



UFRJ

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS DUQUE DE CAXIAS PROFESSOR
GERALDO CIDADE**

**IDENTIFICAÇÃO DE UMA ATIVIDADE 3'-NUCLEOTIDÁSICA PRESENTE
NA SUPERFÍCIE DA AMEBA DE VIDA LIVRE *ACANTHAMOEBA*
CASTELLANII E SEU POSSÍVEL PAPEL BIOLÓGICO**

Eduarda de Souza Maciel

**RIO DE JANEIRO
2023**

EDUARDA DE SOUZA MACIEL

**IDENTIFICAÇÃO DE UMA ATIVIDADE 3'-NUCLEOTIDÁSICA PRESENTE
NA SUPERFÍCIE DA AMEBA DE VIDA LIVRE *ACANTHAMOEBA*
CASTELLANII E SEU POSSÍVEL PAPEL BIOLÓGICO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Biotecnologia, sob a orientação do Dr. Luiz Fernando Carvalho Kelly.

**RIO DE JANEIRO
2023**

CIP - Catalogação na Publicação

M24i Maciel, Eduarda de Souza
IDENTIFICAÇÃO DE UMA ATIVIDADE 3'-NUCLEOTIDÁSICA
PRESENTE NA SUPERFÍCIE DA AMEBA DE VIDA LIVRE
ACANTHAMOEBA CASTELLANII E SEU POSSÍVEL PAPEL
BIOLÓGICO / Eduarda de Souza Maciel. -- Rio de
Janeiro, 2023.
38 f.

Orientador: Luiz Fernando Carvalho Kelly.
Coorientador: José Roberto Meyer Fernandes.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus
Duque de Caxias Professor Geraldo Cidade, Bacharel
em Ciências Biológicas: Biotecnologia, 2023.

1. Acanthamoeba castellanii. 2. ameba. 3.
parasito. I. Kelly, Luiz Fernando Carvalho, orient.
II. Fernandes, José Roberto Meyer, coorient. III.
Titulo.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Eduarda de Souza Maciel

Identificação de uma atividade 3'-nucleotidásica presente na superfície da ameba de vida livre *acanthamoeba castellanii* e seu possível papel biológico. Trabalho de conclusão de curso submetido ao Campus Duque de Caxias, Professor Geraldo Cidade, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas: Biotecnologia.

Rio de Janeiro, 05 de setembro de 2023

Dr. Luiz Fernando Carvalho Kelly

(Pesquisador de Pós-doutorado do laboratório de Bioquímica Celular, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis - UFRJ, orientador)

Prof. Silas Pessini Rodrigues

(Prof. Adjunto do Campus Duque de Caxias - UFRJ)

Pesquisador Marco Antônio Lacerda Abreu

(Pesquisador de Pós-doutorado do laboratório de Bioquímica Celular, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis - UFRJ)

Pesquisadora Anita Leocadio Freitas Mesquita

(Pesquisador de Pós-doutorado do laboratório de Bioquímica Celular, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis - UFRJ, suplente - revisor)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela vida e oportunidades que tive ao longo desses anos para que fosse possível chegar até aqui.

Aos meus pais, Jones e Cláudia, que sonharam junto comigo, me deram força, e sempre fizeram o que estava ao alcance e muito além para que eu pudesse seguir meus caminhos.

À minha irmã Raiany, por ser sempre um ouvido atento e um ombro amigo.

Ao meu cunhado Hugo, por ter sido um irmão mais velho que veio de brinde sempre presente para me socorrer e escutar.

Às minhas avós Luzia e Lourdes, por todo amor ao longo desses anos, e por serem sempre uma inspiração.

À Gabriella, por toda paciência, amor, escuta, cuidado e parceria nesse processo.

Ao Bidu, por ter sido o melhor cachorro que eu poderia ter e ter me acompanhado não só na época da faculdade, mas ao longo de todo meu crescimento.

Aos meus tios, tias, primos e primas que compartilharam um pouco desses quatro anos comigo e são meu apoio sempre presente.

À Ana Luiza, parte fundamental da minha sobrevivência na graduação, que deixou mais leve esses quatro anos, obrigada por todas as conversas, almoços no bandeirão, trufas, amizade e cuidado compartilhados.

Às minhas amigadas de toda uma vida, Laís, Fernanda, Elizabeth, Evellyn, por todos esses anos de amizade, apoio e por sempre acreditarem em mim.

Ao Professor José Roberto, por me receber em seu laboratório e por todo o incentivo e acolhimento nesse processo.

Ao meu orientador Luiz Fernando, por todo suporte, paciência e principalmente empatia nesses anos, eu não teria condições de chegar até o fim deste trabalho sem o seu apoio.

À Ayra pela amizade, conselhos, caronas e tamanho cuidado que me estendeu nessa caminhada.

À Thaís pela amizade, almoços às 11h, debates de novelas, conversas e ajuda também sempre presentes.

Aos meus colegas do Laboratório de bioquímica celular Anita, Fabiano, Rafaella, Bruna, Michelle e Marco pela amizade e apoio.

Aos professores e equipe do campus Duque de Caxias Professor Geraldo Cidade pelos ensinamentos.

A Faculdade Federal do Rio de Janeiro e aos Órgãos fomentadores de pesquisa (CNPQ e FAPERJ) pela oportunidade.

RESUMO

A *Acanthamoeba castellanii* é uma ameba de vida livre comumente encontrada em diversos ambientes como solo e reservatórios de água potável. A *Acanthamoeba* apresenta duas formas em seu ciclo de vida, os trofozoítos e os cistos. O trofozoíto é sua forma proliferativa, infectiva e o cisto sua forma de resistência, que possui duas paredes celulares que conferem proteção a diferentes estresses. A ecto-3'-nucleotidase é uma ectoenzima, dessa forma encontra-se associada à membrana plasmática com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular. A ecto-3'-nucleotidase é uma enzima bifuncional, atua como nucleotidase sendo capaz de hidrolisar nucleotídeos 3'-monofosforilados, e como nuclease, hidrolisando ácidos nucleicos. Tem papel fundamental não só no processo de nutrição de diferentes parasitas, mas nos processos de adesão, proliferação e interação com células hospedeiras. O presente trabalho tem como objetivo realizar análises que contribuam para caracterização bioquímica da atividade 3'-nucleotidásica em *A. castellanii*, sendo a primeira caracterização da ecto-3'-nucleotidase em uma ameba de vida livre. Os trofozoítos apresentam uma atividade 3'-nucleotidásica muito superior à forma de vida cística. Dentre os substratos fosforilados, 3'-AMP, 5'-AMP, ATP, ADP, *p*-NPP e β -GP, o trofozoíto de *A. castellanii* hidrolisa de forma preferencial o 3'-AMP, que tem uma hidrólise notavelmente superior aos demais. A atividade 3'-nucleotidásica está presente exclusivamente na superfície da membrana plasmática, não apresentando alteração na atividade sendo ela realizada com a célula íntegra ou lisada. A atividade aumenta de forma linear em função do tempo e da densidade celular. A ecto-3'-nucleotidásica apresenta uma cinética de Michaelis-Menten com valores de $K_m = 0,457 \pm 0,039$ mM de 3'-AMP e $V_{m\acute{a}x} = 154 \pm 3,240$ nmol $P_i \times h^{-1} \times 10^{-6}$ células. A atividade da 3'-nucleotidase é inibida por dithiothreitol (DTT) de forma dose-dependente. Além disso, o DTT só é capaz de modular a hidrólise de 3'-AMP nos trofozoítos de *A. castellanii*.

Palavras-chave: *Acanthamoeba castellanii*, ectoenzimas, nucleotidase, 3'-nucleotidase/nuclease

ABSTRACT

Acanthamoeba castellanii is a free-living amoeba commonly found in various environments such as soil and drinking water reservoirs. *Acanthamoeba* presents two forms in its life cycle, trophozoites and cysts. Trophozoite is the proliferative and infective form, and the cyst is the resistant form, which develops two cell walls that provide protection against stresses. The ecto-3'-nucleotidase is an ectoenzyme associated with the plasma membrane with its catalytic site facing the extracellular environment. It is a bifunctional enzyme that acts as a nucleotidase capable of hydrolyzing 3'-monophosphorylated nucleotides, and as a nuclease, hydrolyzing nucleic acids. This enzyme plays a fundamental role not only in the parasite's nutrition process but also in processes of adhesion, proliferation, and interaction with host cells. The objective of this study is to perform analyzes that contribute to the biochemical characterization of 3'-nucleotidase activity in *A. castellanii*, representing the first characterization of an ecto-3'-nucleotidase in a free-living amoeba. The trophozoites of *A. castellanii* present a significantly higher 3'-nucleotidase activity compared to the cysts. Among the phosphorylated substrates tested, 3'-AMP, 5'-AMP, ATP, ADP, *p*-NPP, and β -GP, the trophozoites preferentially hydrolyze 3'-AMP, which exhibits notably superior hydrolysis compared to the others. The 3'-nucleotidase activity is exclusively present on the plasma membrane surface, with no alteration in activity whether performed with intact or lysed cells. This activity increases linearly over time and cell density. The ecto-3'-nucleotidase activity follows a Michaelis-Menten kinetics with K_m value of 0.457 ± 0.039 mM for 3'-AMP and V_{max} value of 154 ± 3.240 nmol $P_i \times h^{-1} \times 10^6$ cells. The 3'-nucleotidase activity is inhibited by dithiothreitol (DTT), a reducing agent capable of altering the enzyme's structure.

Keywords: *Acanthamoeba castellanii*, ectoenzymes, nucleotidase.

LISTA DE ABREVIATURAS

2'3'-cAMP - adenosina-2',3'-monofosfato cíclico

3'-AMP - 3'-adenosina monofosfato

5'-AMP - 5'-adenosina monofosfato

ADP - adenosina difosfato

ATP - adenosina trifosfato

β -GP - Beta-Glicerofosfato

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGTA - Ácido etilenoglicol tetra-acético

HEPES -4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; solução tampão

K_m – Constante de Michaelis-Menten; concentração de substrato com a qual é atingida metade da velocidade máxima da reação

MES - do inglês, "4-Morpholine ethane sulfonic acid sodium salt"

p-NPP – para-nitrofenilfosfato

P_i – Fosfato inorgânico

TRIS - tris-(hidroximetil)aminometano

$V_{m\acute{a}x}$ – Velocidade máxima de uma reação enzimática

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida de <i>Acanthamoeba spp.</i>	12
Figura 2: Microscopia eletrônica do trofozoíto de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	13
Figura 3: Microscopia de cistos de <i>A. castellanii</i>	14
Figura 4: Amebíase cutânea provocada por trofozoítos de <i>A. castellanii</i>	15
Figura 5: Ceratite provocada por <i>Acanthamoeba</i> .	16
Figura 6: Encefalite amebiana granulomatosa	16
Figura 7: Comparação estrutural 5'-AMP e 3'-AMP	17
Figura 8: Geração de 3'-AMP	18
Figura 9: : Via de salvação de purinas descrita em <i>A. castellanii</i>	20
Figura 10: Dependência da densidade celular e do curso temporal na atividade 3'-nucleotidásica de <i>A. castellanii</i> .	24
Figura 11: Atividade 3'-nucleotidásica em células íntegras e lisadas	25
Figura 12: Hidrólise de diferentes substratos fosforilados por trofozoíto de <i>A. castellanii</i>	25
Figura 13: Influência do pH na atividade 3'-nucleotidásica.	26
Figura 14: Afinidade da enzima pelo substrato 3'-AMP.	27
Figura 15: Atividade 3'-nucleotidásica na presença de metais	27
Figura 16: Atividade 3'-nucleotidásica nas duas formas de vida da <i>A. castellanii</i> .	28
Figura 17: Modulação da atividade ecto-fosfohidrolásica por DTT .	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ de 3'-nucleotidasas de diferentes microrganismos	32
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Acanthamoeba castellanii.....	11
1.2. Manifestações clínicas.....	14
1.3. 3' -nucleotidase/nuclease.....	17
1.4. Metabolismo purinérgico em Acanthamoeba castellanii.....	19
2.OBJETIVOS.....	20
2.1. Objetivo geral.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	21
3. METODOLOGIA.....	21
3.1. Meio de cultura.....	21
3.2. Encistamento.....	21
3.3. Ensaio da atividade.....	22
3.3.1. Curso temporal e densidade celular.....	22
3.3.3. Influência do pH.....	22
3.3.4 Efeito dos metais.....	23
3.4. Análise Estatística.....	23
4. RESULTADOS.....	24
5. DISCUSSÃO.....	29
6. CONCLUSÃO.....	32
7. REFERÊNCIAS.....	33

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Acanthamoeba castellanii*

O gênero *Acanthamoeba*, que compreende as amebas de vida livre patogênicas e não patogênicas, pertence ao grupo de protozoários mais prevalentes no ambiente, e estão distribuídos em ambientes terrestres e aquáticos (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004). O gênero recebeu maior foco de estudo quando analisado que algumas espécies, para além de sua capacidade de infectar seres humanos, podem agir como reservatório para demais patógenos (SOTO-ARREDONDO et al., 2013).

A *Acanthamoeba castellanii* é uma espécie do gênero *Acanthamoeba* pertencente ao reino protista, filo Amoebozoa, classe Lobosea, ordem Centramoebida, alocado na família Acanthamoebidae. Uma ameba patogênica de vida livre, comumente encontrada em ambientes como solo e reservatórios de água (FOUQUE E. et al, 2012). Durante seu ciclo de vida ela apresenta duas formas: os trofozoítos, formas patogênicas e replicativas; e os cistos, formas não proliferativas e relacionadas à resistência do protozoário (Figura 1). Ao se encontrar em situações de estresse, a *Acanthamoeba* passa por mudanças fisiológicas e morfológicas que são mediadas por fenômenos autofágicos, passando pelo processo de encistamento. Nesse processo, através dos autofagossomos, que se unem a lisossomos, algumas organelas que não terão função na forma cística, são degradadas a fim de gerar substratos que serão utilizados para a síntese de novas estruturas. As duas formas são capazes de acometer o hospedeiro vertebrado, mas só o trofozoíto desencadeia o processo infectivo.

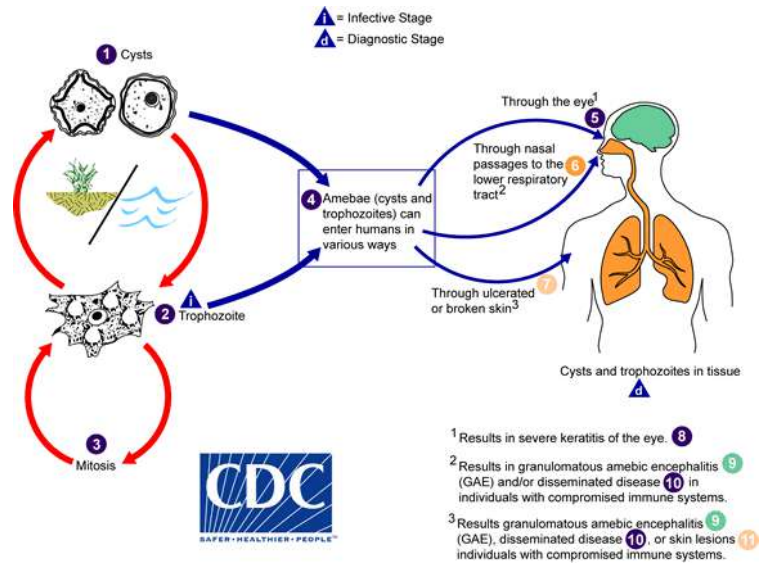


Figura 1: Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp. (Fonte: <https://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/biology.html>)

Os trofozoítos são caracterizados por sua forma irregular e a presença de projeções de membrana denominadas "acanthopodios" (Figura 2), alimentam-se de bactérias, algas e fungos presentes no ambiente. Sua nutrição pode ocorrer através da formação de pseudópodes e fagocitose ou pela formação de estruturas temporárias chamadas "food cups" utilizada para ingestão desses alimentos (MARCIANO-CABRAL, 2003). Essas projeções ainda são fundamentais na patogênese da ameba, pois em sua superfície são encontrados diversos receptores que possibilitam uma maior adesão, como proteínas de ligação à manose. No encistamento essas proteínas têm sua expressão reduzida, dessa forma o cisto não possui a mesma aderência que o trofozoíto a célula do hospedeiro (GARATE M. et al, 2005).

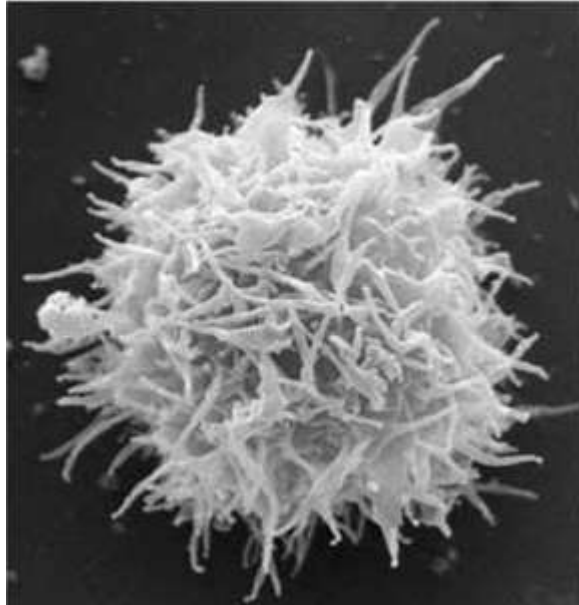


Figura 2: Microscopia eletrônica do trofozoíto de *A. castellanii*. É possível observar a forma irregular e as características projeções de membrana da forma infectiva do protozoário (Khan, 2003).

Os cistos perdem suas projeções de membrana e apresentam uma forma mais arredondada. Eles são a forma de resistência desse protozoário, ou seja, uma forma do protozoário garantir sua sobrevivência em condições adversas como baixa disponibilidade de nutrientes, alta osmolaridade, mudanças bruscas de temperatura e pH e resposta imune do hospedeiro. Os cistos são formados por duas paredes, uma parede mais externa, o ectocisto, e uma parede mais interna, o endocisto, formada em sua maioria por polissacarídeos que conferem maior proteção aos estresses (Figura 3) (KHAN, 2003). Sendo uma forma de resistência, os cistos são capazes de sobreviver a condições extremas e à ação de biocidas, antibióticos e sobreviver em diferentes espectros de temperatura. Essa resistência torna demorado o tratamento da ceratite causada por esse protozoário, e ainda pouco efetivo, uma vez que em condições favoráveis pode ocorrer o ecistamento, processo onde o trofozoíto emerge desse cisto e volta sua atividade de reprodução (MARCIANO-CABRAL, 2003). Os cistos eram tratados como formas metabolicamente inativas, no entanto, recentemente, observou-se que o transporte de fosfato é maior em comparação aos trofozoítos. Este aumento está provavelmente relacionado à manutenção do metabolismo energético da forma resistente por meio da síntese anaeróbica de ATP, uma vez que o conteúdo de ATP intracelular nos cistos é ainda maior do que o observado nos trofozoítos. (CARVALHO-KELLY et al., 2022). Ainda a ameba na sua forma cística é capaz monitorar o ambiente ativamente, através de proteínas presentes na parede e assim, perceber as condições favoráveis para ecistar (FECHTALI-MOUTE et al., 2022).

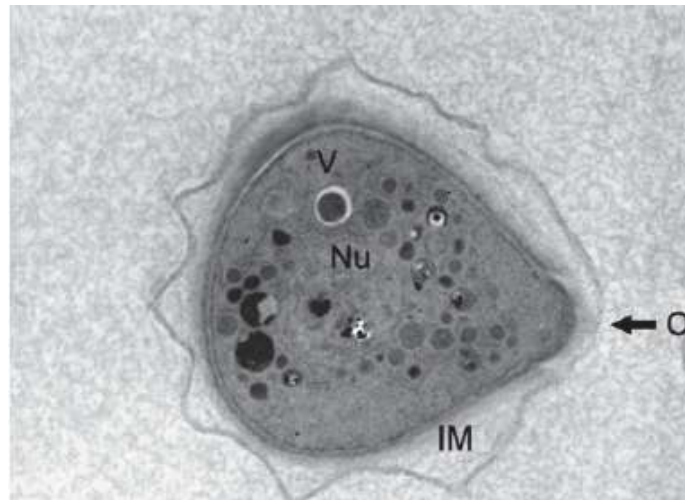


Figura 3: Microscopia de cistos de *A. castellanii*. É possível analisar a presença das suas duas paredes, uma mais externa denomina ectocisto e uma interna denominada endocisto. Além disso, pode-se observar a presença de um núcleo (N), diversos vacúolos (V), espaço intermembrana (IM) e o ostíolo (O) (DUDLEY *et al.*, 2009).

1.2. Manifestações clínicas

A *A. castellanii* é um parasita com capacidade patogênica. Suas principais manifestações clínicas são a encefalite amebiana granulomatosa (EAG) e a ceratite amebiana. É associada também, em menor frequência, à amebíase ou acantamebíase cutânea, que se caracterizam por lesões cutâneas que atingem principalmente imunocomprometidos, podendo fornecer um acesso do parasito ao sistema circulatório e levando a casos mais graves. Esta manifestação ocorre quando o parasito entra em contato com uma lesão pré-existente nesse indivíduo. É muito raro que pessoas imunologicamente saudáveis sejam acometidas com essas lesões. A amebíase cutânea é caracterizada por úlceras e nódulos na pele (Figura 4) (KHAN, 2006). No caso do diagnóstico precoce de acantamebíase cutânea, gluconato de clorexidina e creme de cetoconazol obtiveram sucesso em tratamentos terapêuticos (TRABELSI *et al.*, 2012).



Figura 4: Amebíase cutânea provocada por trofozoítos de *A. castellanii*. (Fonte: <https://albericomarcosbioifes.wordpress.com/2011/03/21/antraz-a-doenca-que-assusta-o-mundo/>)

A ceratite amebiana é sua manifestação clínica mais comum e consiste em uma infecção na córnea (Figura 5), que pode causar inflamação ocular e perda parcial ou total da visão, podendo acometer tanto indivíduos imunocomprometidos quanto indivíduos saudáveis (MARCIANO-CABRAL, 2003). O processo de infecção tem início através do contato direto do patógeno, presente em reservatórios contaminados, com o epitélio da córnea do hospedeiro. Uma das formas mais comuns de contaminação se dá pela má higienização de lentes de contato, sendo isto uma questão importante no combate à ceratite amebiana. Após o contato inicial com o epitélio da córnea ocorrem processos de sinalização celular que estimulam a adesão e a liberação de diferentes enzimas que vão facilitar o processo infectivo. Durante este processo ocorre a degradação do tecido ocular resultando nos sintomas característicos da ceratite (KHAN, 2003).

A ceratite amebiana causa dor severa, vermelhidão, fotofobia e a falta de tratamento pode levar à cegueira (KHAN, 2003). A clorexidina é frequentemente usada em combinação com outras drogas para o tratamento da ceratite amebiana, e tem apresentado resultados quando há diagnóstico precoce. O tratamento da ceratite é eficiente, porém é demorado e se não realizado corretamente pode levar à recidiva da doença. Este fato está relacionado à presença de formas císticas que podem permanecer por meses no local da infecção sem causar sintomas ao hospedeiro. No entanto, uma interrupção do tratamento pode ocasionar o ecistamento e, por consequência, o reaparecimento dos sintomas. Essa resistência torna o tratamento prolongado, também aumentando seu custo (MARCIANO-CABRAL, 2003).



Figura 5: Ceratite provocada por *Acanthamoeba*. Figura reproduzida de Srinivasan et al., 2008.

A encefalite amebiana granulomatosa (EAG) é uma infecção cerebral rara, com potencial fatal, que afeta comumente indivíduos imunossuprimidos (KHAN, 2003). O processo de infecção tem início quando o protozoário entra pelas vias aéreas e posteriormente tem acesso a corrente sanguínea. Uma vez na corrente sanguínea, os trofozoítos chegam até a barreira hematoencefálica. Este tropismo pelo sistema nervoso se deve à quimiotaxia gerada por neurotransmissores (TALMÁS-LARA et al., 2022). Os trofozoítos de *A. castellanii* são capazes de ultrapassar a barreira hematoencefálica através de danos causados pela liberação de proteases às junções de adesão. Uma vez no tecido nervoso, ocorre a sinalização celular para a adesão e a liberação de proteases que causarão dano irreversível ao tecido (Figura 6). Os sintomas incluem dor de cabeça, febre, tontura, náusea e vômitos (KHAN, 2003). Além da rapidez em que a doença progride, ainda não há comercialmente um medicamento que tenha se mostrado efetivo no tratamento da EAG, se tratando de uma doença quase sempre fatal (KHAN, 2007).

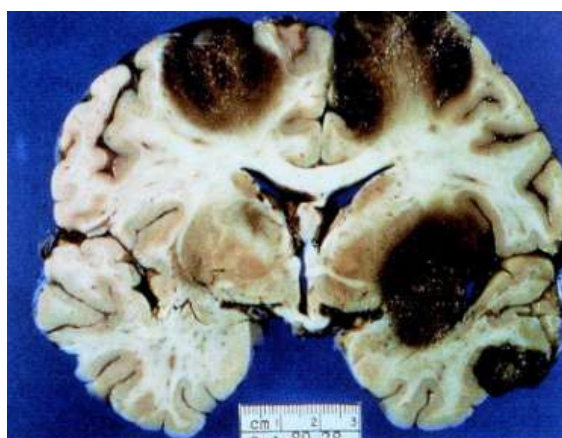


Figura 6: Encefalite amebiana granulomatosa, apresentando necrose cortical e subcortical (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003).

1.3. 3'-nucleotidase/nuclease

As ectoenzimas são enzimas, proteínas catalisadoras, associadas à membrana plasmática da célula com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular. Essas enzimas são capazes de mediar diversas funções biológicas, como controle de crescimento, atividade, diferenciação, adesão e regulação celular (COSENTINO-GOMES & MEYER-FERNANDES).

A 3'-nucleotidase/nuclease é uma enzima bifuncional que possui atividade como nucleotidase e como nuclease. (FREITAS-MESQUITA & MEYER-FERNANDES, 2017). Ela já foi descrita anteriormente em diferentes protozoários como *Leishmania amazonensis* (PALETTA-SILVA et al., 2011), *Trypanosoma brucei* (GBENLE; OPPERDOES; VAN ROY, 1986), *Trypanosoma rhodesiense* (GOTTLIEB; GARDINER; DWYER, 1986), *Leishmania dovani* (THOMAS A. CAMPBELL et al, 1991), *C. luciliae* (YAMAGE et al., 2000), *Leishmania Mexicana* (SOPWITH et al., 2002). Atuando como nuclease, essa enzima cliva a ligação fosfodiéster dos nucleotídeos entre as extremidades 3' e 5' dos ácidos nucleicos. Enquanto nucleotidase, seus substratos são nucleotídeos 3'-monofosforilados, gerando como produtos o nucleosídeo correspondente além de P_i . Dentre estes substratos, destaca-se o adenosina-3'-monofosfato (3'-AMP) que, quando hidrolisado, gera adenosina.

O 3'-AMP diferencia-se do adenosina-5'-monofosfato (5'-AMP), amplamente estudado por ser substrato da 5'-nucleotidase (CD73), devido ao posicionamento do seu grupo fosfato. Como observado na figura 7, o grupo fosfato está ligado ao terceiro carbono da ribose no 3'-AMP, já no 5'-AMP, a ligação do fosfato ocorre no quinto carbono da ribose. Estes nucleotídeos também se diferenciam por sua origem. Enquanto o 5'-AMP tem o adenosina-trifosfato (ATP) como seu precursor, o 3'-AMP origina-se da clivagem do adenosina 2',3'-monofosfato cíclico (2'3'-cAMP) em 2'AMP e 3'-AMP, através da ação de 2',3'-cAMP-fosfodiesterases (Figura 8) (YAMAGATA et al., 1982).

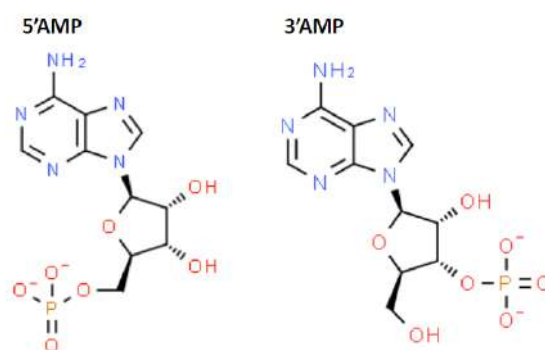


Figura 7: Comparação estrutural de 5'-AMP e 3'-AMP (Adaptado de chemspider.com).

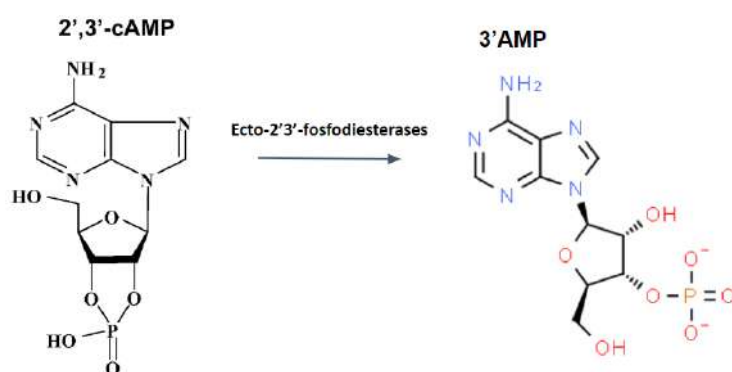


Figura 8: Geração de 3'-AMP. Hidrólise do 2',3'-AMP cíclico por 2',3'-fosfodiesterases formando 3'-AMP como produto da reação (Adaptado de chemspider.com).

Em diversos microrganismos a atividade 3'-nucleotídase tem como papel biológico a disponibilização de nutrientes essenciais como purinas e P_i . Já foi relatado que espécies de *Acanthamoeba* são capazes de realizar a síntese de novo de purinas, no entanto, sua principal fonte de purinas é através da via de salvação (HASSAN & COOMBS, 1987). Além da participação no metabolismo energético, a adenosina desencadeia eventos de sinalização através da ligação a receptores purinérgicos, modulando a resposta imune do hospedeiro de modo a favorecer a evasão do protozoário (COUTINHO-SILVA R, 2012; GUIMARÃES-COSTA, A. B., 2014). Já o P_i , também liberado na hidrólise do 3'-AMP, pode ser internalizado por transportadores presentes na membrana e utilizado em processos metabólicos, principalmente na síntese de ATP mitocondrial (CARVALHO-KELLY et al., 2020).

1.4. Metabolismo purinérgico em *Acanthamoeba castellanii*

Os nucleotídeos possuem diversas funções biológicas importantes nos organismos, como o estoque de energia (ATP e GTP), participação na síntese de ácidos nucleicos e em processos de transdução de sinal como moléculas sinalizadoras (cAMP e cGMP) (CARTER et al., 2008; KOUNI, 2003). Inicialmente o precursor da síntese desses nucleotídeos é a inosina-5'-monofosfato (5'-IMP), derivado da metabolização da ribose-5-fosfato. O 5'-IMP é o principal precursor dos outros nucleotídeos monofosforilados, já que através da via de

salvação de purinas ocorre a interconversão do mesmo em diferentes nucleotídeos (HAMMOND & GUTTERIDGE, 1984).

Embora *A. castellanii* seja capaz de realizar a síntese de novo de purinas, o rendimento desta via não é o suficiente para suprir a demanda necessária para sua sobrevivência. Portanto, para garantir níveis adequados de purinas, estes parasitas recorrem a via de salvação utilizando-se de purinas pré-formadas obtidas de seu hospedeiro vertebrado ou de microrganismos utilizados como fonte de nutrientes (HASSAN & COOMBS, 1986).

A via de salvação de purinas presente em *A. castellanii* é muito semelhante a presente em demais protozoários, sendo somente a enzima AMP deaminase não descrita no parasito. Na figura 9, podemos observar as etapas e as enzimas envolvidas na salvação de purinas. As enzimas denominadas adenilosuccinato sintetase (S-AMP sintetase) e adenilosuccinato liase (S-AMP liase) são as responsáveis pela conversão do 5'-IMP em adenosina 5'-AMP. Por outro lado, as enzimas IMP desidrogenase, GMP sintetase e GMP redutase são responsáveis pela interconversão entre 5'-IMP, xantosina 5'-monofosfato (5'-XMP) e guanosina 5'-monofosfato (5'-GMP) (KOUNI, 2003).

As etapas de conversão de nucleosídeos em nucleotídeos são mediadas por quinases e fosfo-transferases. Ambas as classes de enzimas atuam fosforilando os nucleosídeos, contudo, enquanto as quinases utilizam a energia proveniente do ATP, as fosfo-transferases empregam ésteres de fosfato de baixa energia, como os nucleosídeos monofosfatos (5'-NMPs). O processo inverso, ou seja, a desfosforilação dos nucleotídeos, é realizado pelas nucleotidases, que os convertem novamente em nucleosídeos (KOUNI, 2003).

A conversão de nucleosídeos em bases nitrogenadas ocorre através da ação das fosforilases e hidrolases. As fosforilases realizam a clivagem dos nucleosídeos por meio da fosforilação, resultando na liberação da base nitrogenada e da ribose fosforilada no carbono 1 (ribose-1-fosfato). Por outro lado, as hidrolases promovem a clivagem dos nucleosídeos utilizando uma molécula de água, gerando a base nitrogenada e a ribose como produtos (KOUNI, 2003). As deaminases são responsáveis por remover um grupo amino, levando à conversão de nucleotídeos de adenina em nucleotídeos de hipoxantina ou de guanina em nucleotídeos de xantina. Por fim, as fosforribosil-transferases (PRTs) convertem diretamente uma base nitrogenada em 5'-NMP. Para efetuar essa conversão, as PRTs consomem uma molécula de fosforribosil pirofosfato (PRPP) e liberam uma molécula de pirofosfato (PP_i) como produto (KOUNI, 2003).

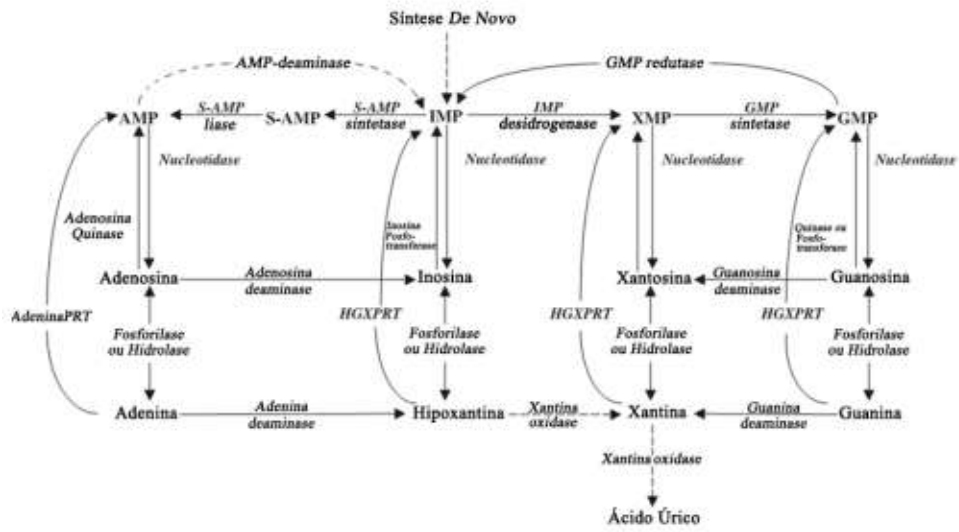


Figura 9: Via de salvação de purinas descrita em *A. castellanii*. As setas pontilhadas representam enzimas cuja atividade não foi detectada no trofozoítos do parasita. (Adaptada de: Kouni 2003 e Hassan & Coombs, 1986)

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Tendo em vista a importância da 3'-nucleotidase/nuclease para diferentes processos biológicos do protozoário e o fato desta enzima ainda não ter sido descrita em nenhuma ameba de vida livre, o objetivo deste projeto é caracterizar a atividade 3'-nucleotidásica em *A. castellanii* e investigar sua importância fisiológica.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a dependência do tempo da densidade celular;
- Identificar a localização da enzima;
- Identificar a faixa de pH ótima da hidrólise de 3'-AMP;
- Avaliar o efeito do DTT na atividade 3'-nucleotidásica;
- Avaliar o efeito de diferentes quelantes e metais na hidrólise de 3'-AMP;
- Definir os parâmetros cinéticos dessa atividade enzimática;
- Analisar a capacidade de hidrólise de outros nucleotídeos por *A. castellanii*;
- Comparar a atividade 3'-nucleotidásica nas diferentes formas de vida da ameba.

3. METODOLOGIA

3.1. Meio de cultura

Os trofozoítos de *A. castellanii* foram cultivados em meio PYG (20 g/L peptona, 1g/L extrato de levedura, 1g/L de citrato de sódio, 100 mM de glicose, 0,05 M de CaCl₂, 0,4 M de MgSO₄, 0,25 M de Na₂HPO₄, 0,005 M de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, 0,25 M de KH₂PO₄ pH 6,5) sem a adição de soro fetal bovino. As células foram mantidas por 48 h na estufa de 28° C.

3.2. Encistamento

Para formação dos cistos, os trofozoítos foram incubados em meio de encistamento (95 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 8 mM de MgSO₄, 0,4 mM de CaCl₂, NaHCO₃, 20mM de Tris-HCl (pH 9,0)). As células foram mantidas a 28°C por 72 h.

Para calcular o percentual de encistamento as células foram desprendidas da garrafa e uma alíquota foi retirada para contagem. Foi adicionado 0,5% de SDS por 30 minutos para solubilizar os trofozoítos e os cistos imaturos. As células foram novamente contadas para calcular o percentual de encistamento seguindo a equação:

$$\% \text{ de encistamento} = \text{n}^\circ \text{ de células pós SDS} / \text{n}^\circ \text{ de células pré SDS}.$$

3.3. Ensaio da atividade

As células foram desprendidas da garrafa de cultura e, centrifugadas a 1000 g durante 5 minutos. As células foram lavadas por três vezes com tampão A (116 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 5,5M Dextrose, 50 mM de HEPES). As células foram contadas e ajustadas para a densidade de 2×10^6 células/mL. As células foram então incubadas por 1 hora a 37°C, em um meio de reação contendo 1 mM de 3'-AMP e tampão A. Ao final da reação, as células foram centrifugadas em 1000 g por 5 minutos. Uma alíquota de 100 µl de cada um dos sobrenadantes foi coletada e transferida para uma placa de 96 poços, na qual também foi adicionado 100 µl do reagente de Fiske-Subbarow. A atividade foi quantificada utilizando um espectrofotômetro no comprimento de onda de 650 nm. A concentração de fosfato

liberada a partir da hidrólise de 3'-AMP foi calculada a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de KH_2PO_4 (FISKE e SUBBAROW, 1925).

3.3.1. Curso temporal e densidade celular

A hidrólise de 3'-AMP foi determinada em diferentes tempos de reação, que variaram entre 10 e 60 minutos. Também foi realizada a atividade com diferentes densidades celulares, variando entre 1 e 5×10^6 células/mL, em 60 minutos de incubação.

3.3.2. Atividade ecto-fosfohidrolásica

Para determinar o substrato fosforilado preferencialmente hidrolisado por trofozoítos de *A. castellanii*, o ensaio da atividade foi realizado na presença de diferentes substratos fosforilados 3'-AMP (1 mM), 5'-AMP (1 mM), ATP (1 mM), ADP (1 mM), *p*-NPP (1 mM) e β -GP (1 mM). A análise de modulação pelo inibidor a atividade foi realizada na ausência e na presença de 1 mM de DTT.

3.3.3. Influência do pH

A atividade 3'-nucleotidásica foi avaliada em diferentes faixas de pH, os experimentos foram realizados utilizando o tampão 0,1 M MES-HEPES-TRIS. Os ensaios ocorreram em diferentes faixas de pH, variando de 4,0 a 9,0. A análise da modulação por levamisol foi realizada em pH 9,0, na presença de 1 mM do inibidor.

3.3.4 Efeito dos metais

A atividade 3'-nucleotidásica foi realizada na presença dos metais CuCl_2 e MgCl_2 na concentração de 1mM. O ensaio também foi realizado na presença dos quelantes de íons metálicos EDTA e EGTA na concentração de 1 mM.

3.4. Análise Estatística

Em todos os casos, pelo menos, três experimentos independentes foram realizados em triplicata. Os valores apresentados em todos os experimentos representam a média \pm S.E.M. Os parâmetros cinéticos (valores de K_m aparente e de V_{max}) foram calculados usando

análise de regressão não linear dos dados para a equação de Michaelis-Menten. A comparação entre as diferentes condições foi feita utilizando Teste t não pareado de Student. Para comparação de médias com o controle foi utilizado o teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando software Prism 5.0 ou 6.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA).

4. RESULTADOS

A atividade 3'-nucleotidásica de *A. castellanii* foi realizada analisando a influência da densidade celular e do tempo. Foi possível observar uma atividade linear até a concentração de 5×10^6 células/mL e até o tempo de 60 minutos. A partir destes dados foram utilizadas nos próximos experimentos a densidade de 2×10^6 células/mL e o tempo de 60 minutos (Figura 10).

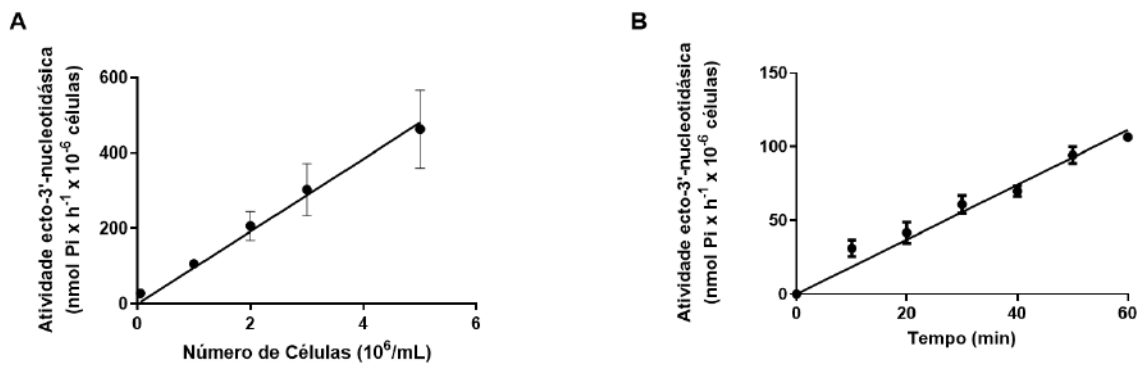


Figura 10: Dependência da densidade celular e do curso temporal na atividade 3'-nucleotidásica de *A. castellanii*. Análise da atividade 3'-nucleotidásica em função da densidade celular (A). Foi observado um aumento diretamente proporcional na atividade comparado ao aumento do número de células até a concentração de 5×10^6 . Análise da atividade 3'-nucleotidásica em função do tempo (B). Foi observado um aumento linear da atividade até 60 minutos (n=3).

A análise da atividade 3'-nucleotidásica foi realizada utilizando células íntegras e células lisadas e não foi observada diferença significativa entre os valores de atividade. Esse resultado corrobora com o fato da ecto-3'-nucleotidase estar presente apenas na superfície da membrana celular do parasita (Figura 11).

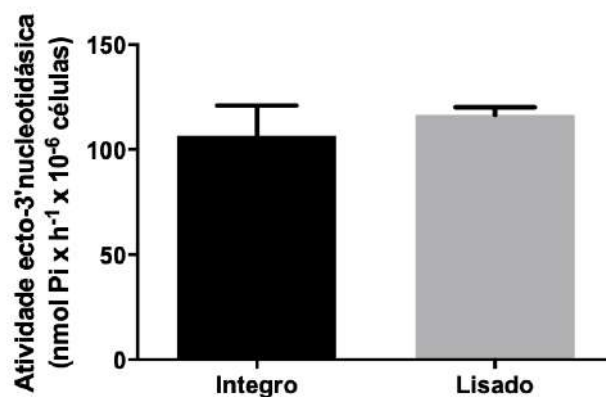


Figura 11: Atividade 3'-nucleotidásica em células íntegras e lisadas. A barra preta representa a atividade de trofozoítos intactos enquanto a barra cinza representa a atividade do lisado celular, obtido após três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. Não há diferença significativa entre as duas barras apresentadas (n=3).

Além do 3'-AMP, os trofozoítos foram capazes de hidrolisar os seguintes substratos fosforilados: 5'-AMP, ATP, ADP, *p*-NPP e β -GP. Como observado na figura 12, a ecto-3'-nucleotidase é notoriamente a maior atividade ecto-fosfohidrolásica presente em *A. castellanii*.

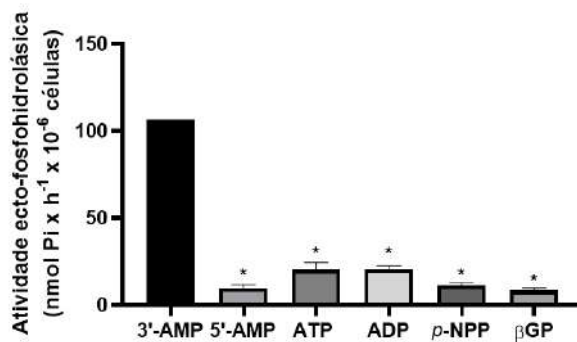


Figura 12: Hidrólise de diferentes substratos fosforilados por trofozoítos de *A. castellanii*. Os trofozoítos foram capazes de hidrolisar com maior eficiência o 3'-AMP quando comparado aos demais substratos fosforilados: 5'AMP , ATP , ADP , *p*-NPP e β -GP. Todos os substratos foram testados na concentração de 1mM (n=3).

A análise da influência do pH na atividade 3'-nucleotidásica demonstrou um aumento da atividade na faixa alcalina do pH (Figura 13 A). Para descartar a participação de uma

ecto-fosfatase na hidrólise do 3'-AMP foi testado o efeito do levamisol, um inibidor clássico de fosfatase alcalina, que nada influenciou na atividade 3'-nucleotídica (Figura 13 B).

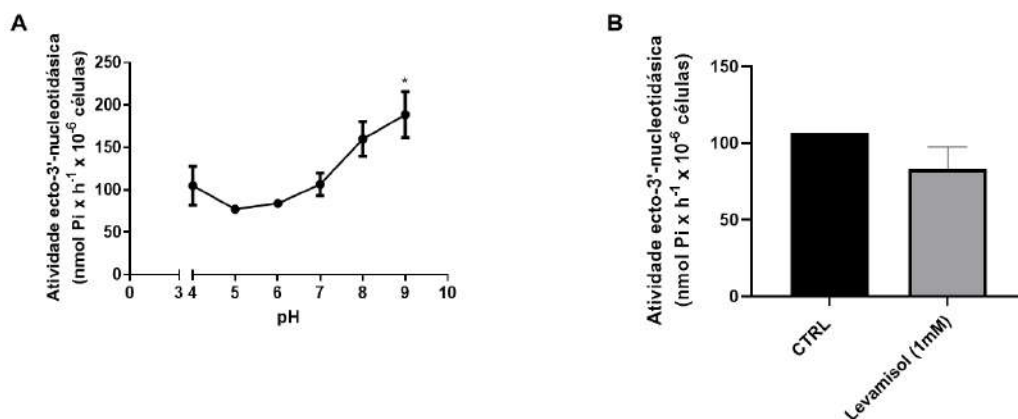


Figura 13: Influência do pH na atividade 3'-nucleotídica de *A. castellanii*. A análise foi feita nas faixas de pH do 4 ao 9. Foi possível observar uma maior atividade na faixa alcalina. Para esse experimento foi utilizado um tampão equimolar contendo 0.1 M MES-HEPES-TRIS (A). Na presença de 1 mM de levamisol, um inibidor clássico de fosfatase alcalina, a atividade não se altera de forma significativa (B). As células estavam viáveis em todas as faixas de pH utilizados (dados não mostrados) (n=3).

A relação entre a atividade e as concentrações crescentes de 3'-AMP demonstraram a afinidade da enzima pelo substrato. A atividade observada apresentou um padrão cinético de Michaelis-Menten com valores de K_m e de V_{max} de respectivamente $0,457 \pm 0,039$ mM de 3'-AMP e $154 \pm 3,240$ nmol de $P_i \times h^{-1} \times 10^6$ células (Figura 14).

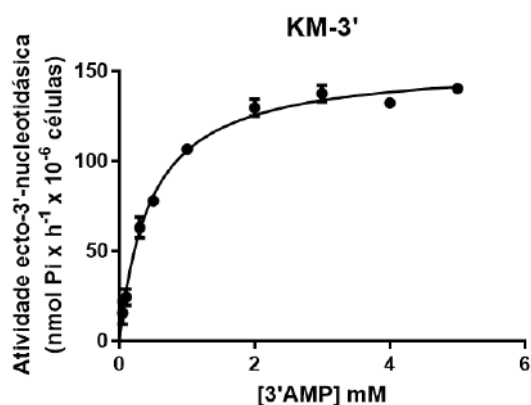


Figura 14: Influência de concentrações crescentes de substrato na atividade 3'-nucleotídica de *A. castellanii*. O gráfico apresenta o perfil Michaeliano com valores de K_m e V_{max} descritos no texto acima. A cinética foi realizada com as seguintes concentrações de 3'-AMP: 0,05 mM; 0,1 mM; 0,3 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 3 mM; 4 mM; 5 mM) (n=3).

A atividade foi ensaiada na presença dos metais CuCl_2 e MgCl_2 , além dos quelantes de íons metálicos EDTA e EGTA. Foi observada uma modulação inibitória dos quelantes e do CuCl_2 , enquanto o MgCl_2 não apresentou mudança significativa da atividade observada no controle (Figura 15).

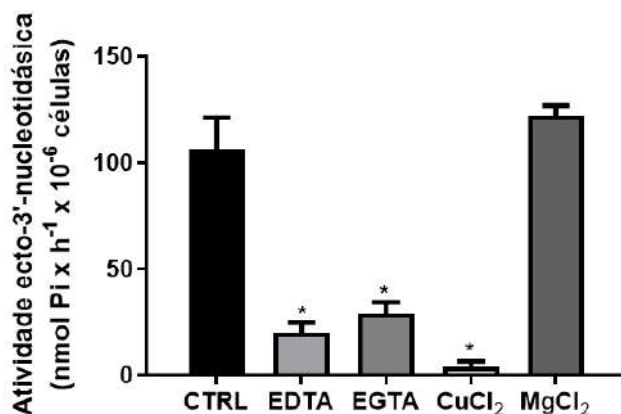


Figura 15: Atividade 3'-nucleotidásica de *A. castellanii* na presença de metais e quelantes. Os quelantes de íons de metais, EDTA (1 mM) e EGTA (1 mM) foram capazes de inibir a atividade, assim como a presença do CuCl_2 (1 mM). A adição de MgCl_2 (1 mM) não foi capaz de modular a hidrólise 3'-AMP (n=3).

A atividade 3'-nucleotidásica foi avaliada nas duas formas de vida de *A. castellanii*, cisto e trofozoíto, durante 60 minutos. Os trofozoítos apresentaram uma atividade significativamente mais elevada que aquela observada nos cistos. (Figura 16).

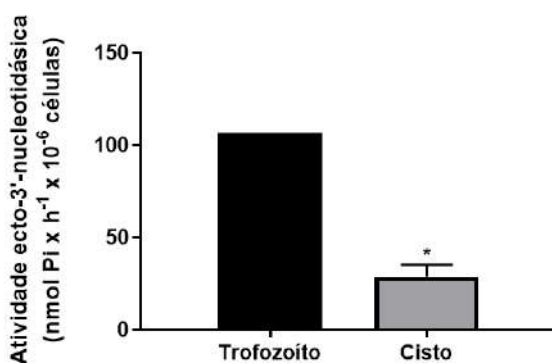


Figura 16: Atividade 3'-nucleotidásica analisada nas duas formas de vida da *A. castellanii*. O trofozoíto apresenta uma atividade duas vezes maior que o cisto. As células foram incubadas por 60 minutos em meio de reação contendo 1 mM de 3'-AMP (n=3).

A presença de 1 mM de DTT no meio de reação foi capaz de modular a atividade 3'-nucleotidásica. Ao comparar com demais substratos fosforilados, analisando uma atividade relativa, é possível observar que a única atividade inibida pela presença do DTT é a da 3'-nucleotidase (Figura 17).

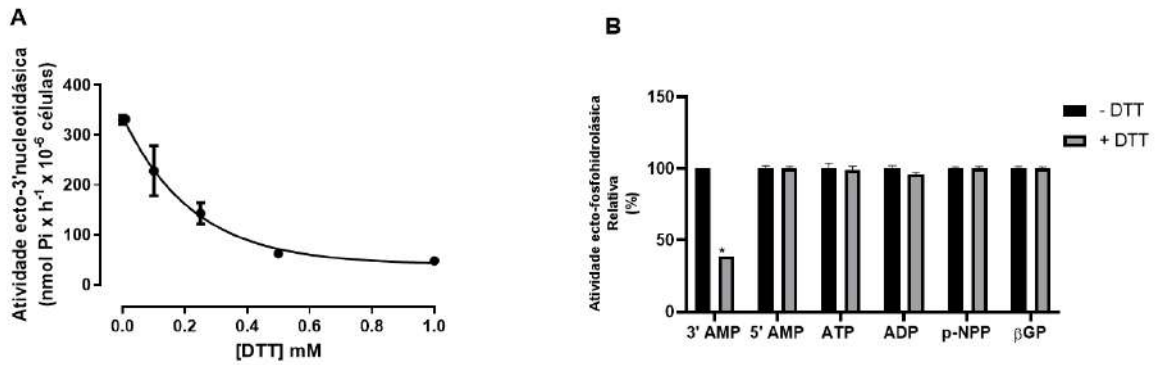


Figura 17: Modulação da atividade ecto-fosfohidrolásica por DTT. O DTT é capaz de inibir a atividade ecto-3'-nucleotidásica de forma dose dependente (A). E ao comparar a atividade fosfo-hidrolásica de substratos fosforilados na presença e ausência de DTT (1 mM), foi observado somente efeito inibitório na hidrólise de 3'AMP (B) (n=3).

5. DISCUSSÃO

A justificativa de se estudar a atividade 3'-nucleotidásica em microrganismos se dá pelo fato de que não foi descrita até hoje a presença desta enzima nas células de hospedeiros vertebrados. Essa enzima já foi descrita em outros protozoários, mas nunca foi caracterizada em uma ameba de vida livre. Neste trabalho foi realizada a caracterização bioquímica da atividade ecto-3'-nucleotidásica de *A. castellanii*. A 3'-nucleotidase/nuclease é uma ectoenzima fundamental no fornecimento de nutrientes essenciais para os parasitos. Através da hidrólise do 3'-AMP, seu substrato preferencial, ocorre a liberação de adenosina e P_i , que atuam como fonte de purinas e na síntese de ATP, respectivamente (CARVALHO-KELLY et al., 2020; PALETTA-SILVA et al., 2011). O 3'-AMP tem origem através da hidrólise de 2',3'-cAMP por 2',3'-cAMP-fosfodiesterases, gerando como produto 2'AMP, 3'AMP e adenosina (YAMAGATA et al., 1982). O 2',3'-cAMP é liberado pela célula em casos de estresses, lesões e injúrias teciduais (JACKSON & GILLESPIE, 2012). Os trofozoítos de *A. castellanii*, ao iniciarem seu processo de infecção, causam lesões e injúrias no tecido alvo, podendo levar à liberação de 2',3'-cAMP no sítio da infecção. Algumas células de mamíferos possuem em sua membrana ecto-fosfodiesterases capazes de gerar 3'-AMP (YAMAGATA et al., 1982). Além disso alguns microrganismos possuem uma enzima bifuncional que é capaz de hidrolisar o 2',3'-cAMP e subsequentemente o 3'-AMP gerando adenosina e P_i . Nesse contexto, tanto as células epiteliais quanto os trofozoítos poderiam estar contribuindo para a geração de 3'-AMP no local da infecção.

Inicialmente, foram avaliadas a influência do tempo e da densidade celular na hidrólise de 3'-AMP. A atividade da ecto-enzima aumentou de forma linear com a densidade celular e com o tempo, até 60 minutos (Figura 10). A partir destes resultados, os próximos experimentos foram realizados durante 60 minutos com 2×10^6 células/mL. Em *A. castellanii* a 3'-nucleotidase está presente exclusivamente na membrana plasmática, uma vez que tanto a célula íntegra quanto a lisada não apresentam diferença significativa na atividade nucleotidásica (Figura 11).

Dentre os substratos que o trofozoíto de *A. Castellanii* hidrolisa, 3'AMP, 5'AMP e ATP são importantes no fornecimento de adenosina para a demanda metabólica do parasita. A alta atividade 3'-nucleotidásica (Figura 12) sugere que além de suprimento nutricional, a enzima desempenha um papel importante na

geração de adenosina, contribuindo para a regulação da resposta imune do hospedeiro, favorecendo o estabelecimento da infecção. Estes resultados em conjunto sugerem que os trofozoítos de *A. castellanii* possuem em sua membrana uma genuína 3'-nucleotidase/nuclease.

A enzima exibiu maior atividade nas faixas alcalinas de pH (Figura 13). Assim como visto em *L. amazonensis* (PALETTA-SILVA et al., 2011), *L. dovani* (THOMAS A. CAMPBELL et al, 1991) e em *C. luciliae* (THOMAS A. NEUBERT & MICHAEL GOTTLIEB, 1989). O aumento da atividade em pHs alcalinos poderia ocorrer por contribuição de uma fosfatase alcalina, essa hipótese foi descartada, já que a adição de 1mM de levamisol não foi capaz de inibir a atividade da enzima. Assim como observado em *L. amazonensis*, onde o inibidor não foi capaz de modular a atividade 3'-nucleotidásica em pH alcalino (PALETTA-SILVA et al., 2011).

A curva da afinidade da enzima pelo substrato 3'-AMP, apresentou uma cinética de Michaelis-Menten com valor de $K_m = 0,457 \pm 0,039$ mM de 3'-AMP e $V_{m\acute{a}x} = 154 \pm 3,240$ nmol de $P_i \times h^{-1} \times 10^{-6}$ células (Figura 14). Como observado na tabela I, a *A. castellanii* apresenta valor de K_m similar a *C. luciliae*, estes valores entretanto são maiores do que os observados em *L. amazonensis* (PALETTA-SILVA et al., 2011) e *L. donovani* (GBENLE AND DWYER, 1992), sendo assim, a enzima presente em *A. castellanii* apresenta menor afinidade pelo substrato.

Tabela 1: Valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ de 3'-nucleotidasas de diferentes microrganismos.

Modelo	K_m (3'AMP)	$V_{m\acute{a}x}$	Referência
<i>A. castellanii</i>	0,457 mM	154 nmol de P_i	
<i>C. Luciliae</i>	0,4 mM	1470 U/mg	(THOMAS A. NEUBERT & MICHAEL GOTTLIEB, 1989)
<i>L. amazonensis</i>	0,088 mM	923,71 nmol de P_i	(PALETTA-SILVA et al., 2011)
<i>L. donovani</i>	0,17 mM	2645 U/mg	(GBENLE AND DWYER, 1992)
<i>L. mexicana</i>	0,58 mM	NI*	(HASSAN & COOMBS, 1987)

* NI: o valor não está indicado na referência

A adição de $CuCl_2$ e de diferentes quelantes de íons metálicos foi capaz de modular a atividade 3'-nucleotidásica (Figura 15). A presença de íons de cobre foi capaz inibir cerca de 95% da atividade da enzima. A presença de Cu^{2+} gera a inibição da 3'-nucleotidase pela a ligação dos íons metálicos a resíduos de aminoácidos específicos na enzima que estão envolvidos na atividade catalítica (PALETTA-SILVA, et al, 2012). A família de nucleases de classe I, a qual a 3'-nucleotidase/nuclease pertence, possuem em sua estrutura resíduos de histidina, que são responsáveis pela coordenação de íons de Zn^{2+} no sítio catalítico (DEBRABANT et al., 1995). Como dador de elétrons, os resíduos de histidina também são potenciais sítios para a ligação de Cu^{2+} em múltiplas proteínas. A ligação do cobre promove uma mudança conformacional no sítio catalítico da proteína, resultando em uma alteração da atividade enzimática (JANCSÓ et al., 2009).

Os trofozoítos de *A. castellanii* possuem uma maior capacidade de hidrólise de 3'-AMP quando comparados aos cistos (Figura 16). Esse resultado sugere que esta enzima pode ser importante para processos de adesão e invasão a células do hospedeiro uma vez que os cistos não são capazes de estabelecer o processo infeccioso. Porém, o papel da enzima não pode ser descartado para nutrição dos cistos, uma vez que não há descrição do metabolismo purinérgico nesta forma de vida do protozoário.

Além disso, demonstramos que a hidrólise de 3'-AMP é a atividade ecto-fosfohidrolásica predominante na membrana plasmática dos trofozoítos e a

única modulada por DTT (Figura 16). Já foi demonstrado em *C. luciliae* que esse composto é capaz de alterar a estabilidade da enzima e inibir sua atividade (T.A. NEUBERT, M. GOTTLIEB, 1990). O DTT é um agente redutor, capaz de quebrar as pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína que existem na proteína, o que pode causar mudanças estruturais que interferem na sua capacidade de hidrólise.

6. CONCLUSÃO

Podemos concluir que os trofozoítos de *A. castellanii* apresentaram uma maior atividade quando comparados com os cistos e que a enzima está localizada exclusivamente na membrana plasmática do parasita. A atividade da enzima foi linear até 60 minutos e o número de 5×10^5 células/mL. A atividade foi maior em pH alcalino, como já é observado em outros protozoários e apresenta uma cinética michaeliana. Também podemos concluir que dentre diferentes substratos utilizados o 3'-AMP é o que possui a maior taxa de hidrólise. E que a atividade da enzima é inibida pela presença de íons de Cu^{2+} e por quelantes de íons metálicos como EDTA e EGTA. Esta atividade foi inibida por DTT, porém o mecanismo de inibição e as consequências da mesma sobre os trofozoítos de *A. castellanii* ainda precisam ser estudados.

7. REFERÊNCIAS

ALAIN D., GOTTLIEB M.; DWYER D. Isolation and characterization of the gene encoding the surface membrane 3'-nucleotidase/nuclease of *Leishmania donovani*, **Molecular and Biochemical Parasitology**, Volume 71, 1995. DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(95\)00035-Y](https://doi.org/10.1016/0166-6851(95)00035-Y).

BETTENDORFF, L.; WIRTZFELD, B.; MAKARCHIKOV, A. *et al.* Discovery of a natural thiamine adenine nucleotide. **Natural Chemical Biology**, Volume 3, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/nchembio867>

CAMPBELL T.A.; ZLOTNICK G.W.; NEUBERT T.A.; SACCI JB JR, GOTTLIEB M. Purification and characterization of the 3'-nucleotidase/nuclease from promastigotes of *Leishmania donovani*. **Mol Biochem Parasitol.** 1991. DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(91\)90153-w](https://doi.org/10.1016/0166-6851(91)90153-w)

CARVALHO-KELLY, L. F., DICK, C. F., ROCCO-MACHADO, N., GOMES-VIEIRA, A. L., PAES-VIEIRA, L., & MEYER-FERNANDES, J. R. Anaerobic ATP synthesis pathways and inorganic phosphate transport and their possible roles in encystment in *Acanthamoeba castellanii*. **Cell Biology International.** 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbin.11830>.

CARVALHO-KELLY LF, PRALON CF, ROCCO-MACHADO N, NASCIMENTO MT, CARVALHO-DE-ARAÚJO AD, MEYER-FERNANDES JR. *Acanthamoeba castellanii* phosphate transporter (AcPHS) is important to maintain inorganic phosphate influx and is related to trophozoite metabolic processes. **J Bioenerg Biomembr.** 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10863-020-09822-y>

CARTER, N.S., YATES, P., ARENDT, C.S., BOITZ, J.M., ULLMAN, B. Purine and Pyrimidine Metabolism in *Leishmania*. **Drug Targets in Kinetoplastid Parasites.** Advances In Experimental Medicine And Biology, vol 625. 2008. DOI: https://doi.org/10.1007/978-0-387-77570-8_12

COSENTINO-GOMES D, MEYER-FERNANDES JR. Ecto-phosphatases in protozoan parasites: possible roles in nutrition, growth and ROS sensing. **J Bioenerg Biomembr.** 2011; DOI: <http://doi.org/10.1007/s10863-011-9334-y>

COUTINHO-SILVA R, OJCIUS DM. Role of extracellular nucleotides in the immune response against intracellular bacteria and protozoan parasites. **Microbes Infect.** 2012. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.05.009>

FECHTALI-MOUTE Z, LOISEAU PM AND POMEL S. Stimulation of *Acanthamoeba castellanii* excystment by enzyme treatment and consequences on trophozoite growth. **Front. Cell Dev. Biol.** 2022. DOI: <http://doi.org/10.3389/fcell.2022.982897>

FISKE, C. H., SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **Journal of Biological Chemistry.** 1925. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)84756-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)84756-1)

FOUQUE E, TROUILHÉ MC, THOMAS V, HARTEMANN P, RODIER MH, HÉCHARD Y. Cellular, biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoebae. **Eukaryot Cell.** 2012. DOI: <http://doi.org/10.1128/EC.05301-11>.

FREITAS-MESQUITA AL, MEYER-FERNANDES JR. 3'nucleotidase/nuclease in protozoan parasites: Molecular and biochemical properties and physiological roles. **Exp Parasitol.** 2017. DOI:<http://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.06.001>

GARATE M, CUBILLOS I, MARCHANT J, PANJWANI N. Biochemical characterization and functional studies of *Acanthamoeba* mannose-binding protein. **Infect Immun.** 2005. DOI: <http://doi.org/10.1128/IAI.73.9.5775-5781.2005>

GARATE M, MARCHANT J, CUBILLOS I, CAO Z, KHAN NA, PANJWANI N. In vitro pathogenicity of *Acanthamoeba* is associated with the expression of the mannose-binding protein. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 2006. DOI: <http://doi.org/10.1167/iovs.05-0477>

GBENLE GO, DWYER DM. Purification and properties of 3'-nucleotidase of *Leishmania donovani*. **Biochem Journal.** 1992. DOI: <http://doi.org/10.1042/bj2850041>.

GBENLE, G.O, OPPERDOES, F.R., VAN ROY, J. Localization of 3'- nucleotidase and calcium-dependent endoribonuclease in the plasma-membrane of *Trypanosoma brucei*. **Acta Trop.** 1986. 43, 295-305.

GOTTLIEB, M., GARDINER, P. R., DWYER, D.M., 3'-nucleotidase activity in procyclic and bloodstream stages of *Trypanosoma rhodesiense*. **Comp. Biochem. Physiol.** 1986. DOI: [http://doi.org/10.1016/0305-0491\(86\)90332-9](http://doi.org/10.1016/0305-0491(86)90332-9).

GUIMARÃES-COSTA AB, DESOUZA-VIEIRA TS, PALETTA-SILVA R, FREITAS-MESQUITA AL, MEYER-FERNANDES JR, SARAIVA EM. 3'-nucleotidase/nuclease activity allows *Leishmania* parasites to escape killing by neutrophil extracellular traps. **Infect Immun.** 2014. DOI: <http://doi.org/10.1128/IAI.01232-13>.

HAMMOND, A.J.; GUTTERIDGE, W.E. Purine and Pyrimidine Metabolism in the Trypanosomatidae. **Mol Biochem Parasitol.**, 1984. DOI: [http://doi.org/10.1016/0166-6851\(84\)90117-8](http://doi.org/10.1016/0166-6851(84)90117-8).

HASSAN, H. F., & COOMBS, G. H. Purine salvage by *Acanthamoeba castellanii*. **Journal for Parasitology**, Volume 17, Issue 7, 1987. DOI: [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(87\)90091-9](https://doi.org/10.1016/0020-7519(87)90091-9).

HASSAN, H. F., & COOMBS, G. H. Phosphomonoesterases of *Leishmania mexicana mexicana* and others flagellates. **Mol Biochem Parasitol**, 1987. DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(87\)90035-1](https://doi.org/10.1016/0166-6851(87)90035-1)

JACKSON E. K.; GILLESPIE D. G. Extracellular 2',3'-cAMP and 3',5'-cAMP stimulate proliferation of preglomerular vascular endothelial cells and renal epithelial cells. **Am. J. Physiol. Renal. Physiol.** 2012. PMID: 22791337

JANCSÓ A.; KOLOZSI A.; GYURCSIK B.; NAGY N.; GAJDA T., Probing the Cu²⁺ and Zn²⁺ binding affinity of histidine-rich glycoprotein, **Journal of Inorganic Biochemistry**, Volume 103, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.09.002>.

KIM JH, MATIN A, SHIN HJ, PARK H, YOO KT, YUAN XZ, KIM KS, JUNG SY. Functional roles of mannose-binding protein in the adhesion, cytotoxicity and phagocytosis of *Acanthamoeba castellanii*. **Exp Parasitol.** 2012. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.08.007>.

KHAN NA. Pathogenesis of Acanthamoeba infections. **Microb Pathog.** 2003. DOI: [http://doi.org/10.1016/s0882-4010\(03\)00061-5](http://doi.org/10.1016/s0882-4010(03)00061-5).

KHAN NA. Acanthamoeba invasion of the central nervous system. **Int J Parasitol.** 2007. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.11.010>.

KOUNI, M.H. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. **Pharmacol Ther.**, 2003. DOI: [http://doi.org/10.1016/s0163-7258\(03\)00071-8](http://doi.org/10.1016/s0163-7258(03)00071-8).

MARCIANO-CABRAL F, CABRAL G. Acanthamoeba spp. as agents of disease in humans. **Clin Microbiol Rev.** 2003. DOI: [10.1128/CMR.16.2.273-307.2003](http://doi.org/10.1128/CMR.16.2.273-307.2003)

PALETTA-SILVA, R., et al. Leishmania amazonensis: characterization of an ecto-3'-nucleotidase activity and its possible role in virulence. **Exp. Parasitol.**, v. 129, p. 277-283, 2011. DOI: [10.1016/j.exppara.2011.07.014](http://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.07.014)

PALETTA-SILVA R., VIEIRA-BERNARDO R., COSENTINO-GOMES D., MEYER-FERNANDES JR, Leishmania amazonensis: Inhibition of 3'-nucleotidase activity by Cu²⁺ ions, **Experimental Parasitology**, Volume 131, Issue 1, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.03.001>.

SCHUSTER FL, VISVESVARA GS. Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. **Vet Parasitol.** 2004. DOI: [10.1016/j.vetpar.2004.09.019](http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.019)

SOPWITH, W.F., DEBRABANT, A., YAMAGE, M., DWYER, D.M., BATES, P.A., Developmentally regulated expression of a cell surface class I nuclease in Leishmania mexicana. **Int. J. Parasitol.** 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00372-1](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00372-1)

SOTO-ARREDONDO, K. J., FLORES-VILLAVICENCIO, L. L., SERRANO-LUNA, J. J., SHIBAYAMA, M., SABANERO-LÓPEZ, M. Biochemical and cellular mechanisms

regulating *Acanthamoeba castellanii* adherence to host cells. **Parasitology**. 2013. DOI: [10.1017/S0031182013001923](https://doi.org/10.1017/S0031182013001923)

SRINIVASAN, M. S. et al. Distinguishing infective versus noninfective keratitis. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 56, n. 3, p. 203–207, 2008. DOI: [10.4103/0301-4738.40358](https://doi.org/10.4103/0301-4738.40358)

T A NEUBERT, M GOTTLIEB, An inducible 3'-nucleotidase/nuclease from the trypanosomatid *Crithidia luciliae*. Purification and characterization., **Journal of Biological Chemistry**, Volume 265, Issue 13, 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)39104-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)39104-5).

TRABELSI H., DENDANA F., SELLAMI H., CHEIKHROUHOU F., NEJI S., MAKNI F., AYADI A. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. **Pathologie Biologie** 2012;60: 399-405. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2012.03.002>

YAMAGE, M., DEBRABANT, A., DWYER, D.M. Molecular characterization of a hyperinducible, surface membrane-anchored, class I nuclease of a trypanosomatid parasite. **J. Biol. Chem.** 2000. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M004036200>

YAMAGATA, Y., KOJIMA, H., EJIRI, K. et al. AMP synthesis in aqueous solution of adenosine and phosphorus pentoxide. **Origins Life Evol Biosphere** 12, 333–337 1982. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00927064>