

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - NUPEB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**INFLUÊNCIA DO METABOLISMO
EXTRACELULAR DE ATP EM INFECÇÕES POR
PARASITOS DO GÊNERO *Leishmania***

**AUTOR: EDUARDO DE ALMEIDA MARQUES DA SILVA
ORIENTADOR: PROF. DR. LUÍS CARLOS CROCCO AFONSO
CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. JULIANA LOPES RANGEL FIETTO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Imunobiologia de Protozoários.

Ouro Preto, março de 2008

S586i Silva, Eduardo de Almeida Marques da.
Influência do metabolismo extracelular de ATP em infecções por
parasitos do gênero *Leishmania* [manuscrito] / Eduardo de Almeida
Marques da Silva. – 2008.

xvi, 87f.: il., color; graf.

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso.
Co-orientadora: Profa. Dra. Juliana Lopes Rangel Fietto.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto
de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências
Biológicas.

Área de concentração: Imunobiologia de protozoários.

1. Leishmaniose - Teses. 2. Adenosina - Teses. 3. Apirase - Teses
4. Nucleotidase - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU:616.993.161

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Imunoparasitologia do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, sob a orientação do Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso e co-orientação da Profa. Dra. Juliana Lopes Rangel Fietto, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho à minha filhinha Marina, que
enche minha vida de força e alegria.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, criador da natureza e de todas as suas leis, e que nos permite, por intermédio da ciência, conhecer cada vez mais um pouco de como Ele criou esse grande projeto.

Agradeço profundamente a toda a minha família (pai, mãe, Alexandre, Fabiana, Emília e sua família e Marina), que é base para tudo o que sou e faço.

Agradeço àqueles que participaram, direta ou indiretamente, do dia a dia desse trabalho: colegas do LIP e de outros laboratórios do NUPEB, professores e funcionários.

Agradecimentos especiais

Pela participação direta e de muita importância na realização de grande parte desse trabalho, agradeço à Jamile, à Amanda e ao Djalma.

Agradeço à Profa. Dra. Juliana Lopes Rangel Fietto pela sua participação como co-orientadora e cujas idéias e sugestões foram de suma importância para que esse trabalho atingisse o ponto atual.

Agradeço ao Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso, não só um orientador, mas um amigo com quem aprendi muito a me direcionar dentro de um laboratório de pesquisa, tanto no que diz respeito ao imprescindível bom convívio com os colegas quanto à conduta dos trabalhos realizados.

RESUMO

Variações nos quadros clínicos da leishmaniose, observadas tanto na doença em humanos quanto em murinos, sugerem a existência de uma diferenciação, dependente da espécie, na capacidade de parasitos do gênero *Leishmania* causarem lesões no hospedeiro. A procura de fatores que diferenciam as espécies de *Leishmania* quanto à sua virulência se faz, então, necessária para o entendimento dos mecanismos pelos quais esses parasitos causam danos aos seus hospedeiros, possibilitando a descoberta de novas ferramentas de potencial terapêutico contra a leishmaniose. Componentes da via de metabolismo do ATP extracelular são candidatos potenciais para fatores de virulência desses parasitos, visto que tanto o ATP quanto a adenosina, produto da hidrólise de AMP, são capazes de influenciar a resposta imunológica do hospedeiro e, conseqüentemente, o estabelecimento do parasito. Essa hipótese é suportada pelo fato da *Leishmania* necessitar da utilização da via de salvação de purinas pela ação de enzimas, dentre elas as apirases, sobre o ATP extracelular, que possui propriedades imunoestimulantes, para gerar adenosina, produto da hidrólise do AMP pelas 5'-nucleotidases, cuja importância para o metabolismo do parasito e para a regulação da resposta imune está bem descrita na literatura. Para testar essa hipótese, nós estudamos três espécies de *Leishmania* com diferentes graus de virulência em camundongos C57BL/6: a mais virulenta *L. amazonensis* e as espécies *L. braziliensis* e *L. major*. Inicialmente, formas promastigotas metacíclicas e procíclicas desses parasitos foram testadas para sua capacidade de hidrolisar ATP, ADP ou AMP. As formas metacíclicas (infectantes) de *L. amazonensis* mostraram maior capacidade de hidrólise para os três nucleotídeos analisados, quando comparadas com as outras duas espécies menos virulentas. Além disso, sua capacidade de hidrólise de ATP foi maior que a das formas procíclicas da mesma espécie, sugerindo um controle de expressão de ATPases dependente de metaciclogênese. Posteriormente, foi verificado pelas técnicas de RT-PCR, e “Western blotting” que, a despeito da ocorrência de expressão de mRNA para as isoformas solúvel e de membrana de apirases nas promastigotas metacíclicas das três espécies estudadas, somente extratos enriquecidos de membrana de *L. amazonensis* foram capazes de apresentar reação com anticorpo anti-apirase de *T. cruzi*. O inóculo de promastigotas metacíclicas desse parasito na presença de suramina, um inibidor de ecto-

ATPases, em camundongos C57BL/6, levou a uma diminuição no tamanho de lesão a partir da quarta semana de infecção e no parasitismo em 7 semanas de infecção. Por outro lado, a indução de maior atividade 5'-nucleotidásica dos parasitos ou a administração simultânea de adenosina ao inóculo levou a um aumento transiente no tamanho de lesão e a um maior parasitismo em 3 ou 4 semanas de infecção da mesma cepa de camundongos por promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis*, resultado oposto ao obtido após o tratamento, no momento do inóculo, com o bloqueador de receptores A_{2B} de adenosina, MRS 1754. Em conjunto, esses resultados sugerem que a redução dos níveis de ATP extracelular pela ação de enzimas expressas pelo parasito e/ou a elevação dos níveis de adenosina podem contribuir para o estabelecimento de parasitos do gênero *Leishmania* no hospedeiro vertebrado, indicando um possível alvo para futuras intervenções de caráter terapêutico contra as leishmanioses.

ABSTRACT

The observed changes in clinical features of leishmaniasis in humans and mice suggest the existence of a specie-dependent differentiation in *Leishmania* ability to cause lesions on host. The search of factors that differentiate *Leishmania* species regarding their virulence is very important to the comprehension of the mechanisms underlying the grade of damage that these parasites may cause to the host, enabling the discovery of new tools with therapeutic potential against leishmaniasis. Components of extracellular ATP metabolism pathway are emerging candidates to determine the virulence of these parasites, since ATP and adenosine, a product of AMP hydrolysis, are able to influence the immunological response of the host and, in consequence, the parasite establishment. This hypothesis is supported by the fact that *Leishmania* parasites need to use the salvation pathway of purine nucleotides by the action of enzymes, amongst them the apyrases, over extracellular ATP, which display immune-stimulatory features, to produce adenosine, a product of AMP hydrolysis by the action of 5'-nucleotidases, whose importance to the parasite metabolism and to the regulation of the immune response has been described in literature. In order to verify this hypothesis, we use three *Leishmania* species with different degrees of virulence in C57BL/6 mice: the more virulent *L. amazonensis* and its counterparts *L. braziliensis* and *L. major* species. Initially, metacyclic and procyclic promastigotes from these parasites were evaluated regarding their ability in hydrolyze ATP, ADP and AMP. *L. amazonensis* infective metacyclic forms showed higher hydrolytic ability to the three analyzed nucleotides, when compared to the other two less virulent species. Moreover, its ability to hydrolyze ATP was higher than that from procyclic forms deriving from the same specie, suggesting a metacyclogenesis-dependent control of ATPase expression. Later, using RT-PCR and Western blotting analysis, we observed that, in spite of the occurring expression of mRNA to soluble and membrane-bound apirase isoforms from metacyclic promastigotes in the three species, only enriched membrane extracts from *L. amazonensis* were capable to react with *T. cruzi* anti-apyrase antibody. The inoculum of metacyclic promastigotes of this parasite in the presence of suramin, an ecto-ATPase inhibitor, in C57BL/6 mice, lead to a decrease in lesion size 4 weeks of infection onward and in parasitism 7 weeks after infection. Otherwise, the induction of

higher 5'-nucleotidase activity of the parasites or the simultaneous administration of adenosine in the inoculum lead to a transient increasing in lesion size and increased tissue parasitism 3 or 4 weeks after the infection of the same strain of mice with *L. braziliensis* metacyclic promastigotes, opposite to the effects obtained after the treatment, at the moment of inoculum, with the A_{2B} receptor antagonist MRS 1754. Together, these results suggest that the reduction in the levels of extracellular ATP by the action of enzymes expressed by the parasite and/or the increased levels of adenosine may contribute to the establishment of *Leishmania* parasites in the vertebrate host, indicating a possible target to future therapeutic interventions against leishmaniasis.

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| Dedicatória..... | IV |
| Agradecimentos..... | V |
| Resumo..... | VI |
| Abstract..... | VIII |
| Lista de figuras..... | XII |
| Lista de siglas..... | XIII |
| Introdução..... | 15 |
| <i>Leishmanioses: definição e formas clínicas</i> | 16 |
| <i>Resposta imune frente à Leishmania</i> | 17 |
| <i>Efeitos do trifosfato de adenosina (ATP) e seus metabólitos na resposta imune: importância das nucleotidasas</i> | 20 |
| <i>As famílias de purinoreceptores</i> | 24 |
| <i>Fatores de virulência em Leishmania</i> | 27 |
| <i>Leishmania e a síntese de nucleotídeos purínicos</i> | 29 |
| <i>Justificativa</i> | 30 |
| Objetivos..... | 32 |
| Material e métodos..... | 34 |
| <i>Animal experimental</i> | 35 |
| <i>Parasitas</i> | 35 |
| <i>Antígenos</i> | 36 |
| <i>Infecção</i> | 36 |
| <i>Avaliação da carga parasitária</i> | 36 |
| <i>Análise da produção de citocinas</i> | 37 |
| <i>Histologia</i> | 38 |
| <i>Medida da atividade enzimática de hidrólise de nucleotídeos</i> | 39 |
| <i>RT-PCR e PCR</i> | 39 |
| <i>“Western blotting”</i> | 40 |
| <i>Análise estatística</i> | 40 |
| Resultados..... | 41 |

| | |
|--|----|
| 1. <i>Espécies de Leishmania com diferentes níveis de virulência para camundongos C57BL/6 exibem diferentes padrões de hidrólise de nucleotídeos.....</i> | 42 |
| 2. <i>Diferentes espécies de Leishmania exibem perfis distintos de expressão de proteínas e de mRNA para apirases.....</i> | 44 |
| 3. <i>Aumento na atividade da 5'-nucleotidase induz aumento no desenvolvimento de lesão e no parasitismo em camundongos infectados com L. braziliensis.....</i> | 46 |
| 4. <i>Tratamento com adenosina no momento do inóculo de formas metacíclicas de L. braziliensis leva a um aumento transiente no tamanho da lesão e induz maior parasitismo.....</i> | 49 |
| 5. <i>Tratamento com suramina no momento do inóculo de formas metacíclicas de L. amazonensis leva a uma diminuição no tamanho da lesão e no parasitismo.....</i> | 55 |
| Sumário..... | 59 |
| Discussão..... | 61 |
| Conclusões..... | 72 |
| Referências bibliográficas..... | 74 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------------|--|----|
| Fig. 1. | Topografia de membrana e propriedades catalíticas dos membros da família das E-NTPDases..... | 21 |
| Fig. 2. | Modelo molecular da ecto-5'-nucleotidase e de seus derivados solúveis.... | 23 |
| Fig. 3. | Receptores de membrana para ATP extracelular e adenosina. Representação esquemática das famílias de receptores (A) P1, (B) P2X e (C) P2Y..... | 27 |
| Fig. 4. | Curvas de desenvolvimento de lesão de <i>L. braziliensis</i> , <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> em camundongos C57BL/6..... | 42 |
| Fig. 5. | Atividade ecto-nucleotidásica em formas promastigotas de <i>Leishmania</i> | 44 |
| Fig. 6. | Expressão de cDNA e gDNA de GDPase e NTPDase II de formas promastigotas metacíclicas de <i>L. braziliensis</i> , <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> | 45 |
| Fig. 7. | Expressão de NTPDase II em preparações de membrana de formas promastigotas de <i>Leishmania</i> | 46 |
| Fig. 8. | Atividade ecto-nucleotidásica de formas promastigotas metacíclicas de <i>Leishmania</i> tratadas com molibdato de amônio..... | 47 |
| Fig. 9. | Efeitos do molibdato de amônio no desenvolvimento de lesão e no parasitismo de camundongos C57BL/6 infectados com <i>L. braziliensis</i> | 48 |
| Fig. 10. | Efeito da adenosina no desenvolvimento de lesão de camundongos C57BL/6 infectados com <i>L. braziliensis</i> | 49 |
| Fig. 11. | Efeito da adenosina na infecção por <i>L. braziliensis</i> : quantificação de parasitos e produção de IFN- γ e IL-10 por células de linfonodo..... | 51 |
| Fig. 12. | Análise histológica de lesões de pata de camundongos tratados ou não com adenosina..... | 52 |
| Fig. 13. | Efeito do MRS 1754 na infecção de camundongos C57BL/6 com <i>L. braziliensis</i> | 54 |
| Fig. 14. | Efeito do bloqueio da apirase do parasito na infecção de camundongos C57BL/6 com <i>L. amazonensis</i> | 56 |
| Fig. 15. | Efeito da suramina na infecção de camundongos C57BL/6 com <i>L. amazonensis</i> . | 58 |

LISTA DE SIGLAS

- ABTS: ácido 2,2' - bis - azino (3 - etilbenzil - thiazol - 6 - sulfônico)
- ADA: adenosina deaminase
- ADP: difosfato de adenosina
- AMP: monofosfato de adenosina
- AMPC: AMP cíclico
- ATP: trifosfato de adenosina
- ATP γ S: gama-tio-ATP
- CD39: apirase
- CD73: 5'-nucleotidase
- cDNA: DNA complementar
- C-N-I: 5'-nucleotidase I citoplasmática
- C-N-II: 5'-nucleotidase II citoplasmática
- CPB: cisteíno-proteinase B
- DTH: hipersensibilidade do tipo tardia
- DTT: 1,4-ditio-DL-treitol
- EGTA: ácido etileno glicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético
- e-N: ecto-5'-nucleotidase
- e-N_s: ecto-5'-nucleotidase solúvel
- E-NPP: ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
- E-NTPDase: ectonucleosídeo 5'-trifosfato difosfohidrolase
- FAD: dinucleotídeos de flavina e adenina
- gDNA: DNA genômico
- GDPase: guanosina difosfato hidrolase
- GPCR: receptores acoplados a proteína G
- GPI: glicosil fosfatidilinositol
- iNOS: enzima óxido nítrico sintase induzível
- LACK: proteína homóloga de receptores de proteína quinase C ativada
- LPG: lipofosfoglicano
- MAC: complexo de ataque à membrana
- MCP-1: proteína quimiotática para monócitos

MeS-ATP: metiltio-ATP

mRNA: RNA mensageiro

MTT: “3-[4,5-dimethylthiazol-2]-2,5-diphenyltetrazolium bromide”

NECA: 5’-(N-etil-carboxamido)adenosina

NEM: N-etilmaleimida

NK: natural killer

NO: óxido nítrico

NTPase: nucleosídeo trifosfato hidrolase

NTPDase: nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

PBS: salina tamponada com fosfato

PCR: reação da polimerase em cadeia

Pi: fosfato inorgânico

PMSF: fluoreto de fenilmetanosulfonil

rIFN- γ : interferon gama recombinante

rTNF: fator de necrose tumoral recombinante

RT-PCR: transcrição reversa seguida por PCR

SDS: lauril sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

SFB: soro fetal bovino

SFM: Sistema Fagocitário Mononuclear

TCR: receptor de célula T

TLCK: N_a-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona

TPCK: N-p-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Leishmanioses: definição e formas clínicas

As leishmanioses são enfermidades causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que agrupa espécies de parasitos encontrados nas formas flageladas promastigotas e amastigotas (sem flagelo livre), parasitos intracelulares obrigatórios do Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM) responsáveis pela manutenção da infecção nos hospedeiros vertebrados. Sua transmissão ocorre pelo inóculo de formas promastigotas metacíclicas na derme durante o repasto sangüíneo de fêmeas de insetos do gênero *Lutzomyia* (Novo Mundo) ou *Phlebotomus* (Velho Mundo) (Ferro e cols., 1995; Rogers & Titus, 2003). Essas formas metacíclicas são, então, fagocitadas por células do SFM, onde, no interior de vacúolos fagocíticos, se transformam em amastigotas que, ao se multiplicarem, promovem a lise das células hospedeiras, possibilitando a infecção de novas células ou a infecção de outro inseto em repasto, mantendo, assim, tanto o processo infeccioso quanto o ciclo do parasito (Lainson & Shaw, 1988; Rittig & Bogdan, 2000).

As leishmanioses podem ser divididas em dois tipos, de acordo com os órgãos que acometem: Leishmaniose Visceral, que acomete a medula óssea e as vísceras, principalmente baço e fígado, e Leishmaniose Tegumentar, que acomete pele e mucosas. As formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar em humanos podem ser classificadas como: **1 – Leishmaniose Cutânea**, caracterizada inicialmente pela formação de um nódulo no local da picada, com posterior formação de uma úlcera seca, infartamento dos linfonodos drenantes e possibilidade de ocorrência de úlceras múltiplas. No Brasil, as principais espécies que parasitam o homem são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; **2 – Leishmaniose Cutâneo-mucosa**, caracterizada pelo surgimento de lesões destrutivas secundárias envolvendo mucosas e cartilagens concomitantes ou não com a lesão primária. O agente etiológico é, normalmente, a *L. braziliensis*; **3 – Leishmaniose Cutânea Difusa**, caracterizada pela formação de lesões difusas não ulceradas na pele, nas quais se encontra grande número de formas amastigotas. Está estreitamente associada a um processo anérgico, no qual a resposta imunológica celular

a antígenos de *Leishmania* está prejudicada (Marzochi & Marzochi, 1994). É causada por *Leishmania (L.) pifanoi*, na Venezuela e *L. amazonensis*, no Brasil (Convit e cols., 1972); e **4 – Leishmaniose Cutânea Disseminada**, caracterizada por numerosas lesões pequenas não contíguas, acneiformes, papulares, nodulares e ulceradas, distribuídas em duas ou mais partes do corpo. É causada por *L. guyanensis* e *L. braziliensis*, principalmente no nordeste do Brasil (Carvalho e cols., 1994; Costa e cols., 1986; Galvao e cols., 1993; Leopoldo e cols., 2006; Turetz e cols., 2002).

A Leishmaniose Tegumentar do Velho Mundo é causada por três agentes distintos pertencentes ao subgênero *Leishmania*: *Leishmania (L.) tropica* e *Leishmania (L.) major*, causadoras de Leishmaniose Cutânea antroponótica (urbana) e zoonótica (rural), respectivamente (Handman, 2001), e *Leishmania (L.) aethiopica*, causadora de Leishmaniose Cutânea ou Cutânea Difusa (Convit e cols., 1972). Além disso, é comum observar, na região do Sudão, a ocorrência de lesão mucosa pós-calazar causada por *Leishmania (Leishmania) donovani* (Elamin e cols., 2008).

Resposta imune frente à *Leishmania*

Entre as décadas de 1980 e 1990, criou-se um paradigma para a resposta imune contra a leishmaniose, a partir de estudos feitos com camundongos BALB/c infectados com *L. major*, que estabeleciam a dependência da resposta protetora contra o parasito com a presença de células T auxiliares produtoras de IFN- γ , ao passo que a susceptibilidade à infecção dependeria da produção de IL-4 (Heinzel e cols., 1989; Scott, 1991). Estudos posteriores feitos com *L. amazonensis* (Afonso & Scott, 1993; Jones e cols., 2000; Jones e cols., 2002; Soong e cols., 1997) e *L. major* (Kopf e cols., 1996) modificaram essa visão, ratificando a importância do IFN- γ nos mecanismos de proteção, mas mostrando que a citocina IL-4 nem sempre estaria associada com a susceptibilidade. Nas infecções em murinos, *L. amazonensis* é capaz de causar lesões progressivas que levam à necrose do tecido infectado em várias linhagens, dentre elas a C57BL/6. Interessantemente, nesse modelo, embora os animais sejam capazes de montar uma resposta Th1, caracterizada pela produção elevada de IFN- γ , que é importante para o controle da infecção por outras espécies, tais como *L. braziliensis* e *L. major*, as lesões não se curam espontaneamente e se tornam crônicas (Afonso & Scott,

1993; Maioli e cols., 2004). Variações nos quadros clínicos da doença, observadas também em humanos, sugerem a existência de uma diferenciação espécie-específica na capacidade de parasitos do gênero *Leishmania* causarem lesões no hospedeiro. Tais variações na virulência podem estar associadas, no entanto, à presença de outros fatores, tais como citocinas e quimiocinas, que possam ser diferencialmente produzidas em resposta à infecção, beneficiando ou não o estabelecimento do parasito.

Uma citocina importante na regulação da resposta imune, cujos efeitos já foram descritos em infecções por *Leishmania*, é a IL-10. Inicialmente, ao lado da IL-4, ela foi descrita como uma citocina característica de resposta tipo Th2, exibindo efeito de inibição sobre a síntese de outras citocinas, principalmente o IFN- γ , provenientes de clones de células Th1. Além disso, a IL-10 é capaz de inibir a atividade citotóxica de macrófagos (Moore e cols., 1993; Mosmann, 1994). Camundongos BALB/c, que apresentam pronunciada resposta Th2 quando infectados com *L. major*, exibem, na presença desse parasito, alta expressão de mRNA para IL-10 em células CD4⁺, enquanto quase nenhuma expressão dessa citocina é encontrada em linfócitos T auxiliares provenientes de camundongos C57BL/6, cujo perfil de resposta é Th1, infectados pela mesma espécie do parasito (Heinzel e cols., 1991). A concentração de IL-10 também se mostra elevada nos momentos iniciais da infecção de camundongos BALB/c com *L. major*, auxiliando na inibição, dependente de IL-4 e induzida pelo parasito, sobre a produção de IFN- γ . Esse efeito, aliado ao fato de que a adição de anticorpos anti-IL-10 não altera o perfil Th2 de camundongos susceptíveis à *L. major*, demonstra o papel da IL-10 não como uma citocina Th2, mas como imunorreguladora (Chatelain e cols., 1999).

A IL-12 é uma citocina produzida por fagócitos mononucleares, neutrófilos e células dendríticas. Suas principais funções são o estímulo da diferenciação de células T CD4⁺ para o tipo Th1, ativação e indução da produção de IFN- γ por células “natural killer” (NK) e pelas células Th1, e aumento da atividade citolítica de células NK e de linfócitos T CD8⁺ (Trinchieri, 2003). Sua importância em infecções por *Leishmania* vem sendo descrita na literatura (Mattner e cols., 1997; Park e cols., 2002; Jones e cols., 2000). A IL-12 produzida por células dendríticas infectadas pelo parasito é capaz de diferenciar linfócitos T CD4⁺ em células produtoras de IFN- γ nos linfonodos drenantes do sítio de infecção. Essas últimas migram para o local da infecção, num processo

conhecido como hipersensibilidade do tipo tardia (DTH), e o IFN- γ produzido por elas e pelas células NK, juntamente com a ligação de moléculas co-estimulantes, ativam os macrófagos infectados. Estes passam a produzir TNF- α , citocina inflamatória que, de maneira autócrina, participa da ativação dessas células (Chakour e cols., 2003; Liew e cols., 1990). Os macrófagos ativados, finalmente, passam a produzir radicais de oxigênio e óxido nítrico (NO), que são substâncias com propriedades leishmanicidas (Bogdan e cols., 2000). Em humanos, a ação de radicais de oxigênio é o principal mecanismo de eliminação da *Leishmania* pelos macrófagos, mas não se descarta a possibilidade do envolvimento do NO, que é a principal molécula com atividade leishmanicida em murinos (Mossalayi e cols., 1999). O NO é resultado da conversão de L-arginina e oxigênio molecular pela ação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), num processo ativado por citocinas e estímulos imunológicos. A produção de NO é inibida pelas citocinas IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β (Bogdan e cols., 2000).

Tanto o processo de ativação e diferenciação de linfócitos nos linfonodos quanto a DTH são altamente dependentes da migração de células do sistema imune. Essa migração ocorre devido à presença de um gradiente de quimiocinas nos órgãos-alvo e da expressão de receptores dessas moléculas na superfície das células envolvidas no processo que, ao circularem, encontram-se com as regiões de maior concentração das quimiocinas correspondentes, ali se estabelecendo. As quimiocinas CCL2 e CCL5 estão envolvidas na diferenciação de linfócitos T, recrutamento de leucócitos para o sítio de infecção e ativação da atividade leishmanicida de macrófagos, e suas expressões se mostram diminuídas nos linfonodos de camundongos C57BL/6 infectados por *L. amazonensis* em relação aos dos infectados por *L. major* (Ji e cols., 2003). A quimiocina CXCL10 está envolvida na quimiotaxia de células Th1 (Panzer e cols., 2006). A expressão dessas quimiocinas e de seus receptores é, portanto, de vital importância para a montagem de uma resposta adequada contra infecções por *Leishmania*.

Efeitos do trifosfato de adenosina (ATP) e seus metabólitos na resposta imune: importância das nucleotidases

O ATP é uma molécula de grande importância para o funcionamento da célula, principalmente no processo de armazenamento de energia. Além disso, quando em concentrações elevadas no meio extracelular, como resultado de injúria ou estímulo de células por ação de patógenos, o ATP pode ser interpretado como um “sinal de perigo” e iniciar uma resposta inflamatória caracterizada pela secreção de diversas citocinas, tais como IFN- γ , IL-12 e TNF (la Sala e cols., 2003; Langston e cols., 2003). Seus efeitos dependem da dose, do tempo de exposição e do tipo de célula envolvida (Di Virgilio F., 2007), e são controlados pela ação das enzimas ectonucleosídeo 5'-trifosfato difosfohidrolase – E-NTPDase ou apirase (CD39 em humanos) e 5'-nucleotidase (CD73 em humanos), que agem sobre o ATP e seus produtos de degradação, reduzindo sua concentração no meio e culminando na produção de adenosina. Esta, por sua vez, possui efeitos contrários aos do ATP na resposta imune, resultantes da ativação de receptores purinérgicos da família P1.

As apirases são enzimas que se caracterizam pela capacidade de hidrolisar tanto ATP quanto difosfato de adenosina (ADP), produzindo monofosfato de adenosina (AMP), de uma maneira dependente da concentração de íons bivalentes (Ca^{2+} ou Mg^{2+}) no meio. Elas pertencem à família das E-NTPDases, cujos componentes também incluem as ATPases e as ADPases, que hidrolisam ATP ou ADP, respectivamente (Plesner, 1995; Zimmermann, 2000). Os genes dessa família são expressos não somente nos vertebrados, mas também em invertebrados, plantas, leveduras e protozoários, dentre eles *L. amazonensis* (Pinheiro e cols., 2006) e *T. cruzi* (Meyer-Fernandes e cols., 2004). Todos os seus membros compartilham cinco domínios de seqüências altamente conservadas (regiões conservadas de apirase) que, presumivelmente, são de maior relevância para sua atividade catalítica e compartilham um ancestral comum ao das actina quinases /HSP70. Seus membros podem ser separados em dois grupos, de acordo com sua topografia de inserção na membrana (Fig. 1). Membros do primeiro grupo incluem as E-NTPDases 1 a 4, e são caracterizadas por terem um domínio transmembrana nos terminais *N* e *C*. O segundo grupo inclui as NTPDases 5 e 6, das quais somente a NTPDase5 já foi expressa e caracterizada. Esse grupo se caracteriza por seus

membros não possuírem o domínio hidrofóbico C-terminal e pela susceptibilidade à clivagem na seqüência hidrofóbica da região N-terminal da NTPDase5, resultando na forma solúvel da enzima (Zimmermann, 2000).

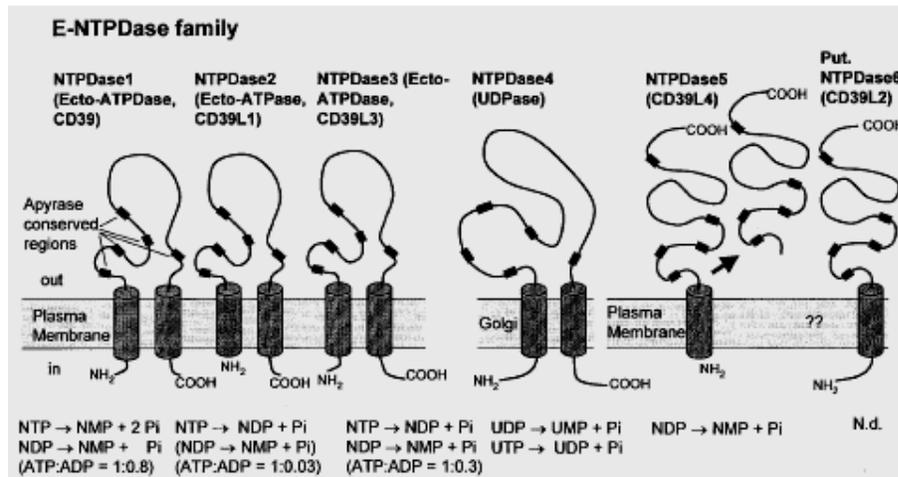


Fig. 1. Topografia de membrana e propriedades catalíticas dos membros da família das E-NTPDases. As enzimas podem ocorrer como homomultímeros. A NTPDase5 ocorre como proteína solúvel (seta). Da forma putativa da NTPDase6, somente a estrutura primária é conhecida. A nomenclatura previamente usada é apresentada em parênteses (Zimmermann, 2000).

As 5'-nucleotidases são enzimas capazes de hidrolisar 5'-nucleotídeos, agindo sobre o fosfato esterificado no carbono 5' de porções ribose e desoxirribose das moléculas desses nucleotídeos. Ao agirem sobre o AMP, contribuem para a cascata que hidrolisa o ATP completamente até adenosina. A atividade dessas enzimas foi inicialmente descrita nos músculos esquelético e cardíaco há 60 anos. Sua atividade já foi descrita em bactérias e células vegetais e a enzima está também amplamente distribuída nos tecidos de vertebrados. Assim como as apirases, essas enzimas são encontradas na forma solúvel ou inseridas em membranas (Fig. 2). Além de agir sobre mononucleotídeos purínicos e pirimídicos, elas apresentam atividade sobre 5'-dinucleotídeos, 5'-trinucleotídeos ou, até mesmo, sobre nucleotídeos complexos como UDP-glicose ou dinucleotídeos de flavina adenina (FAD) (Zimmermann, 1992). A estrutura primária das 5'-nucleotidases foi determinada inicialmente para as enzimas de mamíferos (Misumi e cols., 1990a; Misumi e cols., 1990b). A proteína madura consiste de 548 aminoácidos com uma massa molecular de, aproximadamente, 61 kDa. Ela possui uma região N-terminal (peptídeo sinal) e uma região C-terminal com uma

extensão de resíduos de aminoácidos não carregados e hidrofóbicos que são presumivelmente substituídos por uma âncora de glicosil fosfatidilinositol (GPI) ligada à Ser-523 (Ogata e cols., 1990). As 5'-nucleotidases de animais são agrupadas de acordo com sua localização celular e propriedades cinéticas em quatro formas: ligada à membrana (ecto-5'-nucleotidase, e-N) e três formas solúveis: 1 – derivada da 5'-nucleotidase ancorada a GPI, de localização extracelular (e-N_s); 2 – forma solúvel citosólica com afinidade diferencial para AMP (5'-nucleotidase-I citoplasmática, c-N-I); e 3 - forma solúvel citosólica com afinidade diferencial para monofosfato de inosina (IMP) – (5'-nucleotidase-II citoplasmática, c-N-II). As formas ligadas à membrana se apresentam dimerizadas por pontes de dissulfeto e as formas solúveis podem se apresentar sob a forma de dímeros ou tetrâmeros (Fig. 2). Aproximadamente todos os estudos estruturais relacionados com essas enzimas foram derivados de vertebrados e, dentro desse grupo, as características gerais de cada forma da enzima são aparentemente constantes (Zimmermann, 1992). As atividades dessas enzimas já foram detectadas em protozoários, dentre eles *Leishmania donovani* (Gottlieb & Dwyer, 1983) e *Trichomonas vaginalis* (Tasca e cols., 2003). Além disso, a adenosina produzida pela sua atividade sobre o AMP participa como agente cardioprotetor em infecções agudas por *T. cruzi* (Fretes e cols., 1999) ou como controladora de derrame vascular induzido por hipóxia em camundongos (Thompson e cols., 2004).

A saliva de flebotomíneos, além de possuir substâncias importantes para facilitar o repasto sangüíneo, como o maxadilán, um potente vasodilatador presente na saliva de *Lutzomyia longipalpis* que tem efeitos sobre o sistema imune do hospedeiro (Rogers & Titus, 2003), é capaz, também, de potencializar a transmissão de *Leishmania*. A presença de apirase e da forma secretada da 5'-nucleotidase, além da enzima adenosina deaminase (ADA), que converte adenosina em inosina e possui ação potencializadora na sensibilidade de receptores A1 à adenosina, também já foi detectada na saliva desses insetos transmissores de leishmaniose no Novo Mundo (Ribeiro e cols., 2000; Charlab e cols., 2000). Por sua vez, a saliva de *Phlebotomus papatasi*, inseto transmissor de leishmaniose no Velho Mundo, a despeito da ausência de maxadilán, apresenta grandes quantidades de adenosina e 5'-AMP, substâncias de ação vasodilatadora e inibidoras da agregação plaquetária, cuja presença não foi relatada na saliva de *Lu. longipalpis* (Ribeiro e cols., 1999). A presença de apirases, 5'-

nucleotidases ou da própria adenosina na saliva desses insetos leva a crer, portanto, numa interação entre a saliva e o parasito no início do processo infeccioso, culminando no favorecimento da infecção como decorrência dos efeitos moduladores da adenosina na resposta imune.

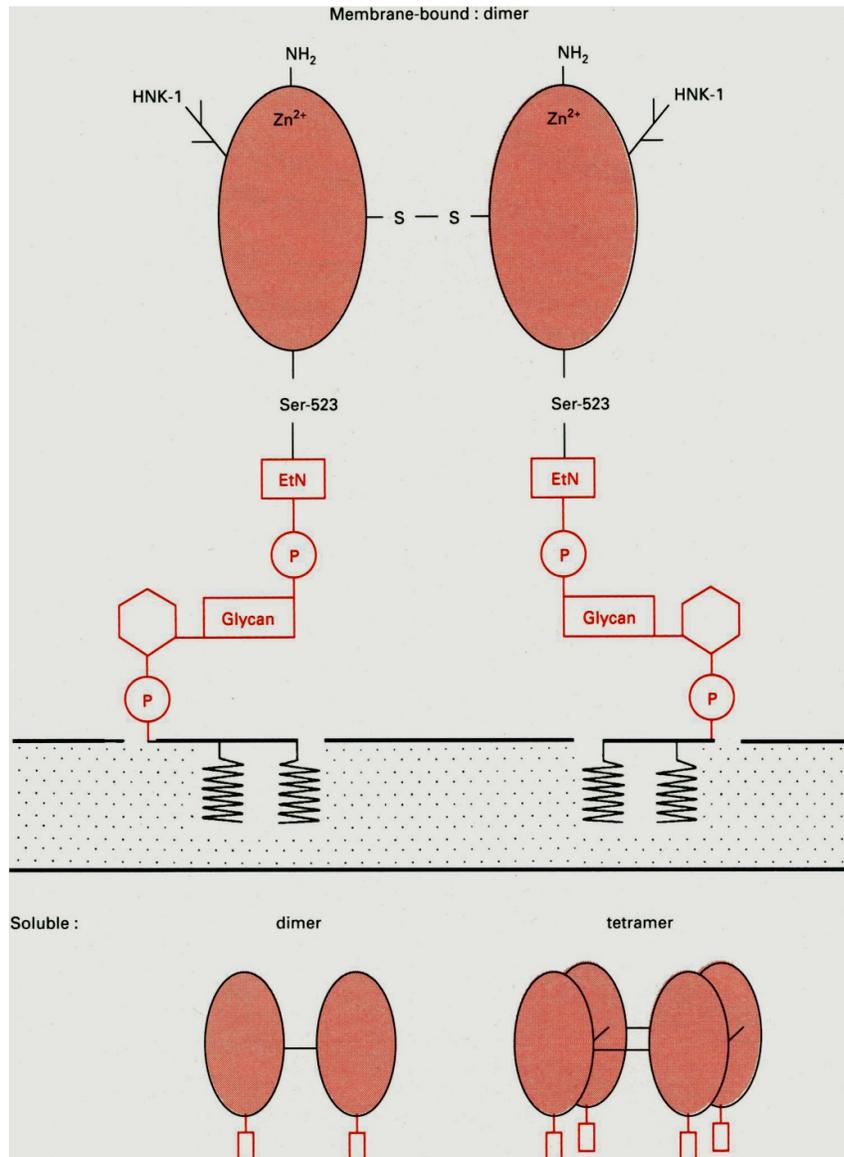


Fig. 2. Modelo molecular da ecto-5'-nucleotidase e de seus derivados solúveis (Zimmermann, 1992).

As famílias de purinoreceptores

O ATP extracelular e seus metabólitos são reconhecidos por receptores purinérgicos presentes na superfície de diversas células. Existem duas famílias desses receptores – P1 e P2 – cujos membros são ativados pela adenosina e por ATP/ADP, respectivamente (Burnstock, 2007).

As ações da adenosina são mediadas pela ativação de quatro subtipos de receptores conhecidos (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3), pertencentes à família P1 de receptores purinérgicos que, por sua vez, são membros de uma superfamília de receptores compostos por sete regiões transmembrana (Fig. 3A) e acoplados a proteína G (GPCR) (Fredholm e cols., 1994). Esses receptores se caracterizam por apresentarem distribuição tecidual e perfil farmacológico bastante peculiares, sendo capazes de participar da regulação das respostas imune e inflamatória em tecidos injuriados, desempenhando um papel crucial nos efeitos benéficos induzidos pela adenosina, principalmente nos casos de exacerbação dessas respostas (Jacobson & Gao, 2006). Os receptores A_2 funcionam como se fossem sensores de atividade pró-inflamatória e agem como bloqueadores do excesso de resposta imune. A ligação da adenosina aos receptores A_{2A} e A_{2B} (acoplados à proteína G – família Gs) leva ao aumento dos níveis de AMP cíclico (AMPC) intracelular pela ativação da enzima adenilato ciclase, inibindo a atividade imune da célula (Raskovalova e cols., 2005). Interessantemente, o receptor A_{2A} possui alta afinidade por adenosina, ao contrário do receptor de baixa afinidade A_{2B} , o que nos leva a crer que eles podem ser recrutados seqüencialmente, dependendo do acúmulo de adenosina no meio. Isso pode permitir um incremento gradual do sinal inibitório, permitindo, também, sob algumas circunstâncias, uma inibição parcial da resposta imune sem interromper totalmente, por exemplo, o processo de destruição de um patógeno (Sitkovsky & Ohta, 2005). Esse efeito regulador se dá principalmente pela inibição da produção de IFN- γ , IL-12 e TNF- α (Lappas e cols., 2005; Hasko e cols., 2000; Kreckler e cols., 2006) e aumento da produção de IL-10 (Panther e cols., 2003) por células envolvidas na resposta imune. A sinalização da adenosina via acoplamento dos receptores A_{2A} e A_{2B} com a proteína Gs é contrabalançada pela sinalização resultante do acoplamento dos receptores A_1 e A_3 com a proteína Gi, o que inibe a adenilato ciclase e leva à diminuição dos níveis de AMPC, garantindo outro nível de

controle para prevenir, por exemplo, a inibição prematura das células do sistema imune pelos receptores A_2 (Abbracchio & Ceruti, 2007; Sitkovsky & Ohta, 2005). Além disso, a adenosina pode agir tanto em receptores A_{2A} quanto A_3 inibindo a capacidade migratória de células dendríticas pela inibição da expressão de moléculas envolvidas nesse processo, tais como CCR5 e CCL19, sem afetar a maturação dessas células (Hofer e cols., 2003).

Os receptores P2 se dividem, com base na sua estrutura molecular e nos mecanismos de transmissão de sinais, em duas subfamílias: P2X, associados a canais iônicos (Fig. 3B), e P2Y, receptores de sete domínios trans-membrana (Fig. 3C), acoplados a proteína G. Atualmente, sete subtipos de receptores P2X e oito de P2Y são conhecidos, incluindo receptores que são sensíveis tanto a purinas quanto a pirimidinas (North, 2002; Ralevic & Burnstock, 1998; Abbracchio e cols., 2006). A ativação dos diferentes tipos desses receptores dá início a vias de sinalização que levam à regulação da ativação de fatores de transcrição, tais como: fator nuclear κB (NF- κB), proteína ativadora 1 (AP-1), fator nuclear de células T ativadas (NFAT), proteína de ligação CRE (CREB) e transmissor de sinal e ativador de transcrição (STAT), cujos efeitos estão relacionados com a produção de várias citocinas por células do sistema imune (Armstrong e cols., 2007).

Os receptores P2X medeiam a rápida e não seletiva passagem de cátions (Na^+ , K^+ e Ca^{2+}) através da membrana plasmática, resultando numa elevação do Ca^{2+} intracelular e despolarização (Bean, 1992). Eles podem se apresentar sob a forma homomérica (P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₇) ou heteromérica (P2X₂/P2X₃, P2X₄/P2X₆, P2X₁/P2X₅) (North & Surprenant, 2000) e estão distribuídos amplamente em diferentes células do organismo de mamíferos, tais como células musculares, plaquetas e neurônios. Dentre os principais efeitos fisiológicos provenientes da ativação de receptores P2X, a contribuição dos receptores P2X₁, sob estímulo de ATP, para o processo de agregação plaquetária em humanos, vem sendo evidenciada (Mahaut-Smith e cols., 2000). O subtipo P2X₇ está associado a células do sistema imune (mastócitos, linfócitos, macrófagos e células de Langerhans) e células do pâncreas (Burnstock, 2007; Surprenant e cols., 1996). Além disso, ele é um subtipo de receptor P2X com características bastante peculiares. Além de possuir os dois domínios trans-membrana próprios dos receptores P2X, distingue-se dos demais receptores dessa subfamília por

promover, sob ativação prolongada, a formação de grandes poros na membrana da célula que levam à lise celular, lembrando outro tipo de receptor, o P2Z (Valera e cols., 1994; MacKenzie e cols., 1999; Soto e cols., 1997; Donnelly-Roberts & Jarvis, 2007). Sua ativação medeia os efeitos ativadores de altas doses de ATP em células da imunidade inata (Kusner & Barton, 2001; Aga e cols., 2002). Esses receptores estão presentes em monócitos e são responsáveis, por intermédio da indução da translocação de NF- κ B, pela produção de IL1- β , citocina importante para uma variedade de atividades imunológicas e para a ativação do processo inflamatório (Aga e cols., 2002; Dinarello, 1996; Ferrari e cols., 2006).

Os receptores P2Y estão presentes na superfície de quase todas as células (von Kugelgen, 2005). Até o momento, existem oito subtipos desses receptores descritos na literatura: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄. Os subtipos de números seqüenciais não relacionados correspondem tanto a receptores ortólogos de não mamíferos quanto àqueles que possuem alguma homologia com a seqüência de receptores P2Y, mas sem nenhuma evidência funcional de resposta ao estímulo por nucleotídeos. Esses receptores podem ser subdivididos em receptores preferenciais para nucleotídeos de adenina – que respondem principalmente a ADP e ATP (P2Y₁, P2Y₁₂ e P2Y₁₃ de humanos e ratos e P2Y₁₁ de humanos), receptores preferenciais para nucleotídeos de uracila – que respondem principalmente a UDP e UTP (P2Y₄ e P2Y₆ humanos), e receptores P2Y₂ de humanos e ratos e P2Y₄ de ratos, classificados como de seletividade mista (Abbracchio e cols., 2006; Abbracchio e cols., 2003). Dentre esses subtipos, aqueles importantes para a farmacoterapia incluem os receptores P2Y₁ e P2Y₁₂, que estão envolvidos no processo de agregação plaquetária quando ativados por ADP (Barnard & Simon, 2001; Dorsam & Kunapuli, 2004; Hechler e cols., 2005) e os receptores P2Y₂, que estão envolvidos no tratamento de pacientes com fibrose cística (Kunzelmann & Mall, 2003). O ATP extracelular também exerce propriedades imunoestimulantes por intermédio da ativação de receptores P2Y, conforme descrito na literatura: baixas doses de metiltio-ATP (MeS-ATP), um agonista parcial desses receptores, estimula diretamente a transcrição de mRNA para a enzima iNOS e a tradução desse RNA para a proteína ativa em macrófagos alveolares de ratos (Greenberg e cols., 1997); gama-tio-ATP (ATP γ S), um análogo do ATP ativo sobre receptores P2Y₁₁, induz maturação/diferenciação de células dendríticas humanas e

potencializa a produção de IL-12 por células dendríticas estimuladas por TNF- α (Schnurr e cols., 2000; Wilkin e cols., 2001); e o ATP liberado por células danificadas ou debilitadas metabolicamente induz oscilações de íons Ca^{2+} e expressão de IL-6 pela ativação de receptores P2Y₂ (Hanley e cols., 2004).

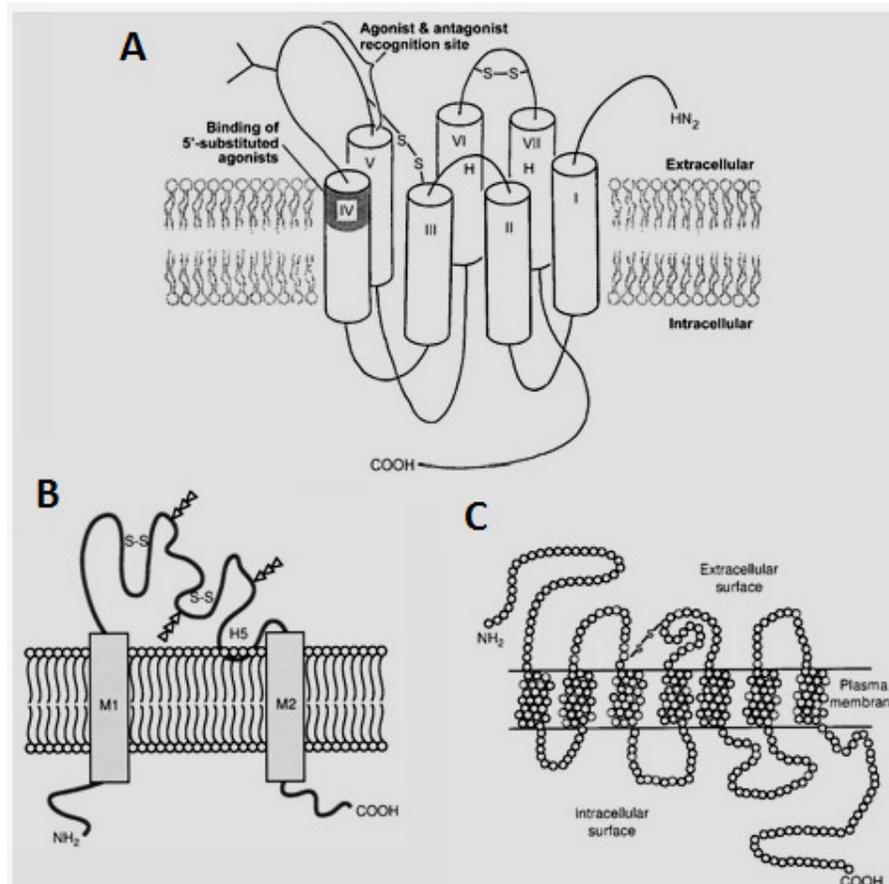


Fig. 3. Receptores de membrana para ATP extracelular e adenosina. Representação esquemática das famílias de receptores (A) P1, (B) P2X e (C) P2Y (Burnstock, 2007).

Fatores de virulência em *Leishmania*

Parasitas do gênero *Leishmania* expressam moléculas capazes de fazê-lo evadir a resposta imune montada pelo hospedeiro, facilitando o desenvolvimento do processo infeccioso. Algumas dessas moléculas, conhecidas como fatores de virulência, vêm sendo amplamente discutidas na literatura. Dentre elas, pode-se citar a proteína

homóloga de *Leishmania* de receptores de proteína quinase C ativada (LACK), o lipofosfoglicano (LPG), a glicoproteína gp63 e as cisteíno-peptidases.

A proteína LACK tem um papel importante na imunopatogênese da infecção experimental por *L. major*. Ela se localiza próxima ao cinetoplasto no citoplasma celular, provavelmente ligada a complexos multiproteicos (incluindo isoformas de proteína quinase C citoplasmáticas), mas não a estruturas de membrana, e apresenta alto grau de homologia entre as diferentes espécies do parasito (Gonzalez-Aseguinolaza e cols., 1999; Mougneau e cols., 1995). Sua versão reduzida de 24 kDa (aminoácidos 143-312) possui um epitopo imunodominante (aminoácidos 156-173) que ativa restritamente linfócitos T CD4⁺ com receptor de célula T (TCR) Vβ4, Vα8 produtores de IL-4, que se expandem inicialmente após infecção natural por *L. major* em camundongos BALB/c, tornando-os altamente susceptíveis à infecção por esse parasito (Launois e cols., 1997).

O LPG é um glicolípido presente na superfície celular de formas promastigotas de *Leishmania* que possui atividade inibitória sobre a ação de monócitos por bloquear sua adesão endotelial e migração transendotelial, como resultado da alteração da expressão de moléculas de adesão juncional, da modulação de proteínas juncionais intercelulares e da síntese de proteína quimiotática para monócitos (MCP-1) (Lo e cols., 1998). Essa molécula e a gp63 - uma metaloprotease de zinco abundante na superfície de promastigotas - são capazes de se ligar a receptores de Complemento, facilitando a fagocitose e aumentando a sobrevivência das amastigotas no interior dos macrófagos (Brittingham & Mosser, 1996; Handman & Bullen, 2002). Além disso, o LPG também garante resistência das formas promastigotas à lise pelo Complemento humano - pelo impedimento da ligação do complexo de ataque à membrana (MAC) à superfície celular - e à ação de agentes oxidantes (Spath e cols., 2003).

A susceptibilidade de camundongos BALB/c à infecção por *L. major* está relacionada com a ação de fatores de virulência, como a proteína LACK ou o LPG. Por outro lado, sua susceptibilidade à infecção por *L. mexicana* parece ser independente desses fatores (Torrentera e cols., 2001; Ilg, 2000). Trabalhos feitos com camundongos BALB/c infectados com formas amastigotas de *L. mexicana* deficientes em cisteíno-proteinase B (CPB) têm, por sua vez, apontado essa enzima como um importante fator de virulência para essa espécie de *Leishmania*, já que, na sua ausência, a capacidade

desses parasitos causarem lesão nessa cepa de camundongos foi reduzida. Os efeitos dessa enzima se devem à sua capacidade de indução de produção de IL-4, levando a uma resposta do tipo Th2 nesses animais (Alexander e cols., 1998; Denise e cols., 2003). Essa enzima está, também, associada à virulência de *L. mexicana* em camundongos C3H ou C57BL/6 susceptíveis à infecção por *L. major*, mas, dessa vez, devido à inibição da montagem de uma resposta Th1, ao invés da indução de Th2 (Buxbaum e cols., 2003).

As constatações evidenciadas acima demonstram a importância da existência de determinadas moléculas que, justamente por serem necessárias para garantir a infecção, passam a ser imprescindíveis para o delineamento de estratégias de controle da mesma. Além disso, se destaca a especificidade dessas moléculas ou fatores de virulência, já que diferentes espécies de parasitos podem ter sua virulência afetada de maneira diferente frente à presença de cada um desses fatores.

***Leishmania* e a síntese de nucleotídeos purínicos**

Parasitos do gênero *Leishmania*, assim como outros tripanosomatídeos, não são capazes de realizar a síntese “de novo” de nucleotídeos purínicos. Para satisfazer sua demanda desses nucleotídeos, eles necessitam utilizar da via de salvação de purinas pré-formadas no meio extracelular e interiorizar essas moléculas, transportando-as através de sua membrana plasmática (Marr e cols., 1978). Enzimas expressas por esses parasitos, dentre elas as ecto-nucleotidases, podem quebrar o ATP extracelular, gerando o metabólito adenosina, que é internalizado (Gordon, 1986). A presença dessas enzimas já foi descrita para diferentes parasitos, incluindo: *Toxoplasma gondii* (Asai e cols., 1995), *Trypanosoma cruzi* (Fietto e cols., 2002; Bisaggio e cols., 2003), *Tritrichomonas foetus* (Jesus e cols., 2002), *Entamoeba histolytica* (Barros e cols., 2000) e *Leishmania tropica* (Meyer-Fernandes e cols., 1997). Em muitos casos a atividade de E-NTPDases tem sido correlacionada com a virulência de diferentes espécies de parasitos (Asai e cols., 1995; de Jesus e cols., 2002; Gounaris, 2002; Tasca e cols., 2005), agindo, provavelmente, como um mecanismo de proteção contra os efeitos citolíticos do ATP extracelular (Steinberg & Di Virgilio, 1991) ou aumentando a adesão dos parasitos à célula hospedeira (Meyer-Fernandes, 2002). Interessantemente, outros estudos mostram

que promastigotas de *L. amazonensis* exibem tanto atividade ecto-ATPásica quanto 5'-ectonucleotidásica (Berredo-Pinho e cols., 2001; Coimbra e cols., 2002; Maioli e cols., 2004) e sugerem a participação das enzimas envolvidas não só no processo de obtenção de adenosina, mas, também, na virulência do parasito.

Justificativa

A procura de fatores parasitários específicos que possam ser considerados como marcadores de virulência é de extrema importância para o desenvolvimento de estratégias relativas ao controle de parasitoses. As variações nos quadros clínicos da leishmaniose, observadas tanto no modelo humano quanto no murino, sugerem a existência de uma diferenciação, dependente da espécie do parasito, na sua capacidade de causar lesões no hospedeiro. A determinação de fatores que diferenciam as espécies de *Leishmania* quanto à sua virulência se faz, então, importante para que se descubram os mecanismos pelos quais esses parasitos possam causar maiores danos aos seus hospedeiros, possibilitando a descoberta de novas ferramentas de potencial terapêutico contra as leishmanioses.

Nesse estudo, nossa hipótese se baseia na participação de componentes da via de metabolismo de ATP, tais como o próprio ATP, a adenosina ou enzimas envolvidas no processo, como elementos associados com a virulência de parasitos do gênero *Leishmania*. Para confirmar essa hipótese, inicialmente foi feita uma análise comparativa da capacidade de hidrólise de nucleotídeos de adenina de formas metacíclicas e procíclicas de espécies desse parasito com diferentes graus de virulência em camundongos (*L. braziliensis*, *L. major* e *L. amazonensis*).

Devido à participação das apirases na via de metabolismo do ATP e à sua ampla distribuição em diferentes espécies de parasitos, avaliou-se, também, a expressão dessas enzimas, tanto em nível genético (presença de DNA e RNA) quanto em nível protéico, por formas metacíclicas das três espécies de *Leishmania* estudadas.

Ao lado de seu papel no metabolismo do parasito, a adenosina produzida pela ação de ecto-nucleotidases pode também influenciar no estabelecimento de infecção por *Leishmania* devido a seus efeitos imunomoduladores. Para verificar essa hipótese, avaliou-se, por meio do acompanhamento do tamanho de lesão, parasitismo e produção

de citocinas, o resultado da ação dessa substância no início da infecção por *L. braziliensis*, já que o prognóstico da doença é dependente desses momentos iniciais, quando o parasito se estabelece (Chatelain e cols., 1992; Scott, 1991).

De modo semelhante, a participação do ATP foi avaliada em infecção por *L. amazonensis* na presença de suramina, um inibidor de atividade ecto-ATPásica, utilizado com o intuito de se desfavorecer o estabelecimento da infecção pela manutenção de níveis mais altos de ATP extracelular.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a participação de componentes da via de metabolismo extracelular de ATP na infecção por parasitos do gênero *Leishmania* com distintos níveis de virulência.

Objetivos específicos

1. Comparar a capacidade de hidrólise de nucleotídeos por formas promastigotas de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. major*, espécies de *Leishmania* com diferentes graus de virulência;
2. Comparar os padrões de expressão de nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase II (NTPDase II) por formas promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. major* aos níveis de DNA, RNA mensageiro (mRNA) e proteínas utilizando as técnicas de reação da polimerase em cadeia (PCR), transcrição reversa seguida por PCR (RT-PCR) e “Western blotting”, respectivamente;
3. Verificar o efeito da adenosina na infecção de camundongos C57BL/6 por *L. braziliensis*, acompanhando o desenvolvimento das lesões e avaliando o parasitismo nas patas, histologia das lesões e a produção de citocinas (IFN- γ , IL-4, IL-10 e TNF) por células de linfonodo;
4. Avaliar o efeito da administração de MRS 1754 (antagonista de receptores A_{2B} de adenosina) na infecção de camundongos C57BL/6 por *L. braziliensis*, acompanhando o desenvolvimento das lesões e avaliando o parasitismo na pata e a produção de citocinas (IFN- γ e IL-10) por esplenócitos e células de linfonodo;
5. Avaliar o efeito da suramina (inibidor de ecto-ATPase) na infecção de camundongos C57BL/6 por *L. amazonensis*, acompanhando o desenvolvimento de lesão e avaliando o parasitismo na pata e a produção de citocinas (IFN- γ e TNF) por esplenócitos e células de linfonodo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

Animal experimental

Camundongos C57BL/6 fêmeas de 4 a 8 semanas de idade foram obtidos e manuseados no Biotério Central - NUPEB/UFOP, Ouro Preto, onde receberam água e alimento *ad libidum*.

Parasitos

Cepas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *L. major* (MHOM/IL/80/Friedlin) foram cultivadas em meio de Grace (GIBCO BRL, Grand Island, N.Y., USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB; Cripion, Andradina, SP, Brazil), L-glutamina 2 mM (GIBCO BRL) e penicilina G 100 U/mL (USB Corporation, Cleveland, OH, USA), pH 6,5, a 26 °C. Promastigotas metacíclicas foram obtidas por centrifugação, em gradiente de Ficoll[®] 400 (Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP, Brazil), dos parasitos provenientes de cultura em final de fase logarítmica de crescimento (dia 5). Resumidamente, os parasitos foram lavados duas vezes com NaCl 0,9%, o precipitado foi ressuscitado em meio DMEM (GIBCO BRL) ou RPMI (SIGMA, St. Louis, MO, USA), pH 7,2 e sobreposto em Ficoll 10%. Esta preparação foi centrifugada a 1.070 x g/25 °C/15 min, a suspensão de metacíclicas no Ficoll 10% foi retirada e os parasitos foram lavados duas vezes com NaCl 0,9% para a utilização em testes de atividade enzimática ou salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,2 para os experimentos de infecção (Spath & Beverley, 2001) - adaptado. O sedimentado a partir desta centrifugação, que contém parasitos mortos e procíclicos, foi lavado duas vezes com NaCl 0,9% e ressuscitado em 4 mL de Percoll[®] 45% (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). Esta suspensão foi adicionada sobre 1,8 mL de Percoll 90%, sobreposta por 2,0 mL de Percoll 25% e centrifugada a 3.310 x g/4 °C/78 min (Ahmed e cols., 2003). As promastigotas procíclicas foram obtidas do anel formado entre as colunas de Percoll 45% e 90% e lavadas duas vezes com NaCl 0,9% para a utilização nos testes de atividade enzimática.

Antígenos

Os antígenos de *Leishmania* foram obtidos de culturas de promastigotas em final de fase logarítmica de crescimento, que foram lavadas duas vezes em PBS, pH 7,2. Os sedimentos obtidos foram submetidos a sete ciclos de resfriamento em nitrogênio líquido intercalados por aquecimento a 37 °C. As preparações foram observadas ao microscópio para se verificar a presença de parasitos intactos (Afonso & Scott, 1993). A concentração de proteínas das preparações foi determinada pelo método de Lowry (Lowry e cols., 1951) e ajustada para 1 mg/mL em proteínas. O antígeno preparado foi alíquotado, armazenado em “freezer” a - 70 °C e descongelado imediatamente antes de sua utilização.

Infecção

Camundongos C57BL/6 foram inoculados na base da pata esquerda com $1,0 \times 10^5$ promastigotas metacíclicas somente ou associadas a adenosina (SIGMA) na concentração de 50 μ M, suramina 200 μ M (SIGMA) ou MRS 1754 50 μ M (SIGMA), em volume de 50 μ L por inóculo. Para os experimentos de indução de aumento da hidrólise de AMP com molibdato de amônio, as formas metacíclicas utilizadas nos inóculos foram obtidas de culturas tratadas com 5 nmol deste sal por mL de cultura, adicionados diariamente durante 5 dias. O desenvolvimento de lesão foi acompanhado por medidas semanais utilizando um micrômetro (modelo 1015MA; L.S. Starret Co., Itu, SP, Brasil). Os resultados foram expressos como a diferença entre as medidas das patas infectadas e as das não infectadas (Afonso & Scott, 1993).

Avaliação da carga parasitária

O número de parasitos nas lesões de pata foi estimado pela técnica de diluição limitante (Afonso & Scott, 1993). Os animais foram sacrificados e a lesão total foi removida e macerada em meio de Grace, pH 6,5 em macerador de vidro. O detrito tecidual foi removido por centrifugação a $50 \times g/4$ °C/1 min e o sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado a $1.540 \times g/4$ °C/15 min. O precipitado foi ressuspenso em 0,5 mL de meio de Grace suplementado com 10 % de SFB inativado, L-glutamina 2 mM e penicilina G 100 U/mL, pH 6,5. A suspensão de parasitos foi submetida a uma diluição seriada (1:10) em duplicata para um volume final de 180 μ L

em placa de 96 poços. As ponteiras foram substituídas após cada diluição. As placas foram incubadas por 15 dias a 26 °C e examinadas ao microscópio invertido para observar a presença de parasitos. Os resultados foram expressos como - log do título de parasitos correspondente à última diluição na qual os parasitos foram detectados.

Análise da produção de citocinas

Células de linfonodo e baço foram estimuladas *in vitro* com antígeno particulado homólogo de *Leishmania*. Após 24 e 72 h de cultura os sobrenadantes foram coletados e as dosagens de TNF (24 h) foram realizadas por ensaio biológico (Lattime e cols., 1988) e IFN- γ (72 h) e IL-10 realizadas por ELISA de captura (Chatelain e cols., 1992; Scott, 1991).

Para a dosagem de IFN- γ , placas de fundo chato de 96 poços foram cobertas com o anticorpo monoclonal R46A2 (obtido em nosso laboratório), na concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$. Para o reconhecimento do IFN- γ ligado ao R46A2 foi utilizado soro policlonal de coelho anti-IFN- γ murino e como conjugado foi utilizado o anticorpo anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (ZYMED LABORATORIES, Inc. - So, San Francisco, CA, USA). A reação da peroxidase com cromóforo ácido 2,2'-bis-azino (3-etilbenzil-thiazol-6-sulfônico) (ABTS - SIGMA) e H₂O₂ 30% V/V foi interrompida com SDS 1% e a leitura da intensidade de cor foi realizada pelo leitor Emax Molecular Devices (MOLECULAR DEVICES CORPORATION – Sunnyvale - Califórnia - USA). Os dados foram analisados pelo programa SOFTmax[®] PRO 4.0 - Life Sciences Edition, sob comprimento de onda de 405 nm, e a curva padrão foi submetida à regressão linear. Como padrão, foi utilizado o interferon gama recombinante (rIFN- γ) murino (R&D Systems Inc. - Mineapolis, MN, USA) na concentração inicial de 1 ng/mL. O limite mínimo de detecção foi de 0,0156 ng/mL.

Para a dosagem de IL-10, foi utilizado o kit ELISA para IL-10 murino (PEPROTECH - Rocky Hill – NJ – USA). O limite mínimo de detecção foi de 62,5 pg/mL.

Para a dosagem de TNF, amostras de sobrenadante de cultura foram coletadas em condições de esterilidade e, em duplicata, foram diluídas em meio WEHI (RPMI, pH 7,2 acrescido de 10% de SFB previamente inativado a 56°C/30 min, 2 mM de L-

glutamina, penicilina G (100 U/mL) e 1 mL de solução de aminoácidos não essenciais cem vezes concentrada (890 mg/mL de L-alanina, 1320 mg/mL de L-asparagina, 1330 mg/mL de L-ácido aspártico, 1470 mg/mL de L-ácido glutâmico, 750 mg/mL de L-glicina, 1150 mg/mL de L-prolina e 1050 mg/mL de L-serina) em placa de fundo chato de 96 poços. Para esta diluição foram utilizados, em duplicata, 35 µL da amostra diluída em 100 µL de meio WEHI, pH 7,2 no primeiro poço (diluição 1:4) e 35 µL da diluição do primeiro poço em 100 µL de meio WEHI, pH 7,2 no segundo poço (diluição 1:16). Foi preparado, também em duplicata, o padrão TNF recombinante (rTNF) murino (R&D Systems Inc.) na concentração inicial de 2500 pg/mL em 12 diluições seriadas 1:4. Foram preparadas uma linha com 150 µL de meio WEHI, pH 7,2 (branco de meio) e outra com 100 µL do mesmo meio (branco de células). Foram adicionados 50 µL de uma suspensão a $1,0 \times 10^6$ /mL de células WEHI-164 tratadas com actinomicina D (SIGMA) na concentração de 0,75 µg/mL a todos os poços, exceto nos correspondentes ao branco meio, e a placa foi incubada em estufa a 37°C/5% de CO₂/24 horas. Foram adicionados 20 µL de solução estoque de 3-[4,5-dimethylthiazol-2]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT - SIGMA) a 2,5 mg/mL em cada poço e as placas foram incubadas em estufa a 37°C/5% de CO₂/4 horas. A seguir, foram adicionados 100 µL de lauril sulfato de sódio (SDS - VETEC - Rio de Janeiro, RJ, BR) 10% em HCl 0,01 M e a placa foi novamente incubada em estufa a 37°C/5% de CO₂/16 horas. O limite mínimo de detecção foi de 0,01 pg/mL. As leituras foram realizadas no leitor SOFTmax[®] PRO 4.0 - Life Sciences Edition, sob comprimento de onda de 570 nm, e a curva padrão foi submetida à regressão log-logit.

Histologia

A análise histológica das lesões de pata foi feita em secções do tecido embebido em parafina, coradas por hematoxilina-eosina. As secções foram inspecionadas para a procura de parasitos e a avaliação do infiltrado inflamatório foi realizada por microscopia ótica.

Medida da atividade enzimática de hidrólise de nucleotídeos

As atividades de hidrólise de trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP) e monofosfato de adenosina (AMP) foram medidas pela incubação de parasitos intactos por 1 h a 30 °C em tampão de reação (NaCl 116,0 mM, KCl 5,4 mM, D-glicose 5,5 mM, MgCl₂ 5,0 mM e tampão hepes-tris 50,0 mM, pH 7,2), na presença de ATP, ADP ou AMP (SIGMA) 5,0 mM. Para os experimentos de bloqueio da atividade apirásica, os parasitos foram incubados previamente durante 30 minutos a 4 °C na presença de suramina (concentração final de 200 µM em tampão de reação) e lavados ou não com solução fisiológica. Os parasitos lavados foram ressuspensos no tampão de reação para a incubação na presença dos nucleotídeos. A reação foi interrompida pela adição, na proporção 1:1, de HCl 0,2 mM resfriado em gelo (Fietto e cols., 2004). Hidrólise não específica foi determinada pela adição de parasitos após o HCl 0,2 mM ser adicionado. As suspensões foram centrifugadas e alíquotas dos sobrenadantes foram usadas para a quantificação do fosfato inorgânico (Pi) liberado adicionando-se, na proporção 1:1, uma mistura contendo FeSO₄.7H₂O 8,8%, H₂SO₄ 163,0 mM e 53,0% de uma solução de molibdato de amônio 2%/H₂SO₄ 5,55% (adicionada imediatamente antes do uso). Foi feita uma curva padrão utilizando diferentes concentrações de soluções de Na₃PO₄, reagindo com a mesma mistura descrita acima. A quantificação do fosfato liberado foi feita por espectrofotometria sob comprimento de onda de 650 nm (Tausky & Shorr, 1953) e a atividade enzimática, indiretamente determinada pela quantidade de Pi liberado, foi calculada pela subtração da hidrólise não específica e ajustada para valores gerados por 1,0 x 10⁸ parasitos/h.

RT-PCR e PCR

O RNA total dos parasitos foi extraído utilizando-se o kit RNAgents[®] Total RNA Isolation System (Promega) e submetido a transcrição reversa com SUPERSRIPT II[®] (Invitrogen) para a obtenção do DNA complementar (cDNA). O DNA genômico (gDNA) foi obtido por lise de 5,0 x 10³ parasitos/µL em água (10 minutos em temperatura ambiente). Os DNA(s) obtidos foram amplificados por PCR com pares de iniciadores específicos para guanosina difosfato hidrolase (GDPase – 5'-TCGGCTACGAAGACCCACTA-3' e 5'-GGCAGCTTCACCTCAAACCTT-3'), NTPDase II (5'-ATGAACGAGGCGAAGAAGAG-3' e 5'-

AGTTCCATGCAGGCAGTTTC-3') e o para o gen constitutivo β -actina (5'-TGATGAAGATCATGATGGAG-3' e 5'-CACACTTATTGATGGACTGG-3') de *Leishmania* (trinta e seis ciclos para GDPase e NTPDase II de *L. braziliensis* e trinta ciclos para as demais amplificações). Os produtos amplificados (301 pares de base para GDPase, 407 pares de base para NTPDase II e 291 pares de base para β -actina) foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) a 10% e corados com prata.

“Western blotting”

Extratos dos parasitos foram obtidos por lise conforme descrito para a obtenção de antígenos. A obtenção de extrato enriquecido em membrana plasmática dos parasitos foi realizada por centrifugação a 14.000 x g de extratos de promastigotas metacíclicas lisadas por ultra-som (Zingales e cols., 1979). Os extratos totais ou isolados de membrana, previamente tratados com coquetel de inibidores de protease (ácido etileno glicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) 200 μ M, fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF) 4 mM, N-p-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK) 40 μ M, N_a-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TLCK) 40 μ M, 1,4-ditio-DL-treitól (DTT) 4 mM e N-etilmaleimida (NEM) 40 mM – SIGMA) na proporção 1:20, foram submetidos ao tratamento com glicopeptidase F (SIGMA) para a remoção de resíduos de glicosilação (Ferrandi e cols., 1996). O material foi submetido a SDS-PAGE a 10% e as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, que foram submetidas ao bloqueio com solução de soro fetal bovino 5%, Tween 20 0,3% em PBS, pH 7,2 e tratadas com soro de coelho imunizado com NTPDase recombinante de *T. cruzi* a 4 °C por 16 horas sob agitação. Após duas lavagens com Tween 20 0,05% em PBS, pH 7,2, elas foram tratadas com solução de conjugado anti IgG de coelho peroxidase a 25 °C durante 1 hora e lavadas duas vezes com Tween 20 0,05% em PBS, pH 7,2. As bandas foram reveladas com solução de diaminobenzidina/4-cloro-naftol em PBS, pH 7,2 mais água oxigenada e a reação foi interrompida com água bi-destilada.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística por Teste *t* de Student, onde valores de *p* < 0,05 foram considerados como significativos.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

1. Espécies de *Leishmania* com diferentes níveis de virulência para camundongos C57BL/6 exibem diferentes padrões de hidrólise de nucleotídeos

Com o objetivo de se avaliar a existência de correlação entre o grau de virulência no modelo murino e a atividade ecto-nucleotidásica dos parasitos, camundongos C57BL/6 foram, inicialmente, inoculados com promastigotas metacíclicas de três diferentes espécies de *Leishmania*. Conforme demonstrado na Fig. 4, camundongos infectados com *L. amazonensis* desenvolveram lesões crônicas que não se curaram espontaneamente. Por outro lado, camundongos inoculados com *L. braziliensis* curaram-se completamente após 7 semanas de infecção. Camundongos infectados com *L. major* controlaram a progressão da lesão na sétima semana e foram capazes de se curar completamente por volta da 10^a – 11^a semana (dados não mostrados).

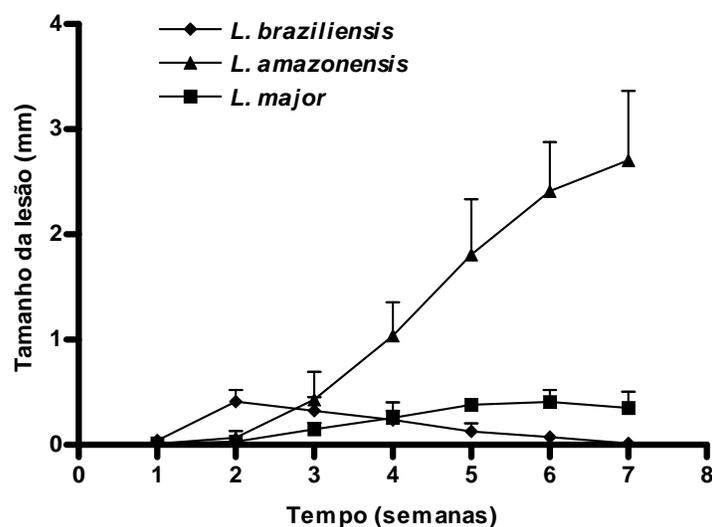


Fig. 4. Curvas de desenvolvimento de lesão de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. major* em camundongos C57BL/6. Os camundongos foram inoculados com 10^5 promastigotas metacíclicas na base da pata esquerda. Tamanhos de lesão foram medidos semanalmente, como descrito na metodologia. Foram utilizados três camundongos por grupo e os resultados representam a média + desvio padrão da média dos dados agrupados de dois ou três experimentos independentes.

Os parasitos foram, então, testados com relação à sua capacidade de hidrolisar ATP, ADP ou AMP. Observou-se uma alta atividade ecto-nucleotidásica por promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* para os três nucleotídeos testados quando comparada com a das outras duas espécies (Fig. 5). Além disso, as promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* apresentaram maior hidrólise de ATP que as procíclicas. Curiosamente, formas procíclicas de *L. major* hidrolisam mais ADP e AMP que as metacíclicas dessa mesma espécie. Nenhuma diferença, neste sentido, foi observada entre promastigotas procíclicas e metacíclicas de *L. braziliensis*.

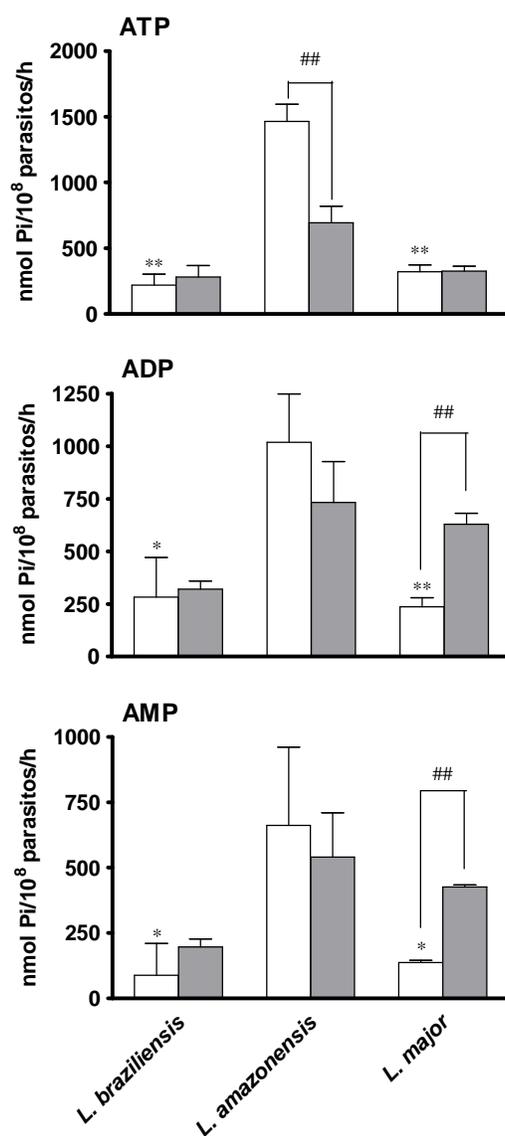


Fig. 5. Atividade ecto-nucleotidásica em formas promastigotas de *Leishmania*. Formas promastigotas metacíclicas (□) e procíclicas (■) foram isoladas após 5 dias em cultura e incubadas com cada nucleotídeo por 1 h a 30 °C. A atividade enzimática foi avaliada pela dosagem do fosfato inorgânico produzido. As barras representam a média + desvio padrão da média dos dados agrupados de 3 experimentos independentes. Painel superior – ATP, painel intermediário – ADP e painel inferior – AMP. * representa diferença significativa em relação a promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*. # representa diferença significativa entre promastigotas metacíclicas e procíclicas do mesmo parasito. Símbolos únicos ($p < 0,05$), símbolos duplos ($p < 0,01$).

2. Diferentes espécies de *Leishmania* exibem perfis distintos de expressão de proteínas e de mRNA para apirases

Com o objetivo de se verificar a correlação entre os resultados das atividades enzimáticas de hidrólise de nucleotídeos representadas na figura 5 e os perfis de expressão de DNA, RNA e proteínas relativos às apirases, foi realizada uma análise por PCR, RT-PCR e Western blotting para estas enzimas. Os resultados mostram a presença de DNA genômico e RNA para GDPase (NTPDase I – forma solúvel) e NTPDase II

(ectoenzima) nas três espécies de parasitos estudadas, mas com diferenças em suas quantidades (Fig. 6).

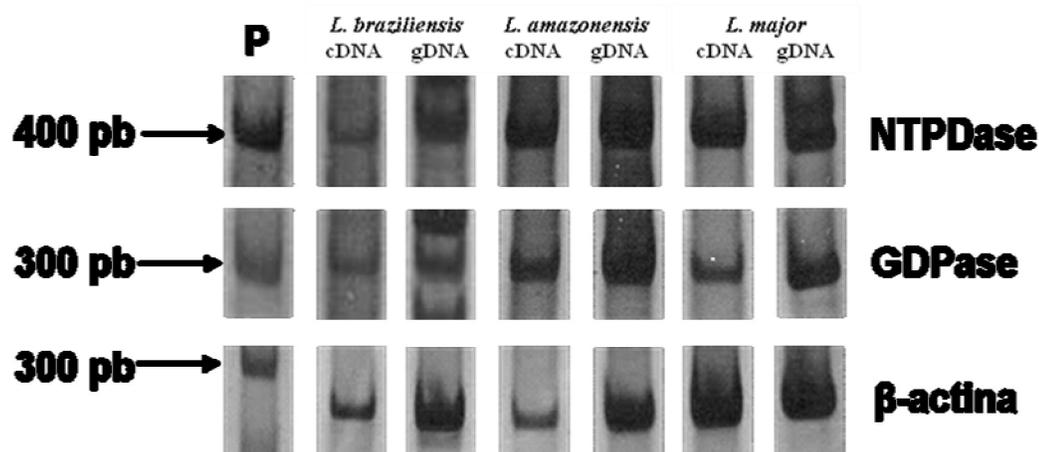


Fig. 6. Expressão de cDNA e gDNA de GDPase e NTPDase II de formas promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. major*. Extratos de cDNA ou gDNA de formas metacíclicas das três espécies de *Leishmania* foram obtidos como descrito na metodologia. As amostras foram submetidas a PCR para GDPase, NTPDase II e β-actina e os produtos foram submetidos a SDS-PAGE e revelados por coloração com prata. P = padrão de pares de base.

Dada a homologia entre as regiões conservadas dos genes de NTPDases de *T. cruzi* e *L. major* (Fietto e cols., 2004), foi utilizado um soro anti-NTPDase de *T. cruzi* para avaliar a expressão dessa enzima em preparações de membrana de promastigotas metacíclicas de *Leishmania* (Fig. 7). O soro anti-NTPDase de *T. cruzi* reagiu fortemente com os extratos de *L. amazonensis*, revelando uma banda de, aproximadamente, 50,3 kDa (NT), pouco maior que o peso molecular de 47,2 kDa de NTPDase II de *L. major* predito por análise gênica (Fietto e cols., 2004). Tratamento das preparações de membrana com glicopeptidase F alterou o padrão de migração da banda e revelou uma banda de 48,2 kDa, similar ao valor predito para NTPDase II de *L. major* (T). Curiosamente, não se detectou expressão de NTPDase II nas preparações de membrana de *L. braziliensis* ou *L. major* utilizando, até mesmo, 10 vezes mais proteínas que a concentração utilizada para *L. amazonensis* (Fig. 7).

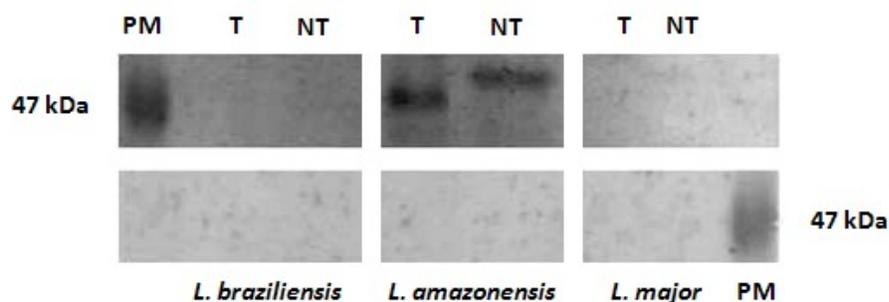


Fig. 7. Expressão de NTPDase II em preparações de membrana de formas promastigotas de *Leishmania*. Frações de membrana de formas promastigotas metacíclicas tratadas (T) ou não (NT) com glicopeptidase F foram submetidas a SDS-PAGE seguida por western blotting como descrito na metodologia. As membranas com o material transferido foram incubadas com soro de coelho imunizado com NTPDase recombinante de *T. cruzi* (painel superior) ou soro de coelho pré-imune (painel inferior). PM – marcador de peso molecular. Preparações de membrana de *L. braziliensis* e *L. major* correspondentes a 20 µg de proteínas foram utilizados por aplicação. Preparações de *L. amazonensis* aplicadas correspondem a 2 µg de proteínas.

3. Aumento na atividade da 5'-nucleotidase induz aumento no desenvolvimento de lesão e no parasitismo em camundongos infectados com *L. braziliensis*

Frente aos resultados descritos acima, decidiu-se investigar se o aumento da atividade ecto-nucleotidásica poderia interferir no curso da infecção de camundongos C57BL/6 por *L. braziliensis*. Para isso, inicialmente, culturas de *L. braziliensis* foram tratadas por 5 dias com molibdato de amônio, um inibidor da 5'-nucleotidase. Como mostrado na figura 8, este tratamento levou a um aumento na hidrólise de AMP por promastigotas metacíclicas, provavelmente devido a um aumento na expressão da enzima causado pela presença do inibidor por um tempo prolongado.

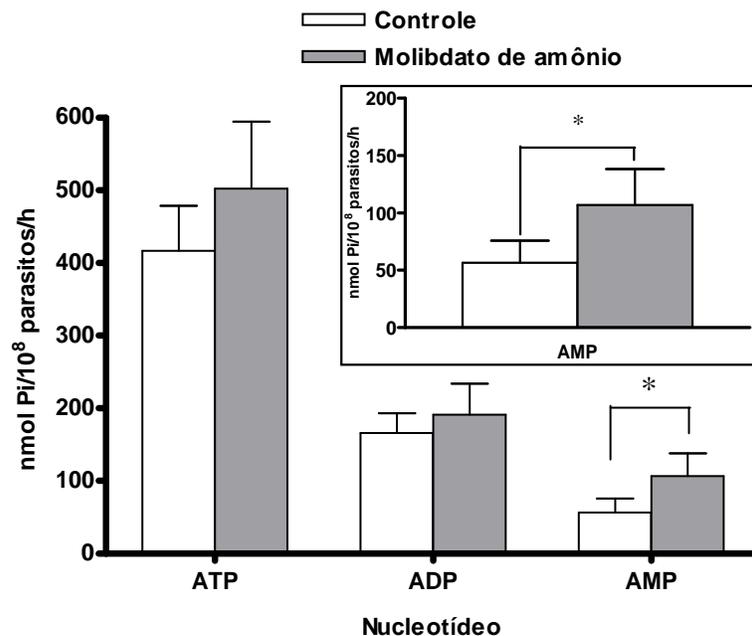


Fig. 8. Atividade ecto-nucleotidásica de formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* tratadas com molibdato de amônio. Promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* foram isoladas após tratamento com molibdato de amônio (5 μ M) durante 5 dias de cultura e incubadas com cada nucleotídeo por 1 h a 30 °C. A atividade enzimática foi avaliada pela dosagem do fosfato inorgânico produzido. As barras representam a média + desvio padrão da média dos dados agrupados de 2 experimentos independentes (* $p < 0,05$). Figura inserida: representativa da hidrólise de AMP, ampliada a partir da figura original.

Os animais inoculados com os parasitos tratados em cultura com molibdato de amônio foram capazes de curar a infecção. Entretanto, um aumento transiente no desenvolvimento de lesão e uma pequena elevação no parasitismo tecidual 4 semanas após a infecção foram observados, sugerindo uma correlação entre a hidrólise de AMP extracelular e a virulência do parasito (Fig. 9).

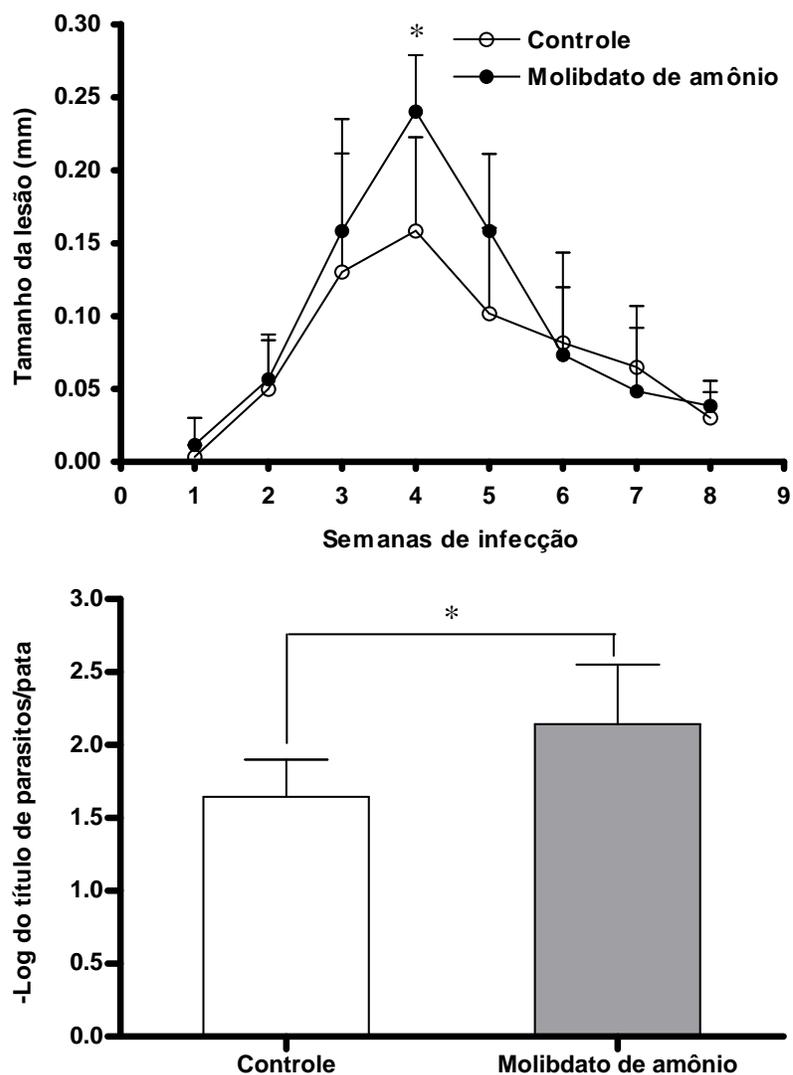


Fig. 9. Efeitos do molibdato de amônio no desenvolvimento de lesão e no parasitismo de camundongos C57BL/6 infectados com *L. braziliensis*. Camundongos foram inoculados na base da pata com 10^5 promastigotas metacíclicas provenientes de culturas de *L. braziliensis* tratadas ou não com molibdato de amônio ($5 \mu\text{M}$) durante 5 dias. Painel superior – Medidas semanais dos tamanhos de lesão. Painel inferior – Carga parasitária após 4 semanas de infecção. Três animais por grupo foram utilizados e valores representam a média + desvio padrão da média dos dados agrupados de dois experimentos independentes. Asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$).

4. Tratamento com adenosina no momento do inóculo de formas metacíclicas de *L. braziliensis* leva a um aumento transiente no tamanho da lesão e induz maior parasitismo

Os efeitos no desenvolvimento de lesão e na carga parasitária do aumento da atividade 5'-nucleotidásica induzido pela ação do molibdato de amônio podem estar refletindo a ação da adenosina produzida como resultado da ação da 5'-nucleotidase sobre o AMP. Para investigar essa possibilidade, camundongos C57BL/6 foram tratados com esse nucleosídeo no momento no inóculo de *L. braziliensis*, esperando-se que a interferência nos momentos iniciais da infecção pudesse refletir em alterações no decorrer da mesma. Interessantemente, esse tratamento induziu um aumento no tamanho de lesão a partir da 3ª semana de infecção, onde os animais tratados com adenosina desenvolveram lesões maiores que as dos animais controle, porém com o mesmo perfil de declínio observado nestes, com tendência para a cura (Fig. 10).

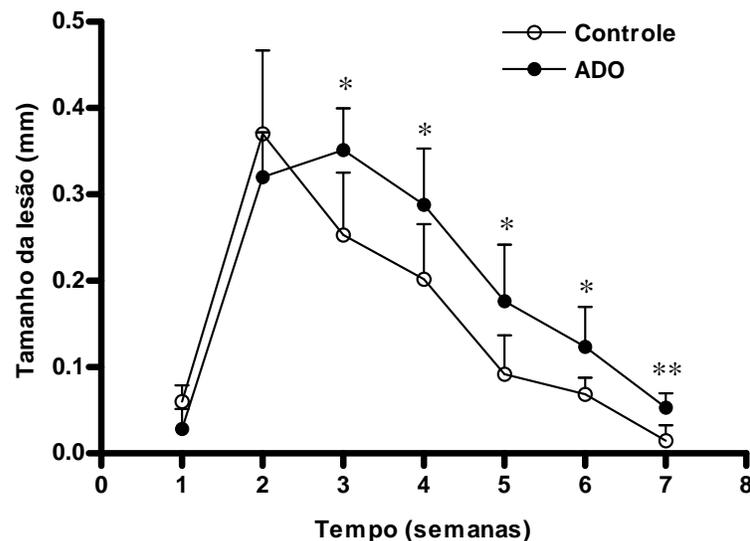


Fig. 10. Efeito da adenosina no desenvolvimento de lesão de camundongos C57BL/6 infectados com *L. braziliensis*. Camundongos foram inoculados na base da pata com 10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* somente (grupo Controle) ou mais 2,5 nmol de adenosina, administrada no momento do inóculo (grupo ADO). Tamanhos de lesão foram medidos semanalmente, como descrito na metodologia. Três animais por grupo foram utilizados, e valores representam a média + desvio padrão da média dos dados agrupados de dois experimentos independentes. Asteriscos indicam diferenças significativas (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

Esse aumento no desenvolvimento de lesão se relacionou com um aumento na carga parasitária na pata de animais tratados com adenosina em relação aos não tratados, já na terceira semana de infecção, primeiro ponto onde o efeito do tratamento no tamanho da lesão foi detectado (Fig. 11A). Desde que, de um modo geral, existe uma correlação entre a produção de citocinas e o resultado da infecção por *Leishmania*, nós avaliamos a produção de IFN- γ e IL-10 por células de linfonodo em três semanas de infecção (Fig. 11 - B e C, respectivamente). Culturas estimuladas de animais tratados ou não com adenosina produziram níveis similares das citocinas, indicando que o tratamento, pelo menos na concentração do nucleosídeo utilizada e no momento avaliado em nossos experimentos, não foi suficiente para induzir mudanças significativas na resposta imune adaptativa. De modo semelhante, não foram detectadas diferenças significativas na produção de TNF por células dos linfonodos dos mesmos animais avaliados após 1 ou 3 semanas de infecção (dados não mostrados).

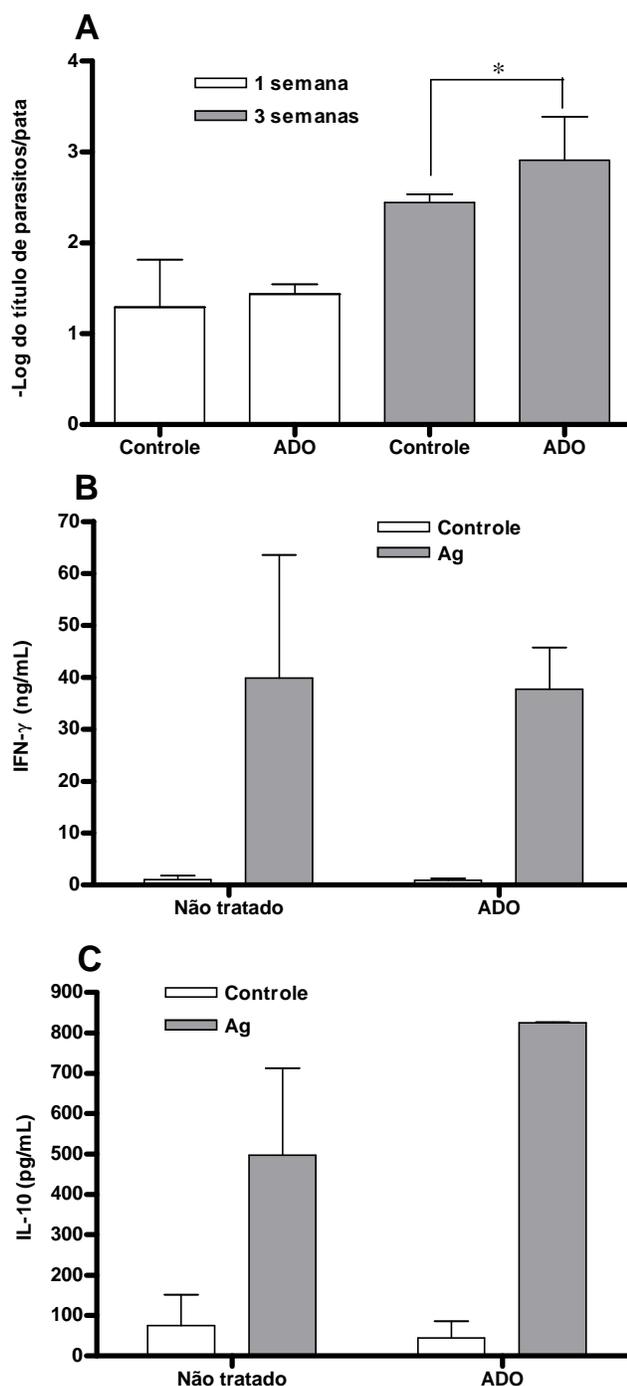


Fig. 11. Efeito da adenosina na infecção por *L. braziliensis*: quantificação de parasitos e produção de IFN- γ e IL-10 por células de linfonodo. Camundongos C57BL/6 foram tratados e infectados com descrito na Fig. 7 e sacrificados uma ou três semanas após o inóculo. Carga parasitária na pata foi determinada pela técnica de diluição limitante nos tempos indicados (A). IFN- γ (B) e IL-10 (C) foram dosados em "pool" de sobrenadantes de cultura de células de linfonodo obtidas três semanas após o inóculo, estimuladas ou não durante 72 h com antígeno de *L. braziliensis* (Ag - 50 μ g/mL). Três animais por grupo foram utilizados, e valores representam a média + desvio padrão da média dos dados agrupados de dois experimentos independentes. Asterisco indica diferença significativa (* $p < 0,05$).

Interessantemente, em três semanas de infecção, lesões de animais não tratados apresentaram um maior infiltrado linfocítico que as de animais tratados com adenosina

os quais, por sua vez, exibiram um infiltrado de macrófagos predominante aliado a um parasitismo acentuado (Fig. 12 - A e B).

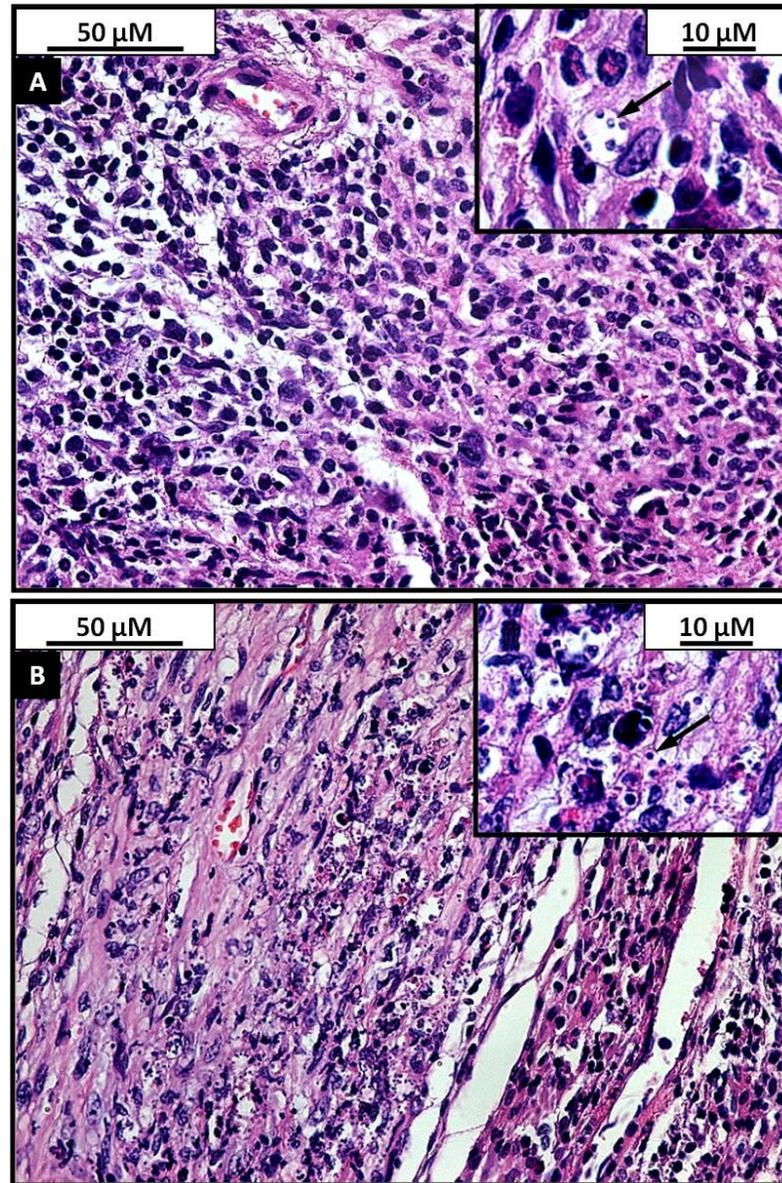


Fig. 12. Análise histológica de lesões de pata de camundongos tratados ou não com adenosina. Camundongos C57BL/6 foram tratados, infectados e sacrificados conforme descrito na Fig. 4. Três semanas após o inóculo, as patas foram retiradas e os tecidos lesionados foram embebidos em parafina, seccionados e corados com hematoxilina-eosina. Secções de lesões de animais não tratados ou tratados com adenosina estão representadas em A e B, respectivamente. Setas nas figuras inseridas indicam amastigotas de *L. braziliensis*.

Com o intuito de se confirmarem os efeitos da adenosina demonstrados acima como sendo intermediados por algum tipo de receptor de adenosina presente nas células do hospedeiro, camundongos C57BL/6 foram inoculados com promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* na presença de MRS 1754, um antagonista de receptores A_{2B}. Esse tratamento levou a uma diminuição no tamanho de lesão após 4 e 5 semanas de infecção (Fig. 13 – painel superior), que foi acompanhada por um menor parasitismo na pata dos animais tratados, quando comparado com o de animais controle, 4 semanas após o inóculo (Fig. 13 – painel inferior). Não houve diferença significativa na produção das citocinas IL-10 e IFN- γ por células do linfonodo de animais tratados com MRS 1754 se comparados com as do grupo controle (dados não mostrados).

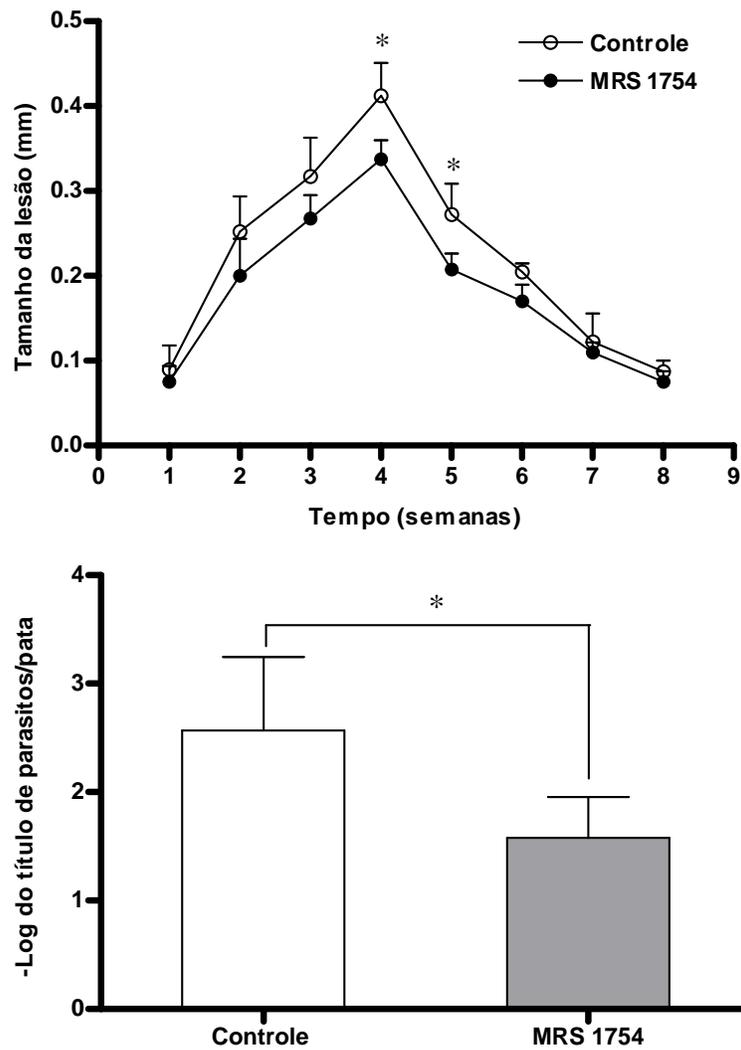


Fig. 13. Efeito do MRS 1754 na infecção de camundongos C57BL/6 com *L. braziliensis*. Camundongos foram inoculados na base da pata com 10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* somente (grupo Controle) ou mais 2,5 nmol de MRS 1754, administrado no momento do inóculo. Tamanhos de lesão (painel superior) foram medidos semanalmente, como descrito na metodologia, e parasitismo na pata foi avaliado 4 semanas após o inóculo (painel inferior). Quatro animais por grupo foram utilizados, e valores representam a média + desvio padrão da média dos dados de experimento representativo de dois experimentos diferentes (painel superior) ou dos dados agrupados de dois experimentos independentes (painel inferior). Asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$).

5. Tratamento com suramina no momento do inóculo de formas metacíclicas de L. amazonensis leva a uma diminuição no tamanho da lesão e no parasitismo

Diante dos resultados acima descritos relativos ao efeito da adenosina na infecção por *Leishmania*, foi avaliado, por outro lado, o efeito da interferência nos níveis de hidrólise de ATP sobre o curso de infecção por *L. amazonensis*. Para isso, camundongos C57BL/6 foram inoculados com promastigotas metacíclicas desse parasito na presença de suramina, um antagonista de receptores P2 e inibidor de algumas ecto-ATPases (Berredo-Pinho e cols., 2001; Lambrecht, 2000). Inicialmente, a reversibilidade da ligação da suramina com a apirase do parasito foi testada. Formas promastigotas metacíclicas do parasito colocadas na presença de suramina e posteriormente lavadas para remoção do excesso do inibidor apresentaram uma redução de, aproximadamente, 65% em sua capacidade de hidrolisar ATP, valores semelhantes aos encontrados para parasitos não lavados, indicando irreversibilidade da ligação bloqueador-enzima nas condições utilizadas (Fig. 14A). Os parasitos tratados e lavados foram, então, inoculados em camundongos C57BL/6 para o acompanhamento do desenvolvimento de lesão e avaliação do parasitismo na lesão em comparação com a utilização de parasitos não tratados. Apesar da redução, em média, nos tamanhos de lesão dos animais tratados com suramina em relação aos não tratados, não foram observadas diferenças significativas entre essas medidas (Fig. 14B), tampouco entre as cargas parasitárias dos grupos avaliados (Fig. 14C).

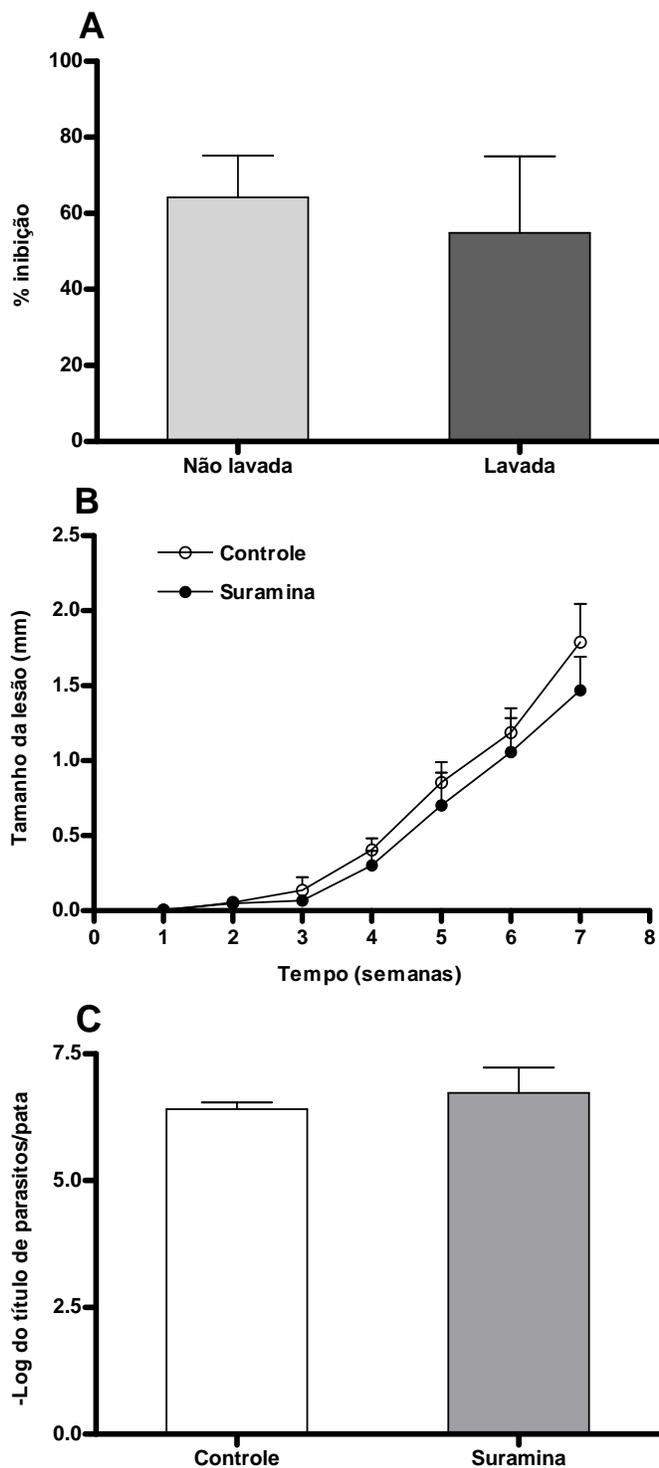


Fig. 14. Efeito do bloqueio da apirase do parasito na infecção de camundongos C57BL/6 com *L. amazonensis*. Formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* foram mantidas durante 30 minutos na presença de suramina em gelo, lavadas ou não com salina, e submetidas à avaliação da atividade ectoATPásica, conforme descrito na metodologia. Os resultados exprimem a porcentagem de inibição de hidrólise de ATP dos parasitos tratados em relação à de parasitos não tratados (A). 10^5 formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* tratadas com suramina e lavadas com salina, conforme descrito acima, foram inoculadas na base da pata de camundongos C57BL/6. Desenvolvimento de lesão (B) e carga parasitária 7 semanas após o inóculo (C) foram avaliados conforme descrito na metodologia. As barras representam a média + desvio padrão da média dos dados agrupados de 3 ou 4 experimentos independentes (A) ou dos dados de experimento representativo de dois experimentos diferentes, com 4 animais por grupo (B e C).

Devido à inexistência de diminuição significativa no parasitismo e no tamanho de lesão nos animais inoculados com parasitos tratados com suramina, resolveu-se avaliar a influência da inibição da atividade apirásica das células do hospedeiro aliada à dos parasitos na infecção por *L. amazonensis*. Para isso, formas promastigotas metacíclicas do parasito foram inoculadas, na presença de suramina, em camundongos C57BL/6, e foram avaliados o desenvolvimento de lesão, e o parasitismo além da produção de citocinas por células do linfonodo 7 semanas após o inóculo (Fig. 15). Esse tratamento levou a uma diminuição significativa no tamanho de lesão e no parasitismo dos animais do grupo tratado com suramina em comparação com os dos animais do grupo não tratado (Fig. 15 - A e B, respectivamente). A produção de IFN- γ por células do linfonodo drenante dos animais do grupo tratado com suramina foi, em média, mas não significativamente, superior à dos animais não tratados (Fig. 15C). Não houve diferença significativa na produção de TNF por células do linfonodo dos animais tratados se comparados com as do grupo controle (dados não mostrados).

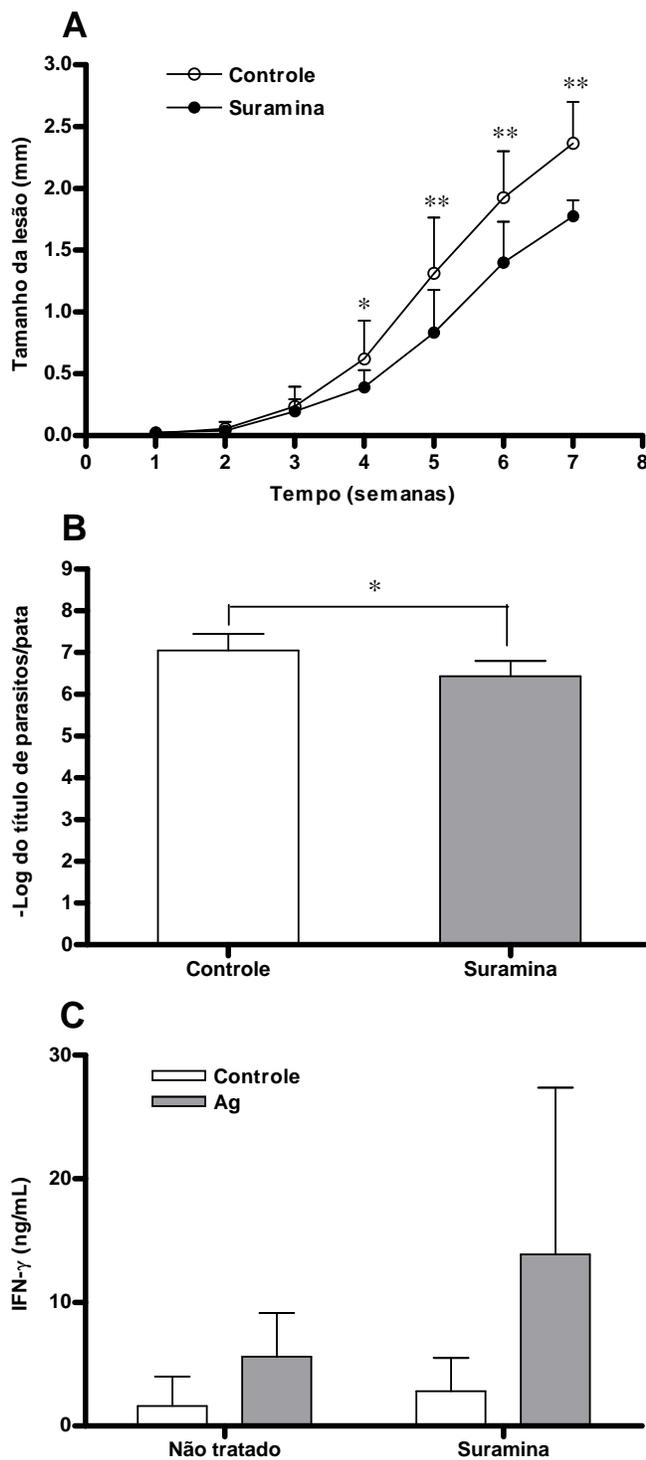


Fig. 15. Efeito da suramina na infecção de camundongos C57BL/6 com *L. amazonensis*. Camundongos foram inoculados na base da pata com 10^5 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* somente (grupo Controle) ou na presença de 10 nmol de suramina, administrada no momento do inóculo (grupo Suramina). Desenvolvimento de lesão (A), carga parasitária e produção de IFN- γ por células do linfonodo 7 semanas após o inóculo (B e C, respectivamente) foram avaliados conforme descrito na metodologia. Três ou quatro animais por grupo foram utilizados, e valores representam a média + desvio padrão da média dos dados agrupados de dois ou três experimentos independentes. Asteriscos indicam diferenças significativas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

5. SUMÁRIO

5. SUMÁRIO

- A atividade de hidrólise de ATP, ADP e AMP por formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* é maior que a de *L. braziliensis* e *L. major*;
- Formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* apresentam maior atividade de hidrólise de ATP que as procíclicas (não infectantes) do mesmo parasito;
- Formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* expressam NTPDases de membrana detectáveis por “western blotting” utilizando-se soro de coelho anti-apirase de *Trypanosoma cruzi*. O mesmo não ocorre para promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* ou *L. major*;
- O aumento da atividade AMPásica em formas promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* leva a um aumento transiente no tamanho de lesão e a um aumento no parasitismo em camundongos C57BL/6;
- A administração de adenosina junto ao inóculo de *L. braziliensis* em camundongos C57BL/6 leva a um aumento transiente no tamanho de lesão e ao aumento no parasitismo na pata na 3ª semana de infecção;
- A administração de inibidor de receptor A_{2B} junto ao inóculo de *L. braziliensis* em camundongos C57BL/6 leva a uma diminuição no tamanho de lesão e no parasitismo na pata na quarta semana de infecção;
- O inóculo de *L. amazonensis* juntamente com suramina em camundongos C57BL/6 leva à diminuição no tamanho de lesão a partir da 4ª semana de infecção e a uma diminuição no parasitismo na pata 8 semanas após a infecção.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Durante o repasto sangüíneo em hospedeiros vertebrados, flebotomíneos infectados com *Leishmania* criam um poço de sangue na região intradérmica, a partir do qual o inseto pode continuar sua alimentação. A lise celular gerada pelo dano tecidual causado durante esse processo enriquece o meio extracelular com moléculas provenientes do interior das células. Uma dessas moléculas é o ATP que, além do conhecido papel no metabolismo energético das células, possui propriedades imunoestimulantes que podem auxiliar na montagem de uma resposta protetora contra o parasito. Parasitos do gênero *Leishmania*, por sua vez, são capazes de realizar a conversão enzimática extracelular do ATP em seus produtos de metabolismo, dentre eles a adenosina, que é internalizada pelo protozoário e usada para a síntese de purinas, e que, por outro lado, quando presente no meio extracelular, é capaz de inibir a resposta imune, favorecendo o estabelecimento do parasito.

A procura de fatores de virulência relacionados com o estabelecimento da infecção por *Leishmania* é de grande importância para que se torne possível uma terapêutica mais efetiva contra a leishmaniose. Vários desses fatores têm sido associados à infecção por esses protozoários, dentre eles a expressão de LPG e gp63, moléculas que interferem com a resposta imune modificando a expressão de citocinas ou protegendo o parasito contra a ação do sistema Complemento (Mosser & Brittingham, 1997). Nesse estudo, verifica-se a hipótese de que enzimas envolvidas no metabolismo de ATP, ou a geração de adenosina resultante da ação dessas enzimas, possam estar associadas com a virulência desses parasitos.

Considerando que uma diminuição na concentração extracelular de ATP, uma molécula com propriedades imunoestimulantes, e aumento na concentração de adenosina, que possui conhecidos efeitos imunomoduladores, pudesse favorecer o estabelecimento do parasito, decidiu-se, inicialmente, avaliar a capacidade de hidrólise de nucleotídeos de adenina por promastigotas metacíclicas de espécies de *Leishmania* com distintos graus de virulência. É importante notar que, durante todo o trabalho foram utilizadas formas promastigotas metacíclicas, tanto nos experimentos de avaliação da atividade enzimática de hidrólise de nucleotídeos comparada com a de procíclicas ou com a de metacíclicas de espécies diferentes, quanto nas análises de expressão das

apirases ou nos experimentos de infecção. O estudo centrado na utilização dessas formas deveu-se à constatação inferida a partir de trabalhos que demonstram a importância de fatores ocorridos nos momentos iniciais de uma infecção por *Leishmania* na determinação do perfil de desenvolvimento da doença (Belosevic e cols., 1989; Chatelain e cols., 1992). Como as formas promastigotas metacíclicas são as que efetivamente infectam, além das amastigotas, decidiu-se pela interferência no processo de infecção das primeiras, esperando obter modificações mensuráveis em algum momento posterior à infecção.

Conforme pode ser observado nas figuras 4 e 5, dentre as três espécies estudadas, *L. amazonensis*, que mais eficientemente se estabelece no hospedeiro vertebrado, apresenta formas promastigotas metacíclicas com maior capacidade de hidrólise de nucleotídeos de adenina que as outras espécies de menor virulência. Além disso, essas formas infectantes de *L. amazonensis* também demonstraram maior habilidade em hidrolisar ATP que as promastigotas procíclicas da mesma espécie (Fig. 5 – painel superior). Isto sugere uma correlação entre essa habilidade e um mecanismo de escape do parasito da defesa do hospedeiro, desde que uma quantidade de molécula capaz de auxiliar uma resposta protetora (ATP) está sendo diminuída no meio que envolve o parasito.

Dados da literatura mostram que todas as cepas de *Toxoplasma gondii* possuem a isoforma menos ativa de nucleosídeo trifosfato hidrolase II (NTPase II), enquanto somente cepas virulentas expressam a isoforma NTPase I (Asai e cols., 1995). Para verificar a existência dessa mesma relação em parasitos do gênero *Leishmania*, inicialmente nós utilizamos análise genética “in silico” (programas Workbench e Signal-P) e dados da proteína recombinante pura para predizer o peso molecular de três isoformas de apirase de *L. major*, espécie com o mais avançado sequenciamento genômico armazenado no banco de dados da internet até o momento: NTPDase I (GDPase com peptídeo-sinal – 75,1 kDa e GDPase sem peptídeo-sinal – 71 kDa) e NTPDase II (47,2 kDa). A denominação GDPase se deve ao fato que o gene classificado no genoma de *L. major* como sendo uma GDPase seria homólogo à isoforma 5, única isoforma solúvel das apirases descritas até o momento (Zimmermann, 1992). Essas proteínas, a princípio, podem ser reconhecidas pelo anticorpo anti apirase de *T. cruzi* usado em nossos experimentos e os oligonucleotídeos desenhados para

GDPase e NTPDase II foram usados nos ensaios de PCR. Os resultados obtidos por “Western blotting” (Fig. 7), onde somente promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* exibem expressão de apirase em extrato enriquecido em membrana plasmática, corroboram sua maior atividade de hidrólise de nucleotídeos (Fig. 5), e sugerem a relação dessa expressão com a maior virulência de *L. amazonensis* em relação às das duas outras espécies (Fig. 4). Porém, quando as promastigotas metacíclicas foram avaliadas em nível de expressão gênica e protéica em relação às isoformas das apirases e à atividade de hidrólise de nucleotídeos, nós encontramos algumas divergências. Apesar de serem detectadas bandas para cDNA e gDNA que codificam GDPase e NTPDase II das três espécies de *Leishmania* estudadas (Fig. 6), é interessante notar que foram necessários seis ciclos a mais para que se pudessem detectar essas bandas para a espécie *L. braziliensis* em relação ao número de ciclos que se utilizou para as amostras de *L. amazonensis* e *L. major*, o que bem se relaciona com a mais baixa atividade de hidrólise de ATP e ADP da primeira espécie (Fig. 5). Porém, promastigotas metacíclicas de *L. major* apresentam hidrólise de ATP e ADP similares às de *L. braziliensis* (Fig. 5), mas um perfil de expressão de cDNA e gDNA semelhante ao de *L. amazonensis* (Fig. 6), que possui maior capacidade de hidrólise desses nucleotídeos. Além disso, somente extratos enriquecidos em membrana plasmática de *L. amazonensis* expressam apirase detectável por “Western blotting” (Fig. 7), a despeito da expressão de cDNA e gDNA para NTPDase II ocorrer para as três espécies estudadas (Fig. 6). Resumidamente, o número de cópias genômicas/níveis de transcritos, expressão de proteínas e atividade enzimática não se inter-relacionam perfeitamente quando se avaliam as três espécies estudadas, no que diz respeito à expressão das apirases. A constatação da presença de transcritos mal relacionada com a expressão de proteínas pode ser justificada pela possível ocorrência de algum controle pós-transcricional relacionado com degradação protéica ou com o processo de “splicing” alternativo de mRNA policistrônico, comumente observados em tripanosomatídeos (Teixeira, 1998; Paterou e cols., 2006; Misra e cols., 2005). Já o fato do não reconhecimento da NTPDase II pelo soro de coelho imunizado com apirase de *T. cruzi* em preparações de membrana de promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* ou *L. major*, a despeito da detecção de atividade de hidrólise de ATP e ADP por essas formas (Figs. 5 e 7), pode ter explicações distintas: 1 - a hidrólise desses nucleotídeos pode

estar associada à ação de outras fosfatases possivelmente expressas pelos parasitos, como as da família ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP) ou as fosfatases alcalinas (Zimmermann, 2000); 2 – GDPases podem estar contribuindo para a atividade nucleotídica detectada; 3 – as NTPDases podem estar retidas no interior das células devido a problemas no processo de glicosilação; ou 4 – a justificativa menos provável de que o soro utilizado não tenha sido capaz de identificar a enzima nas membranas de *L. major* ou *L. braziliensis*. Contudo, é sempre bom lembrar que a atividade de E-NTPDases vem sendo frequentemente correlacionada com a virulência de parasitos (de Jesus e cols., 2002; Asai e cols., 1995; Tasca e cols., 2005; Gounaris, 2002), agindo, provavelmente, como um mecanismo protetor contra os efeitos citolíticos do ATP extracelular (Steinberg & Di Virgilio, 1991) ou aumentando a adesão do parasito à célula do hospedeiro (Meyer-Fernandes, 2002). As razões para as diferenças observadas e o envolvimento dessas enzimas específicas no estabelecimento da infecção ainda precisam ser investigados.

O processo de glicosilação é de grande importância para o mecanismo de secreção de proteínas pelas células, que também já foi descrito nos tripanosomatídeos (McConville e cols., 2002). Por outro lado, diferenças nos níveis de glicosilação podem afetar, além da expressão da proteína, seu perfil de corrida na eletroforese: proteínas mais glicosiladas são mais resistentes à degradação pelo proteossoma (Bukau e cols., 2006; McConville e cols., 2002) e adquirem um peso molecular adicional, correndo mais lentamente e gerando bandas mais ovaladas. Conforme observado na figura 7, o tratamento com glicopeptidase F, enzima que catalisa a quebra de ligações N-glicosídicas com peptídeos (Plummer, Jr. e cols., 1984) alterou a velocidade de corrida da banda correspondente à NTPDase II de promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*, aproximando-a da altura correspondente ao peso molecular predito para essa proteína (47,2 kDa) a partir de análise “in silico” do gen de *L. major*. Esse resultado, além de demonstrar a presença dessa proteína na superfície de *L. amazonensis*, reforça a constatação da ausência ou da baixa expressão, pelo menos na membrana plasmática de *L. major*, dessa proteína que, certamente, deveria ter sido reconhecida, partindo-se do conhecimento da grande homologia entre a seqüência de bases do gen para NTPDase dessa espécie e da *L. amazonensis*, verificada a partir de

trabalho de seqüenciamento desenvolvido por nossos colaboradores (dados não mostrados).

As evidências que nos levaram a sugerir uma relação entre a hidrólise de nucleotídeos por intermédio da ação de apirases e a virulência de parasitos do gênero *Leishmania* se mostram importantes, mas ainda não suficientes para que se possa realmente afirmar que o metabolismo de ATP extracelular tem implicações práticas para o processo de infecção por esse parasito. Essa via de metabolismo não se restringe à hidrólise de ATP e ADP. Como pode ser visto na figura 5, a capacidade de hidrólise de AMP por promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* também se mostra superior à das duas espécies menos virulentas. Esse fato reforça a idéia da existência de uma reação em cascata, onde o ATP serve como ponto de partida para a produção de adenosina, um produto de degradação do AMP pela ação da enzima 5'-nucleotidase, que pode, aliada ao efeito da redução da concentração de ATP extracelular, favorecer o estabelecimento do parasito agindo tanto como um nutriente para o mesmo quanto como um regulador da resposta imune. Para verificar a importância da adenosina nesse processo, nós decidimos avaliar o efeito da mesma na infecção de camundongos C57BL/6 com promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis*, que é mais rapidamente controlada por esses animais se comparada com a infecção por *L. major* (Fig. 4). Para isso, nós, inicialmente, induzimos o aumento da capacidade de hidrólise de AMP de *L. braziliensis* por intermédio do seu tratamento, em cultura, com molibdato de amônio, um sal que possui forte efeito inibitório sobre a enzima 5'-nucleotidase (Gottlieb & Dwyer, 1983). A exposição prolongada a esse sal (5 dias em cultura) pode ter levado a uma super-expressão da enzima, como resultado de um possível mecanismo compensatório, resultando no aumento do nível de hidrólise de AMP extracelular na presença do parasito (Fig. 8). O aumento do tamanho de lesão e da carga parasitária em 4 semanas de infecção por formas metacíclicas tratadas em cultura com molibdato de amônio (Fig. 9) muito provavelmente reflete o efeito decorrente do aumento da concentração de adenosina a partir do AMP extracelular, provocado pelo aumento da atividade da enzima 5'-nucleotidase do parasito, nos momentos iniciais da infecção.

Para se verificar o efeito direto da adenosina na infecção por *L. braziliensis*, foram feitos experimentos preliminares onde se testaram diferentes concentrações do nucleosídeo (0,5, 2,5, 5, 25 e 50 nmol por inóculo), administrado no momento da

infecção de promastigotas metacíclicas do parasito, e 2,5 nmol foi o valor que levou a efeitos mais fortes no aumento dos tamanhos de lesão (dados não mostrados). Utilizando essa dose da droga na infecção por *L. braziliensis*, a despeito de o resultado ser a cura, como ocorrido nos animais infectados e não tratados, foi observado um aumento nos tamanhos de lesão a partir da terceira semana de infecção (Fig. 10), associado a uma maior carga parasitária nessa terceira semana, nas lesões de animais tratados (Fig. 11A). Com o tratamento utilizado, a lesão não foi progressiva talvez devido ao fato da administração da adenosina ter sido feita somente no momento do inóculo. Depois de cessado o efeito da mesma, a resposta imunológica teria se restabelecido suficientemente forte para resolver a infecção. Esse quadro é representado pela figura 12A, onde lesões provenientes de animal infectado na ausência de adenosina apresentaram um perfil, após 3 semanas, correspondente a um maior infiltrado linfocítico e um pequeno parasitismo. Por outro lado, no mesmo tempo avaliado, lesão proveniente de animal infectado na presença de adenosina apresentou um perfil correspondente a um elevado infiltrado de macrófagos e um maior parasitismo (Fig. 12B), característico de uma infecção que se encontra num estágio anterior, se comparado com o apresentado na figura 12A. Esse atraso na resposta pode ser atribuído aos efeitos inibitórios da adenosina sobre a migração de células dendríticas (Hofer e cols., 2003).

Dos quatro receptores de adenosina conhecidos (A_1, A_{2A}, A_{2B} e A_3), A_{2A} e A_{2B} são aqueles que, sob ativação, resultam em efeitos imunomoduladores (Bours e cols., 2006). Efeito inverso ao obtido pela administração de adenosina ou pelo bloqueio da atividade da 5'-nucleotidase foi observado após o bloqueio do receptor A_{2B} com MRS 1754 (Fig. 13). Esse resultado demonstra, a despeito da provável utilização da adenosina extracelular no metabolismo do parasito, o efeito desse nucleosídeo nas células do hospedeiro, e sugere que elevados níveis de adenosina são produzidos no sítio de infecção por *L. braziliensis*, condição requerida para a ativação de um receptor de baixa afinidade.

Numa análise mais ampla, os resultados até aqui descritos sugerem que a produção de adenosina nos estágios iniciais da infecção influencia no crescimento do parasito e no desenvolvimento de lesão em infecção por *L. braziliensis*. Embora a correlação entre a atividade de ecto-nucleotidases e a virulência de parasitos já tenha

sido proposta, nossos resultados expandem esse conceito ao demonstrar, pela primeira vez, que esta via pode interferir na infecção, pelo menos quando as alterações induzidas para que se demonstre isso ocorrem no nível da infecção pelas promastigotas metacíclicas. Nós não podemos, porém, eliminar a possibilidade de que não somente um aumento na concentração de adenosina extracelular, mas também um decréscimo nos níveis de ATP pode estar envolvido nesse processo.

Para se testar o efeito do bloqueio da apirase do parasito na infecção por *Leishmania*, nós utilizamos a espécie de maior virulência em camundongos C57BL/6, *L. amazonensis* (Fig. 4). A idéia inicial era que, bloqueando o efeito dessa enzima no parasito, estaríamos favorecendo o acúmulo de ATP extracelular, que deveria ser metabolizado pela ação da apirase. Esperávamos, portanto, que houvesse um efeito negativo sobre o desenvolvimento da infecção, levando a uma diminuição do parasitismo frente a uma resposta imunológica fortalecida. Interessantemente, não houve diferença nos tamanhos de lesão em qualquer tempo analisado e no parasitismo na 7^a semana de infecção, quando comparamos os grupos tratado e não tratado com suramina (Fig. 14 – B e C). Porém, ao adicionarmos suramina ao inóculo, de modo semelhante ao feito com a adenosina, nós obtivemos os resultados esperados, tanto no que diz respeito à diminuição nos tamanhos de lesão (Fig. 15A) quanto na carga parasitária (Fig. 15B). Esses resultados levam a crer que a suramina adicionada ao meio de inóculo estaria exercendo ação na inibição da apirase do parasito e de células do hospedeiro que participam do controle da infecção e, mais do que isso, no caso específico da infecção por *L. amazonensis*, a influência nessas células do hospedeiro estaria prevalecendo, resultando nas alterações observadas. De fato, dados da literatura têm mostrado que, em infecções por *L. amazonensis* ocorre um influxo antecipado de células reguladoras para o sítio de infecção que, por sua vez, poderiam reprimir precocemente a resposta imune protetora, favorecendo o quadro progressivo da doença (Ji e cols., 2005). Interessantemente, essas células, dentre outras presentes no sítio de infecção, expressam CD39 e, pelo menos em parte, sua maquinaria supressiva se deve à adenosina produzida pela ação da CD73, também expressa por essas células, sobre o AMP produzido pela ação da apirase sobre o ATP (Borsellino e cols., 2007; Deaglio e cols., 2007; Kobie e cols., 2006). Outra observação importante a ser feita é que a suramina se comporta, também, como antagonista seletiva de receptores P2, agindo

fortemente sobre receptores homoméricos P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₅, P2Y₁ e P2Y₁₁ e heteroméricos P2X_{2/3} e P2X_{1/5}, mas sendo fraca ou inativa sobre P2X₄, P2X₆, P2X₇, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, e P2X_{4/6} (Lambrecht, 2000). Isso sugere a importância dos receptores P2X₇ na resposta protetora contra *L. amazonensis*, visto que, dentre os receptores não bloqueados, estes são os que, até o momento, se destacam na importância como reguladores da resposta imune. Sua presença já demonstrada em monócitos, umas das primeiras células a atingirem o sítio de infecção, pode estar auxiliando a montagem de uma resposta mais eficaz nos momentos iniciais da infecção, refletindo uma resposta à ligação do ATP extracelular e resultando na diminuição do tamanho de lesão e do parasitismo 4 e 7 semanas após o inóculo, respectivamente, nos animais tratados com suramina (Fig. 15 – A e B).

Os resultados obtidos com *L. braziliensis* e *L. amazonensis* claramente remetem à constatação de que a influência dos componentes da via de metabolismo de ATP na infecção por *Leishmania* podem variar em intensidade e, até mesmo, podem ter mecanismos distintos, dependendo da espécie do parasito e da relação entre ele e o hospedeiro. Esse fato não é incomum na imunologia, já que fatores muitas vezes dados como importantes para a determinação da resistência ou susceptibilidade à doença podem, dependendo dos componentes da relação parasito-hospedeiro, revelar efeitos até mesmo antagônicos aos considerados anteriormente um paradigma. É o caso da relação IL-4/susceptibilidade, retificada por trabalhos feitos com diferentes espécies de parasitos, como *L. major* (Kopf e cols., 1996), *L. donovani* (Stager e cols., 2003) e *Plasmodium yoelii* (Carvalho e cols., 2002), que demonstraram, em alguns casos, até mesmo uma participação dessa citocina na resposta protetora contra esses parasitos. Por isso, se faz necessário, na continuidade das investigações dos efeitos dos componentes da via de metabolismo de ATP, avaliar de modo isolado cada sistema que se tem em mãos, considerando as variáveis conhecidas que possam interferir na resposta a ser instalada.

É bastante provável que tenha havido uma reversão dos efeitos dos tratamentos usados em nossos protocolos assim que as promastigotas metacíclicas se transformaram em amastigotas dentro dos macrófagos, tornando transientes as modificações decorrentes desses tratamentos. Nossos experimentos foram direcionados para o papel da atividade ecto-nucleotidásica de promastigotas metacíclicas, mas não excluem a

possibilidade de que as mesmas enzimas e/ou a adenosina possam estar envolvidas na manutenção de lesões crônicas se as mesmas diferenças observadas nas promastigotas forem encontradas nas amastigotas. De fato, dados da literatura mostram que, pelo menos para *L. amazonensis*, as formas amastigotas apresentam mais altos níveis de hidrólise de ATP que as promastigotas (Pinheiro e cols., 2006). A participação das amastigotas na regulação da resposta imune do hospedeiro e na manutenção do parasitismo como resultado da ação de ecto-nucleotidases e da produção de adenosina está sob investigação em nosso laboratório. Para isso, tanto a comparação do perfil de expressão dessas enzimas em amastigotas de espécies com diferentes graus de virulência quanto à utilização, nos experimentos de infecção, de promastigotas metacíclicas de parasitos menos virulentos modificados geneticamente para a super-expressão das apirases são abordagens de grande interesse elucidativo.

Uma questão intrigante que procede de nossos resultados é a falta de detecção de alterações significativas na produção de citocinas nos tempos de infecção avaliados, impedindo o delineamento de um mecanismo pelo qual a adenosina age para provocar as alterações clínicas e parasitológicas observadas. Talvez esse problema esteja resumido apenas ao fato de que as medições foram feitas em momentos tardios, onde somente se observam as alterações clínicas provenientes de modificações ocorridas no início da infecção. De fato, a adenosina, enquanto presente no meio extracelular, pode prejudicar a produção de citocinas pró-inflamatórias e/ou de quimiocinas importantes para o início da montagem da resposta contra a infecção. Por isso, estudos referentes à análise da produção de substâncias importantes para o controle da leishmaniose, tais como IFN- γ , TNF, NO, IL-10, quimiocinas e receptores de quimiocinas, poucas horas após a infecção, na presença de adenosina ou de inibidores de receptores P1, podem esclarecer essas dúvidas. Raciocínio semelhante pode ser feito a partir dos resultados dos experimentos feitos com *L. amazonensis* na presença de suramina.

Portanto, este trabalho é o primeiro a mostrar um estudo comparativo a respeito da hidrólise enzimática de nucleotídeos induzida por espécies de *Leishmania* com diferentes níveis de virulência, e os efeitos da adenosina, molécula produzida a partir do metabolismo de ATP, no estabelecimento de parasito no hospedeiro vertebrado. O modelo experimental utilizado, especialmente no que diz respeito à interferência no momento da infecção de formas promastigotas metacíclicas, reflete as ações sobre um

ponto do ciclo biológico – o outro seria o momento da lise de macrófagos com liberação das amastigotas – onde se tem maior probabilidade de se encontrar ATP livre no meio extracelular. Esse modelo serviu como uma ferramenta que comprova a importância da adenosina e, por que não, de toda uma via de metabolismo de nucleotídeos de adenina, no processo de infecção por parasitos do gênero *Leishmania*. De futuras interferências em determinados pontos dessa via podem surgir ferramentas terapêuticas auxiliares no controle das leishmanioses.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- Para as espécies de *Leishmania* estudadas, observou-se uma correlação entre o grau de virulência e a capacidade de hidrólise de nucleotídeos de adenina;
- O fato de formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* apresentarem maior capacidade de hidrólise de nucleotídeos de adenina que as formas procíclicas da mesma espécie sugere a ocorrência de expressão de nucleotidasas dependente de metaciclogênese;
- A maior hidrólise de nucleotídeos de adenina observada para as promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* pode ser explicada, pelo menos em parte, pela maior expressão de apirases na membrana plasmática desses parasitos;
- A adenosina exerce um efeito exacerbante sobre o tamanho de lesão e o parasitismo resultantes de infecção de camundongos C57BL/6 por *L. braziliensis*, conforme observado após a infecção de formas promastigotas metacíclicas desse parasito na presença dessa molécula ou exercendo atividade ecto-5'-nucleotidásica aumentada;
- Apesar de não se poder descartar o efeito da adenosina extracelular na nutrição do parasito, o efeito da mesma no aumento de lesão e no parasitismo na infecção por *L. braziliensis* ocorre, pelo menos em parte, como resultado de sua ação sobre receptores A_{2B} , já que a inibição desses receptores causou um quadro invertido ao observado pela adição de adenosina;
- As apirases de células do hospedeiro e/ou do parasito têm importância no estabelecimento de infecção por *L. amazonensis*, possivelmente devido à sua ação na diminuição da concentração de ATP extracelular, refletindo na redução da ação imuno-estimulante resultante da ligação desse nucleotídeo com receptores $P2X_7$.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBRACCHIO M.P. & CERUTI S. (2007) P1 receptors and cytokine secretion. *Purinergic Signalling* **3**, 13-25.
- ABBRACCHIO M.P., BOEYNAEMS J.M., BARNARD E.A., BOYER J.L., KENNEDY C., MIRAS-PORTUGAL M.T., KING B.F., GACHET C., JACOBSON K.A., WEISMAN G.A. & BURNSTOCK G. (2003) Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol.Sci.* **24**, 52-55.
- ABBRACCHIO M.P., BURNSTOCK G., BOEYNAEMS J.M., BARNARD E.A., BOYER J.L., KENNEDY C., KNIGHT G.E., FUMAGALLI M., GACHET C., JACOBSON K.A. & WEISMAN G.A. (2006) International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol.Rev.* **58**, 281-341.
- AFONSO L.C. & SCOTT P. (1993) Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect.Immun.* **61**, 2952-2959.
- AGA M., JOHNSON C.J., HART A.P., GUADARRAMA A.G., SURESH M., SVAREN J., BERTICS P.J. & DARIEN B.J. (2002) Modulation of monocyte signaling and pore formation in response to agonists of the nucleotide receptor P2X₇. *J.Leukoc.Biol.* **72**, 222-232.
- AHMED S., COLMENARES M., SOONG L., GOLDSMITH-PESTANA K., MUNSTERMANN L., MOLINA R. & MCMAHON-PRATT D. (2003) Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. *Infect.Immun.* **71**, 401-410.
- ALEXANDER J., COOMBS G.H. & MOTTRAM J.C. (1998) *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J.Immunol.* **161**, 6794-6801.
- ARMSTRONG S., KORCOK J., SIMS S.M. & DIXON S.J. (2007) Activation of transcription factors by extracellular nucleotides in immune and related cell types. *Purinergic Signalling* **3**, 59-69.
- ASAI T., MIURA S., SIBLEY L.D., OKABAYASHI H. & TAKEUCHI T. (1995) Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *J.Biol.Chem.* **270**, 11391-11397.

- BARNARD E.A. & SIMON J. (2001) An elusive receptor is finally caught: P2Y(12'), an important drug target in platelets. *Trends Pharmacol.Sci.* **22**, 388-391.
- BARROS F.S., DE MENEZES L.F., PINHEIRO A.A., SILVA E.F., LOPES A.H., DE S.W. & MEYER-FERNANDES J.R. (2000) Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in *Entamoeba histolytica*. *Arch.Biochem.Biophys.* **375**, 304-314.
- BEAN B.P. (1992) Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels. *Trends Pharmacol.Sci.* **13**, 87-90.
- BELOSEVIC M., FINBLOOM D.S., VAN DER MEIDE P.H., SLAYTER M.V. & NACY C.A. (1989) Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. *J.Immunol.* **143**, 266-274.
- BERREDO-PINHO M., PERES-SAMPAIO C.E., CHRISPIM P.P., BELMONT-FIRPO R., LEMOS A.P., MARTINY A., VANNIER-SANTOS M.A. & MEYER-FERNANDES J.R. (2001) A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. *Arch.Biochem.Biophys.* **391**, 16-24.
- BISAGGIO D.F., PERES-SAMPAIO C.E., MEYER-FERNANDES J.R. & SOUTO-PADRON T. (2003) Ecto-ATPase activity on the surface of *Trypanosoma cruzi* and its possible role in the parasite-host cell interaction. *Parasitol.Res.* **91**, 273-282.
- BOGDAN C., ROLLINGHOFF M. & DIEFENBACH A. (2000) Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr.Opin.Immunol.* **12**, 64-76.
- BORSELLINO G., KLEINWIEFELD M., DI M.D., STERNJAK A., DIAMANTINI A., GIOMETTO R., HOPNER S., CENTONZE D., BERNARDI G., DELL'ACQUA M.L., ROSSINI P.M., BATTISTINI L., ROTZSCHKE O. & FALK K. (2007) Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* **110**, 1225-1232.
- BOURS M.J., SWENNEN E.L., DI VIRGILIO F., CRONSTEIN B.N. & DAGNELIE P.C. (2006) Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol.Ther.* 358-404.
- BRITTINGHAM A. & MOSSER D.M. (1996) Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitol.Today* **12**, 444-447.
- BUKAU B., WEISSMAN J. & HORWICH A. (2006) Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* **125**, 443-451.

- BURNSTOCK G. (2007) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol.Life Sci.* **64**, 1471-1483.
- BUXBAUM L.U., DENISE H., COOMBS G.H., ALEXANDER J., MOTTRAM J.C. & SCOTT P. (2003) Cysteine protease B of *Leishmania mexicana* inhibits host Th1 responses and protective immunity. *J.Immunol.* **171**, 3711-3717.
- CARVALHO E.M., BARRAL A., COSTA J.M., BITTENCOURT A. & MARSDEN P. (1994) Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* **56**, 315-325.
- CARVALHO L.H., SANO G., HAFALLA J.C., MORROT A., CUROTTO DE LAFAILLE M.A. & ZAVALA F. (2002) IL-4-secreting CD4+ T cells are crucial to the development of CD8+ T-cell responses against malaria liver stages. *Nat.Med.* **8**, 166-170.
- CHAKOUR R., GULER R., BUGNON M., ALLENBACH C., GARCIA I., MAUEL J., LOUIS J. & TACCHINI-COTTIER F. (2003) Both the Fas ligand and inducible nitric oxide synthase are needed for control of parasite replication within lesions in mice infected with *Leishmania major* whereas the contribution of tumor necrosis factor is minimal. *Infect.Immun.* **71**, 5287-5295.
- CHARLAB R., ROWTON E.D. & RIBEIRO J.M. (2000) The salivary adenosine deaminase from the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Exp.Parasitol.* **95**, 45-53.
- CHATELAIN R., MAUZE S. & COFFMAN R.L. (1999) Experimental *Leishmania major* infection in mice: role of IL-10. *Parasite Immunol.* **21**, 211-218.
- CHATELAIN R., VARKILA K. & COFFMAN R.L. (1992) IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. *J.Immunol.* **148**, 1182-1187.
- COIMBRA E.S., GONCALVES-DA-COSTA S.C., CORTE-REAL S., DE FREITAS F.G., DURAO A.C., SOUZA C.S., SILVA-SANTOS M.I. & VASCONCELOS E.G. (2002) Characterization and cytochemical localization of an ATP diphosphohydrolase from *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Parasitology* **124**, 137-143.
- CONVIT J., PINARDI M.E. & RONDON A.J. (1972) Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **66**, 603-610.
- COSTA J.M., MARSDEN P.D., LLANOS-CUENTAS E.A., NETTO E.M., CARVALHO E.M., BARRAL A., ROSA A.C., CUBA C.C., MAGALHAES A.V. & BARRETO A.C. (1986) Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *J.Trop.Med.Hyg.* **89**, 319-323.

- DE JESUS J.B., DE SA PINHEIRO A.A., LOPES A.H. & MEYER-FERNANDES J.R. (2002) An ectonucleotide ATP-diphosphohydrolase activity in *Trichomonas vaginalis* stimulated by galactose and its possible role in virulence. *Z.Naturforsch.[C.]* **57**, 890-896.
- DEAGLIO S., DWYER K.M., GAO W., FRIEDMAN D., USHEVA A., ERAT A., CHEN J.F., ENJOJI K., LINDEN J., OUKKA M., KUCHROO V.K., STROM T.B. & ROBSON S.C. (2007) Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J.Exp.Med.* **204**, 1257-1265.
- DENISE H., MCNEIL K., BROOKS D.R., ALEXANDER J., COOMBS G.H. & MOTTRAM J.C. (2003) Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence in vivo. *Infect.Immun.* **71**, 3190-3195.
- DI VIRGILIO F. (2007) Purinergic signalling in the immune system. A brief update. *Purinergic Signalling* **3**, 1-3.
- DINARELLO C.A. (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**, 2095-2147.
- DONNELLY-ROBERTS D.L. & JARVIS M.F. (2007) Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br.J.Pharmacol.* **151**, 571-579.
- DORSAM R.T. & KUNAPULI S.P. (2004) Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation. *J.Clin.Invest* **113**, 340-345.
- ELAMIN E.M., GUIZANI I., GUERBOUJ S., GRAMICCIA M., EL HASSAN A.M., DI M.T., TAHA M.A. & MUKHTAR M.M. (2008) Identification of *Leishmania donovani* as a cause of cutaneous leishmaniasis in Sudan. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **102**, 54-57.
- FERRANDI M., TRIPODI G., SALARDI S., FLORIO M., MODICA R., BARASSI P., PARENTI P., SHAINSKAYA A., KARLISH S., BIANCHI G. & FERRARI P. (1996) Renal Na,K-ATPase in genetic hypertension. *Hypertension* **28**, 1018-1025.
- FERRARI D., PIZZIRANI C., ADINOLFI E., LEMOLI R.M., CURTI A., IDZKO M., PANTHER E. & DI VIRGILIO F. (2006) The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J.Immunol.* **176**, 3877-3883.
- FERRO C., MORRISON A.C., TORRES M., PARDO R., WILSON M.L. & TESH R.B. (1995) Species composition and relative abundance of sand flies of the genus *Lutzomyia* (Diptera: *Psychodidae*) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J.Med.Entomol.* **32**, 527-537.

- FIETTO J.L., DEMARCO R., NASCIMENTO I.P., CASTRO I.M., CARVALHO T.M., DE S.W., BAHIA M.T., ALVES M.J. & VERJOVSKI-ALMEIDA S. (2004) Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **316**, 454-460.
- FIETTO L.G., PUGLIESE L. & GOMES S.L. (2002) Characterization and expression of two genes encoding isoforms of a putative Na, K-ATPase in the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. *Biochim.Biophys.Acta* **1576**, 59-69.
- FREDHOLM B.B., ABBRACCHIO M.P., BURNSTOCK G., DALY J.W., HARDEN T.K., JACOBSON K.A., LEFF P. & WILLIAMS M. (1994) Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol.Rev.* **46**, 143-156.
- FRETES R.E., PAGLINI P., FERNANDEZ A.R., ENDERS J. & DE FABRO S.P. (1999) *Trypanosoma cruzi*: increased 5'-nucleotidase activity associated with dysfunction of adrenergic receptors in acutely infected albino Swiss mice. *J.Parasitol.* **85**, 970-972.
- GALVAO C.E., SILVA A.C., SALDANHA A.C., SILVA C.M., COSTA M.R. & COSTA J.M. (1993) [Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania Viannia braziliensis* in the state of Maranhão, Brazil]. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* **26**, 121-123.
- GONZALEZ-ASEGUINOLAZA G., TALADRIZ S., MARQUET A. & LARRAGA V. (1999) Molecular cloning, cell localization and binding affinity to DNA replication proteins of the p36/LACK protective antigen from *Leishmania infantum*. *Eur.J.Biochem.* **259**, 909-916.
- GORDON J.L. (1986) Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem.J.* **233**, 309-319.
- GOTTLIEB M. & DWYER D.M. (1983) Evidence for distinct 5'- and 3'-nucleotidase activities in the surface membrane fraction of *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol.Biochem.Parasitol.* **7**, 303-317.
- GOUNARIS K. (2002) Nucleotidase cascades are catalyzed by secreted proteins of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Infect.Immun.* **70**, 4917-4924.
- GREENBERG S.S., ZHAO X., WANG J.F., HUA L. & OUYANG J. (1997) cAMP and purinergic P2Y receptors upregulate and enhance inducible NO synthase mRNA and protein in vivo. *Am.J.Physiol* **273**, L967-L979
- HANDMAN E. (2001) Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin.Microbiol.Rev.* **14**, 229-243.
- HANDMAN E. & BULLEN D.V. (2002) Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.* **18**, 332-334.

- HANLEY P.J., MUSSET B., RENIGUNTA V., LIMBERG S.H., DALPKE A.H., SUS R., HEEG K.M., PREISIG-MULLER R. & DAUT J. (2004) Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca²⁺ and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 9479-9484.
- HASKO G., KUHEL D.G., CHEN J.F., SCHWARZSCHILD M.A., DEITCH E.A., MABLEY J.G., MARTON A. & SZABO C. (2000) Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J.* **14**, 2065-2074.
- HECHLER B., CATTANEO M. & GACHET C. (2005) The P2 receptors in platelet function. *Semin.Thromb.Hemost.* **31**, 150-161.
- HEINZEL F.P., SADICK M.D., HOLADAY B.J., COFFMAN R.L. & LOCKSLEY R.M. (1989) Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J.Exp.Med.* **169**, 59-72.
- HEINZEL F.P., SADICK M.D., MUTHA S.S. & LOCKSLEY R.M. (1991) Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 7011-7015.
- HOFER S., IVARSSON L., STOITZNER P., AUFFINGER M., RAINER C., ROMANI N. & HEUFLER C. (2003) Adenosine slows migration of dendritic cells but does not affect other aspects of dendritic cell maturation. *J.Invest Dermatol.* **121**, 300-307.
- ILG T. (2000) Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by *Leishmania mexicana*. *EMBO J.* **19**, 1953-1962.
- JACOBSON K.A. & GAO Z.G. (2006) Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat.Rev.Drug Discov.* **5**, 247-264.
- JESUS J.B., LOPES A.H. & MEYER-FERNANDES J.R. (2002) Characterization of an ecto-ATPase of *Tritrichomonas foetus*. *Vet.Parasitol.* **103**, 29-42.
- JI J., MASTERSON J., SUN J. & SOONG L. (2005) CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J.Immunol.* **174**, 7147-7153.
- JI J., SUN J. & SOONG L. (2003) Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect.Immun.* **71**, 4278-4288.

- JONES D.E., ACKERMANN M.R., WILLE U., HUNTER C.A. & SCOTT P. (2002) Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. *Infect.Immun.* **70**, 2151-2158.
- JONES D.E., BUXBAUM L.U. & SCOTT P. (2000) IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. *J.Immunol.* **165**, 364-372.
- KOBIE J.J., SHAH P.R., YANG L., REBHAIN J.A., FOWELL D.J. & MOSMANN T.R. (2006) T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J.Immunol.* **177**, 6780-6786.
- KOPF M., BROMBACHER F., KOHLER G., KIENZLE G., WIDMANN K.H., LEFRANG K., HUMBORG C., LEDERMANN B. & SOLBACH W. (1996) IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*. *J.Exp.Med.* **184**, 1127-1136.
- KRECKLER L.M., WAN T.C., GE Z.D. & AUCHAMPACH J.A. (2006) Adenosine inhibits tumor necrosis factor-alpha release from mouse peritoneal macrophages via A2A and A2B but not the A3 adenosine receptor. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **317**, 172-180.
- KUNZELMANN K. & MALL M. (2003) Pharmacotherapy of the ion transport defect in cystic fibrosis: role of purinergic receptor agonists and other potential therapeutics. *Am.J.Respir.Med.* **2**, 299-309.
- KUSNER D.J. & BARTON J.A. (2001) ATP stimulates human macrophages to kill intracellular virulent Mycobacterium tuberculosis via calcium-dependent phagosome-lysosome fusion. *J.Immunol.* **167**, 3308-3315.
- LA SALA A., DI VIRGILIO F., IDZKO M., NORGAUER J. & GIROLOMONI G. (2003) Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J.Leukoc.Biol.* **73**, 339-343.
- LAINSON R. & SHAW J.J. (1988) Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). *Ann.Parasitol.Hum.Comp* **63**, 134-145.
- LAMBRECHT G. (2000) Agonists and antagonists acting at P2X receptors: selectivity profiles and functional implications. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **362**, 340-350.
- LANGSTON H.P., KE Y., GEWIRTZ A.T., DOMBROWSKI K.E. & KAPP J.A. (2003) Secretion of IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. *J.Immunol.* **170**, 2962-2970.

- LAPPAS C.M., RIEGER J.M. & LINDEN J. (2005) A2A adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4+ T cells. *J.Immunol.* **174**, 1073-1080.
- LATTIME E.C., STOPPACCIARO A. & STUTMAN O. (1988) Limiting dilution analysis of TNF producing cells in C3H/HeJ mice. *J.Immunol.* **141**, 3422-3428.
- LAUNOIS P., MAILLARD I., PINGEL S., SWIHART K.G., XENARIOS I., ACHA-ORBEA H., DIGGELMANN H., LOCKSLEY R.M., MACDONALD H.R. & LOUIS J.A. (1997) IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity.* **6**, 541-549.
- LEOPOLDO P.T., MACHADO P.R., ALMEIDA R.P., SCHRIEFER A., GIUDICE A., DE JESUS A.R., HO J.L., GUIMARAES L.H., BACELLAR O. & CARVALHO E.M. (2006) Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. *BMC.Infect.Dis.* **6**, 75-80.
- LIEW F.Y., LI Y. & MILLOTT S. (1990) Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Immunology* **71**, 556-559.
- LO S.K., BOVIS L., MATURA R., ZHU B., HE S., LUM H., TURCO S.J. & HO J.L. (1998) *Leishmania* lipophosphoglycan reduces monocyte transendothelial migration: modulation of cell adhesion molecules, intercellular junctional proteins, and chemoattractants. *J.Immunol.* **160**, 1857-1865.
- LOWRY O.H., FARR A.L., RANDALL R.J. & ROSEBROUGH N.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* **193**, 265-275.
- MACKENZIE A.B., SURPRENANT A. & NORTH R.A. (1999) Functional and molecular diversity of purinergic ion channel receptors. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **868**, 716-729.
- MAHAUT-SMITH M.P., ENNION S.J., ROLF M.G. & EVANS R.J. (2000) ADP is not an agonist at P2X(1) receptors: evidence for separate receptors stimulated by ATP and ADP on human platelets. *Br.J.Pharmacol.* **131**, 108-114.
- MAIOLI T.U., TAKANE E., ARANTES R.M., FIETTO J.L. & AFONSO L.C. (2004) Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. *Parasitol.Res.* **94**, 207-212.
- MARR J.J., BERENS R.L. & NELSON D.J. (1978) Purine metabolism in *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis*. *Biochim.Biophys.Acta* **544**, 360-371.

- MARZOCHI M.C. & MARZOCHI K.B. (1994) Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad.Saude Publica* **10 Suppl 2**, 359-375.
- MATTNER F., ALBER G., MAGRAM J. & KOPF M. (1997) The role of IL-12 and IL-4 in *Leishmania major* infection. *Chem.Immunol.* **68**, 86-109.
- MCCONVILLE M.J., MULLIN K.A., ILGOUTZ S.C. & TEASDALE R.D. (2002) Secretory pathway of trypanosomatid parasites. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **66**, 122-154.
- MEYER-FERNANDES J.R. (2002) Ecto-ATPases in protozoa parasites: looking for a function. *Parasitol.Int.* **51**, 299-303.
- MEYER-FERNANDES J.R., DUTRA P.M., RODRIGUES C.O., SAAD-NEHME J. & LOPES A.H. (1997) Mg-dependent ecto-ATPase activity in *Leishmania tropica*. *Arch.Biochem.Biophys.* **341**, 40-46.
- MEYER-FERNANDES J.R., SAAD-NEHME J., PERES-SAMPAIO C.E., BELMONT-FIRPO R., BISAGGIO D.F., DO COUTO L.C., FONSECA DE SOUZA A.L., LOPES A.H. & SOUTO-PADRON T. (2004) A Mg-dependent ecto-ATPase is increased in the infective stages of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol.Res.* **93**, 41-50.
- MISRA S., FARROW A.L. & CHAUDHURI G. (2005) Stage-specific expressions of four different ribonuclease H genes in *Leishmania*. *EXCLI Journal* **4**, 34-48.
- MISUMI Y., OGATA S., OHKUBO K., HIROSE S. & IKEHARA Y. (1990a) Primary structure of human placental 5'-nucleotidase and identification of the glycolipid anchor in the mature form. *Eur.J.Biochem.* **191**, 563-569.
- MISUMI Y., SOHDA M. & IKEHARA Y. (1990b) Nucleotide and deduced amino acid sequence of rat complement C3. *Nucleic Acids Res.* **18**, 2178
- MOORE K.W., O'GARRA A., DE WAAL M.R., VIEIRA P. & MOSMANN T.R. (1993) Interleukin-10. *Annu.Rev.Immunol.* **11**, 165-190.
- MOSMANN T.R. (1994) Properties and functions of interleukin-10. *Adv.Immunol.* **56**, 1-26.
- MOSSALAYI M.D., AROCK M., MAZIER D., VINCENDEAU P. & VOULDOUKIS I. (1999) The human immune response during cutaneous leishmaniasis: NO problem. *Parasitol.Today* **15**, 342-345.
- MOSSER D.M. & BRITTINGHAM A. (1997) *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology* **115 Suppl**, S9-23.

- MOUGNEAU E., ALTARE F., WAKIL A.E., ZHENG S., COPPOLA T., WANG Z.E., WALDMANN R., LOCKSLEY R.M. & GLAICHENHAUS N. (1995) Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. *Science* **268**, 563-566.
- NORTH R.A. (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* **82**, 1013-1067.
- NORTH R.A. & SURPRENANT A. (2000) Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **40**, 563-580.
- OGATA S., HAYASHI Y., MISUMI Y. & IKEHARA Y. (1990) Membrane-anchoring domain of rat liver 5'-nucleotidase: identification of the COOH-terminal serine-523 covalently attached with a glycolipid. *Biochemistry* **29**, 7923-7927.
- PANTHER E., CORINTI S., IDZKO M., HEROUY Y., NAPP M., GIROLOMONI G. & NORGAUER J. (2003) Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. *Blood* **101**, 3985-3990.
- PANZER U., STEINMETZ O.M., REINKING R.R., MEYER T.N., FEHR S., SCHNEIDER A., ZAHNER G., WOLF G., HELMCHEN U., SCHAEERLI P., STAHL R.A. & THAISS F. (2006) Compartment-specific expression and function of the chemokine IP-10/CXCL10 in a model of renal endothelial microvascular injury. *J.Am.Soc.Nephrol.* **17**, 454-464.
- PARK A.Y., HONDOWICZ B., KOPF M. & SCOTT P. (2002) The role of IL-12 in maintaining resistance to *Leishmania major*. *J.Immunol.* **168**, 5771-5777.
- PATEROU A., WALRAD P., CRADDY P., FENN K. & MATTHEWS K. (2006) Identification and stage-specific association with the translational apparatus of TbZFP3, a cch protein that promotes trypanosome life cycle development. *J.Biol.Chem.*
- PINHEIRO C.M., MARTINS-DUARTE E.S., FERRARO R.B., FONSECA DE SOUZA A.L., GOMES M.T., LOPES A.H., VANNIER-SANTOS M.A., SANTOS A.L. & MEYER-FERNANDES J.R. (2006) *Leishmania amazonensis*: Biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. *Exp.Parasitol.* **114**, 16-25.
- PLESNER L. (1995) Ecto-ATPases: identities and functions. *Int.Rev.Cytol.* **158**, 141-214.
- PLUMMER T.H., Jr., ELDER J.H., ALEXANDER S., PHELAN A.W. & TARENTINO A.L. (1984) Demonstration of peptide:N-glycosidase F activity in endo-beta-N-acetylglucosaminidase F preparations. *J.Biol.Chem.* **259**, 10700-10704.

- RALEVIC V. & BURNSTOCK G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol.Rev.* **50**, 413-492.
- RASKOVALOVA T., HUANG X., SITKOVSKY M., ZACHARIA L.C., JACKSON E.K. & GORELIK E. (2005) Gs protein-coupled adenosine receptor signaling and lytic function of activated NK cells. *J.Immunol.* **175**, 4383-4391.
- RIBEIRO J.M., KATZ O., PANNELL L.K., WAITUMBI J. & WARBURG A. (1999) Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. *J.Exp.Biol.* **202**, 1551-1559.
- RIBEIRO J.M., ROWTON E.D. & CHARLAB R. (2000) The salivary 5'-nucleotidase/phosphodiesterase of the hematophagus sand fly, *Lutzomyia longipalpis* [corrected]. *Insect Biochem.Mol.Biol.* **30**, 279-285.
- RITTIG M.G. & BOGDAN C. (2000) *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol.Today* **16**, 292-297.
- ROGERS K.A. & TITUS R.G. (2003) Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. *Parasite Immunol.* **25**, 127-134.
- SCHNURR M., THEN F., GALAMBOS P., SCHOLZ C., SIEGMUND B., ENDRES S. & EIGLER A. (2000) Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. *J.Immunol.* **165**, 4704-4709.
- SCOTT P. (1991) IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J.Immunol.* **147**, 3149-3155.
- SITKOVSKY M.V. & OHTA A. (2005) The 'danger' sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? *Trends Immunol.* **26**, 299-304.
- SOONG L., CHANG C.H., SUN J., LONGLEY B.J., Jr., RUDDLE N.H., FLAVELL R.A. & MAHON-PRATT D. (1997) Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *J.Immunol.* **158**, 5374-5383.
- SOTO F., GARCIA-GUZMAN M. & STUHMER W. (1997) Cloned ligand-gated channels activated by extracellular ATP (P2X receptors). *J.Membr.Biol.* **160**, 91-100.
- SPATH G.F. & BEVERLEY S.M. (2001) A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Exp.Parasitol.* **99**, 97-103.

- SPATH G.F., GARRAWAY L.A., TURCO S.J. & BEVERLEY S.M. (2003) The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 9536-9541.
- STAGER S., ALEXANDER J., CARTER K.C., BROMBACHER F. & KAYE P.M. (2003) Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. *Infect.Immun.* **71**, 4804-4807.
- STEINBERG T.H. & DI VIRGILIO F. (1991) Cell-mediated cytotoxicity: ATP as an effector and the role of target cells. *Curr.Opin.Immunol.* **3**, 71-75.
- SURPRENANT A., RASSENDREN F., KAWASHIMA E., NORTH R.A. & BUELL G. (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* **272**, 735-738.
- TASCA T., BONAN C.D., CARLI G.A., BATTASTINI A.M. & SARKIS J.J. (2003) Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) activity in intact cells of *Trichomonas vaginalis*. *Exp.Parasitol.* **105**, 167-173.
- TASCA T., BONAN C.D., DE CARLI G.A., SARKIS J.J. & ALDERETE J.F. (2005) Heterogeneity in extracellular nucleotide hydrolysis among clinical isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology* **131**, 71-78.
- TAUSSKY H.H. & SHORR E. (1953) A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J.Biol.Chem.* **202**, 675-685.
- TEIXEIRA S.M. (1998) Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Braz.J.Med.Biol.Res.* **31**, 1503-1516.
- THOMPSON L.F., ELTZSCHIG H.K., IBLA J.C., VAN DE WIELE C.J., RESTA R., MOROTE-GARCIA J.C. & COLGAN S.P. (2004) Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J.Exp.Med.* **200**, 1395-1405.
- TORRENTERA F.A., GLAICHENHAUS N., LAMAN J.D. & CARLIER Y. (2001) T-cell responses to immunodominant LACK antigen do not play a critical role in determining susceptibility of BALB/c mice to *Leishmania mexicana*. *Infect.Immun.* **69**, 617-621.
- TRINCHIERI G. (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat.Rev.Immunol.* **3**, 133-146.
- TURETZ M.L., MACHADO P.R., KO A.I., ALVES F., BITTENCOURT A., ALMEIDA R.P., MOBASHERY N., JOHNSON W.D., Jr. & CARVALHO E.M. (2002) Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J.Infect.Dis.* **186**, 1829-1834.

- VALERA S., HUSSY N., EVANS R.J., ADAMI N., NORTH R.A., SURPRENANT A. & BUELL G. (1994) A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* **371**, 516-519.
- VON KUGELGEN I. (2005) Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol.Ther.* **110**, 415-432.
- WILKIN F., DUHANT X., BRUYNS C., SUAREZ-HUERTA N., BOEYNAEMS J.M. & ROBAYE B. (2001) The P2Y11 receptor mediates the ATP-induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J.Immunol.* **166**, 7172-7177.
- ZIMMERMANN H. (1992) 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem.J.* **285 (Pt 2)**, 345-365.
- ZIMMERMANN H. (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **362**, 299-309.
- ZINGALES B., CARNIOL C., ABRAMHAMSOHN P.A. & COLLI W. (1979) Purification of an adenylyl cyclase-containing plasma membrane fraction from *Trypanosoma cruzi*. *Biochim.Biophys.Acta* **550**, 233-244.