de novos protocolos contra as leishmanioses bem como no estudo de seus modos de ação.

5 AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG (processo CBB-APQ-2008-12). À Romênia Ramos Domingues e ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Brasileiro de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), em Campinas, São Paulo, Brasil.

REFERÊNCIAS

ARAGÃO, Annelize Z. B. *et al.* Novel Processed Form of Syndecan-1 Shed from SCC-9 Cells Plays a Role in Cell Migration. **PLoS ONE** 7(8): e43521. doi:10.1371/journal.pone.0043521, ago. 2012.

COIMBRA, Elaine S. *et al.* A *Leishmania (L.) amazonensis* ATP diphosphohydrolase isoform and potato apyrase share epitopes: antigenicity and correlation with disease progression. **Parasitology**, v. 135, p. 327-335, mar. 2008.

DETONI, Michelle L. *et al.* Galls from *Calliandrabrevipes* BENTH (Fabaceae: Mimosoidae): evidence of apyrase activity contribution in a plant-insect interaction. **Australian Journal of Botany**, v. 60, p. 559-567, set. 2012.

DETONI, Michelle L. *et al.* An antigenic domain of the *Leishmaniaamazonensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is associated with disease progression in susceptible infected mice. **Parasitology Research**, v. 112, p. 2773-2782, ago. 2013.

FARIA-PINTO, Priscila *et al.* Mapping of the conserved antigenic domains shared between potato apyrase and parasite ATP diphosphohydrolases: potential application in human parasitic diseases. **Parasitology**, v. 135, p. 943-953, jul. 2008.

KNOWLES, Aileen F. The GDA1_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. **Purinergic Signalling**, v. 7, p. 21-45, mar. 2011.

MAIA, Ana C. R. *et al.* Occurrence of a conserved domain in ATP diphosphohydrolases from pathogenic organisms associated to antigenicity in human parasitic diseases. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, p.1059-1067, out. 2011.

MAIA, Ana C. R. *et al.* An antigenic domain within a catalytically active *Leishmaniainfantum* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is a target of inhibitory antibodies. **Parasitology International**, v. 62, p. 44-52, fev. 2013.

MAIA, Ana C. R. G. **Estudo da Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase (NTPDase 1) de *Leishmania infantum* e expressão de uma nova proteína recombinante visando o controle de parasitoses de interesse veterinário.** Tese Acadêmica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, maio 2015.

MAIA, Ana C. R. G. *et al.* *Leishmaniainfantum* amastigote nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase 1): Its inhibition as a new insight into mode of action of pentamidine. **Experimental Parasitology**, v. 200, p. 1-6, maio 2019a.

MAIA, Ana C. R. G. *et al.* *Leishmaniainfantum* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase 1) B-domain: Antibody antiproliferative effect on the promastigotes and IgG subclass responses in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 271, p. 38-44, jun. 2019b.

MARCONATO, Danielle G. *et al.* Antischistosome antibodies change NTPDase 1 activity from macrophages. **Parasite Immunology** 39:e12487. <https://doi.org/10.1111/pim.12487>, nov. 2017.

MENDES, Rita G. P. R. *et al.* Immunostimulatory property of a synthetic peptide belonging to the soluble ATP diphosphohydrolase isoform (SmATPDase 2) and immunolocalization of this protein in the *Schistosoma mansoni* egg. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 808-813, nov. 2011.

PAES-VIEIRA, Lisvane *et al.* NTPDase activities: possible roles on *Leishmaniaspp* infectivity and virulence. **Cell Biology International**, v. 42, p. 670–682, jan. 2018.

PORCINO, Gabriane N. *et al.* *Leishmania (Viannia) braziliensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1): localization and *in vitro* inhibition of promastigotes growth by polyclonal antibodies. **Experimental Parasitology**, v. 132, p. 293-299, ago. 2012.

REZENDE-SOARES, Fabrícia A. *et al.* Cytochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes and identification of an antigenic and catalytically active isoform. **Parasitology**, v. 137, p. 773-783, abr. 2010.

TRAVI, Bruno L. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 12 (1): e0006082. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006082>, jan. 2018.