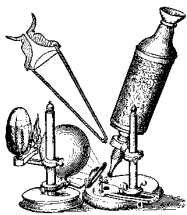


**Camila Marques da Silva**

**Receptores para nucleotídeos P2 e sua modulação  
durante a infecção com *Leishmania amazonensis***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU  
DE MESTRE EM CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS  
PROGRAMA DE CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS



**Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Ciências Morfológicas  
2006**



# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**Camila Marques da Silva**

**Receptores para nucleotídeos P2 e sua modulação  
durante a infecção com *Leishmania amazonensis***

Dissertação de mestrado submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro  
visando à obtenção do grau de Mestre em Ciências Morfológicas  
(Morfologia)

Orientador: Prof<sup>o</sup> Robson Coutinho-Silva  
Prof. Adjunto do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
CCS/UFRJ

Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
2006

**Camila Marques da Silva**

**Receptores para nucleotídeos P2 e sua modulação  
durante a infecção com *Leishmania amazonensis***

Dissertação de mestrado submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro  
visando à obtenção do grau de Mestre em Ciências Morfológicas  
(Morfologia)

Aprovada por:

---

Dra. Ana Maria Blanco Martinez

---

Dra. Bartira Rossi Bergmann

---

Dra. Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek

---

Dra. Regina Coeli dos Santos Goldenberg (Revisora)

---

Dr. Robson Coutinho-Silva (Orientador)

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Marques, Camila Silva.**

**Receptores para nucleotídeos P2 e sua modulação  
durante a infecção com *Leishmania amazonensis***

Rio de Janeiro: UFRJ/CCS/ICB/Instituto de Ciências Biomédicas, 2006.

p.157

Dissertação de Mestrado em Ciências Morfológicas (Morfologia)

**1.Receptores P2**

**2.L. amazonensis**

**3.Apoptose**

Este trabalho foi realizado no laboratório de Imunobiofísica  
localizado no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho com os  
auxílios financeiros concedidos pela FAPERJ e CNPq

# **Receptores para nucleotídeos P2 e sua modulação durante a infecção com *Leishmania amazonensis***

Camila Marques da Silva

Dissertação de Mestrado submetida ao corpo docente do curso de pós-graduação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ, como parte dos quesitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Morfológicas (Morfologia)

Dezembro 2006

**“Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem o que com frequência, poderíamos ganhar, por simples medo de arriscar”.**  
**William Shakespeare**



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir chegar até aqui nesta jornada, por ter feito a natureza tão perfeita e complexa para que nós pudéssemos desvendá-la.

Agradeço principalmente a minha família, que começou tudo isso, que inspirou em mim o desejo de continuar e de ser bem-sucedida na vida.

Ao meu pai exemplo de perseverança, amizade, seriedade, responsabilidade e por ter sempre confiado em mim.

A minha mãe que de sua maneira sempre lutou para que seus filhos tivessem o melhor da vida e que não passassem o que ela já passou, exemplo de perseverança, responsabilidade e visão de futuro agora se mostra praticamente uma das melhores veterinárias já vistas. Respeito muitíssimo seu caráter investigativo e sempre dedicado ao iniciar uma universidade depois dos 40 anos de idade.

Ao Vinícius irmãozinho pequeno de 20 anos que sempre me ajudou nas horas que o computador resolvia travar, além de me fazer almoços deliciosos a base de miojo quando eu ficava em frente ao computador.

Aos meus avós Terezinha e Hélio por terem me criado tão bem e tão carinhosamente, meu amor por vocês é incondicional; Aos avós Neide e Irso que sempre me divertiram e são umas das pessoas mais interessantes que conheço.

Ao querido e amado orientador Robson Coutinho-Silva que acolheu uma aluna ainda muito *naive* de universidade particular e sem preconceitos confiou em mim e sempre me inspirou a continuar e que também me mostrou que ser um professor competente não significa ser arrogante

Ao professor Pedro Persechini por ser um homem tão inteligente, dedicado e doce, obrigada pelas discussões de resultados que de início pareciam ser tão truncados.

A amiga “agarrada” Flavinha que me apresentou ao laboratório de Imunobiofísica e que desde os tempos de faculdade dividiu comigo os problemas e alegrias relacionadas ao trabalho, amor, amizade... enfim muito obrigada amiga! Vamos continuar tomando muita Coca-Cola *light* para “acalmar os nervos”. Ah, seu kit sobrevivência continua lá em casa!

Aos amigos Renata e Rodrigo por serem pessoas tão especiais e amigas, sempre torcendo pra valer para que todas as coisas dessem certo.

As amigas Carol e Nathália que sempre meigas tentavam contornar os problemas do laboratório e também dividiam o fardo de ser *robsetes*.

Aos técnicos Vandir e Hércules que atualmente considero como amigos divertidíssimos e sempre dispostos a ajudar seja com cultura, citometria ou questões políticas.

A amiga Gladys que sempre chorou, riu, dançou e estudou comigo em tempos nebulosos que agora estão para ensolarar

A todos do laboratório de Imunobiofísica meu muito obrigado pelo apoio, companheirismo e confiança.

Aos amigos do laboratório de Imunofarmacologia, especialmente a profesora Bartira Rossi-Bergman e a Suzana que sempre fofíssima me ajudou em problemas leishmaniosos e também atacando de cupido.

A professora Marlene Benchimol que me apresentou a vida científica, e mostrou que bons resultados não caem de árvores e sim de trabalho duro.

As professoras Ana Maria Martinez, Bartira Rossi-Bergman e Vivian Rumjanek por fazerem parte de minha banca de tese.

A professora Regina Coeli dos Santos Goldenberg por ter revisado esta tese e tão amorosamente ter me recebido em sua casa.

E, por último mas não menos importante ao Rafael, que durante toda a minha jornada de estudos desde a graduação esteve ao meu lado me apoiando e me ajudando em todas as minhas decisões. Me ouvia quando estava estressada escrevendo este trabalho e me trazendo palavras de conforto e paz. É maravilhoso estar amando você há 6 anos.

## RESUMO

Os receptores para nucleotídeos P2 encontram-se relacionados a diversos fenômenos fisiológicos como agregação de plaquetas, quimiotaxia, liberação de citocinas pró-inflamatórias, morte celular por apoptose e necrose e morte de patógenos intracelulares. Neste trabalho, utilizamos técnicas bioquímicas e funcionais para avaliar a expressão funcional de receptores P2 em macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Observamos que a infecção modifica a resposta padrão de variação de cálcio intracelular para ATP, UTP e UDP. O EC<sub>50</sub> encontrado para cada nucleotídeo sugere a modulação de receptores P2 pirimidinérgicos adicionais. Ensaio de variação de cálcio demonstraram que, durante a infecção dos macrófagos com *L. amazonensis* o receptor P2X<sub>7</sub> encontra-se mais expresso o que foi confirmado pelo aumento de proteína por western blot e apoptose induzida por ATP. Em micrografias de microscopia eletrônica observou-se durante a infecção, aumento de vacúolos citoplasmáticos e vacúolos parasitóforos alterados na presença dos nucleotídeos ATP e UTP. Através de microscopia óptica de fluorescência observamos macrófagos apresentando núcleos condensados com características apoptóticas quando tratados com ATP e UTP, além da diminuição da carga parasitária em tratamento com os mesmos. Estes achados foram confirmados por ensaios de citometria de fluxo. Observamos também que a infecção torna os macrófagos sensíveis à apoptose induzida por UTP e UDP. Portanto, na infecção de macrófagos com *L. amazonensis*, o receptor P2X<sub>7</sub>, e dois receptores P2Y, com características de P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>6</sub> são modulados positivamente, promovem a morte celular por apoptose e podem possuir papel fisiológico na infecção.

## ABSTRACT

P2 receptors activation triggers an important physiological response that has been linked to platelet aggregation, activation, signaling, inflammation, cell death such as necrosis and apoptosis, including also killing of intracellular parasites. In this work we use biochemical and functional techniques in order to evaluate the functional expression of these receptors. Through calcium measurements it was possible to detect some alterations on the amount of response induced by ATP and UTP in *Leishmania* infected macrophages. In a pharmacological approach we defined the EC<sub>50</sub> to each nucleotide; which defines additional receptors in the infection. Here in, we show that P2X<sub>7</sub> is indeed positively modulated in the infection through calcium measurements and western blot analysis.

Here, we show as well, ultra structural alterations associated to the P2 receptors activation during the infection induced by ATP and UTP. In fluorescence microscopy approach we show the presence of apoptotic nuclei in infected macrophages treated with ATP, UTP e UTP. As well as reduced infection.

In the present work we demonstrated that, P2X<sub>7</sub> and two different P2Y receptors promote parasite death through apoptosis. That data suggests that P2 receptors might play an important physiological role *Leishmania* infection.

## SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 – Parasitas Intracelulares	2
1.1.1 – Protozoários	5
1.1.2 – Leishmaniose	5
1.1.3 – Ciclo de Vida	6
1.1.4 – A doença	7
1.1.5 – Evasão do sistema imune	9
1.1.6 – Ciclo de Vida Intracelular	11
1.2 – Receptores P2	14
1.3 – Papel de Receptores P2 na Morte Celular	30
1.4 – Papel de Receptores P2 na Infecção	35
1.4.1 – Na Infecção Bacteriana	38
1.4.2 – Na Infecção por Protozoários	40
2.1 – OBJETIVO	42
2.2 – Objetivos Específicos	43
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	44
4 – RESULTADOS	56
4.1 – Alterações morfológicas em macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> tratados com nucleotídeos	57
4.2 – Microscopia Óptica de Fluorescência	67
4.3 – Apoptose Induzida por Nucleotídeos em Macrófagos Infectados com <i>L. amazonensis</i>	73
4.4 – Curvas Dose- Resposta na Apoptose	86
4.5 – Uso de Antagonistas de Receptores P2 na apoptose Induzida por Nucleotídeos	90

4.6 – Avaliação do Possível Efeito Indutor de Necrose no Tratamento de Macrófagos com ATP, UTP e UDP	94
4.7 – Alteração do Recrutamento de Cálcio Intracelular Induzido por Nucleotídeos após Infecção por Leishmania	97
4.8 – Curva Dose-Resposta De Variação De Cálcio Intracelular por ATP , UTP e UDP	107
4.9 – Variação De Cálcio Intracelular em Perfusão contínua de ATP	117
4.10 – O Receptor P2X <sub>7</sub> se Encontra Expresso em Maior Quantidade em Macrófagos Infectados	120
5 –DISCUSSÃO	121
6 –CONCLUSÕES	131
7 –PERSPECTIVAS FUTURAS	133
8 –REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135
9 – ANEXOS	155
9.1–Anexo 1	156
9.2–Anexo 2	157
9.3–Anexo 3	158

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADO	Adenosina
ATP	5`- trifosfato de adenosina
AMP	5`- monofosfato de adenosina
ATPe	5`- trifosfato de adenosina extracelular
UTP	5`- trifosfato de uridina
UMP	5`- monofosfato de uridina
$\alpha$ $\beta$ Met ATP	Alfa beta metileno ATP
$_{ox}$ ATP	ATP oxidado
ADP	5`- difosfato de adenosina
Bz-ATP	2',3'-(4-benzoil)-benzoil ATP
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (Phosphate Buffered Saline)
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
DMEM	Dulbeccos's Modification of Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
GFP	Proteína Verde Fluorescente (Green Fluorescent Protein)
HEPES	(n-{2-Hydroxyethyl} Piperazine-N'-{2-Ethanesulfonic acid})
Th1	Linfócito T auxiliar 1 (T helper 1)
Th2	Linfócito T auxiliar 2 (T helper 2)
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-12	Interleucina 12
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
MHCII	Complexo de Histocompatibilidade Principal Classe 2
VP	Vacúolo Parasitóforo
ROI/ROS	Intermediários Reativos de Oxigênio
BIC	Bicarbonato
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
SFB	Soro Fetal Bovino
FACS	Citômetro de Fluxo (Fluorescence Activated Cell Sorter)
EC <sub>50</sub>	Concentração molar de um agonista para 50% da resposta máxima
ATPases	Enzimas que clivam o ATP (nucleotidases)
BE	Brometo de Etídeo
ATP <sup>4-</sup>	forma tetravalente do ATP



EGTA	ácido etileno-bis(oxietileno-nitrilo)-tetracético
ERK	Quinase
Gi	Proteína G inibitória
Gq	Proteína G estimulatória via fosfolipases
HEPES	Ácido 4-(2-hidróxi-etil)-1-piperazino-etossulfônico
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
PPADS	Ácido pirodoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-dissulfônico
TM	Transmembrana
TTSS	Sistema de secreção bacteriana
iNOS	Indutor de óxido nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
LPG	Lipofosfoglicano
GTPase	Enzimas que clivam o GTP (nucleotidase)

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
Figura 1- Mapa Leishmaniose cutânea	8
Figura 2- Esquema de Internalização de <i>Leishmania</i>	11
Figura 3- Ação da ectonucleotidases sobre o ATPe	15
Figura 4- Estrutura dos receptores P2Y	18
Figura 5- Distribuição dos receptores P2Y em sistema nervoso	18
Figura 6- Estrutura dos receptores P2X	24
Figura 7- Distribuição dos receptores P2X em sistema nervoso	24
Figura 8- Alterações morfológicas provocadas pelo receptor P2X <sub>7</sub> em células HEK293	33
Figura 9- Efeito direto dos parasitas e seus produtos na morte celular do hospedeiro	34
Figura 10- Gráficos ilustrativos do método de análise da fragmentação do DNA de macrófagos	50
Figura 11- Microscopia de contraste de fase, macrófagos em cultura.	60
Figura 12- Micrografia eletrônica de macrófago controle e infectados tratados com diferentes nucleotídeos.	65
Figura 13- Microscopia óptica de fluorescência	68
Figura 14- Microscopia óptica de fluorescência	71
Figura 15- Apoptose Induzida por Nucleotídeos em Macrófagos de camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i>	75
Figura 16- Apoptose Induzida por Nucleotídeos em Macrófagos de camundongos C57BL6 infectados com <i>L. amazonensis</i>	79
Figura 17- - Apoptose Induzida por Nucleotídeos em Macrófagos de camundongos C57BL6 KOP2X <sub>7</sub> infectados com <i>L. amazonensis</i>	81
Figura 18- Comparação da porcentagem máxima de apoptose induzida em macrófagos infectados, por diferentes nucleotídeos	84
Figura 19- Curva dose-resposta na apoptose	88
Figura 20- Antagonistas de receptores P2 na Apoptose induzida por nucleotídeos	92
Figura 21- Ensaio de liberação de LDH em macrófagos infectados ou não com <i>L. amazonensis</i> .	95
Figura 22- Medições de Cálcio Intracelular	99

Figura 23- Medições de Cálcio Intracelular. Macrófagos que fagocitaram partículas de látex.	101
Figura 24- Curva dose-resposta da mobilização de cálcio ao ATP em macrófagos não infectados e Infectados com <i>L. amazonensis</i> .	108
Figura 25- Curva dose-resposta da mobilização de cálcio ao UTP em macrófagos não infectados e Infectados com <i>L. amazonensis</i>	110
Figura 26-- Curva dose-resposta da mobilização de cálcio ao UDP em macrófagos não infectados e Infectados com <i>L. amazonensis</i>	112
Figura 27- Comparação da mobilização máxima de cálcio entre macrófagos não infectadas e infectados.	114
Figura 28- Variações de cálcio intracelular ao constante estímulo com ATP 1mM	117
Figura 29-- Western Blotting . Marcação com anticorpo anti-P2X <sub>7</sub>	120
Tabela 1- Estratégia de sobrevivência de patógenos intracelulares	4
Tabela 2- Distribuição e principais agonistas/antagonistas de receptores P2Y	22
Tabela 3- Distribuição e principais agonistas/antagonistas de receptores P2X	27
Tabela 4- Efeito do ATP extracelular em patógenos extracelulares	37
Tabela 5- Alterações morfológicas observadas através de microscopia óptica em células não infectadas e infectadas devido a ação do ATP, UTP e UDP.	61
Tabela 6- Tempo de resposta aos nucleotídeos	104
Tabela 7- Moléculas intracelulares sinalizadoras de perigo	122

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1 PARASITAS INTRACELULARES

Organismos como vírus, bactérias, protozoários e fungos, utilizavam em tempos remotos a vida livre no substrato competindo com organismos vizinhos pelo alimento. Com o advento da compartimentalização intracelular pelo sistema de membranas, alguns destes organismos aproveitaram tal advento como novo nicho a ser explorado. Desta forma, se tornaram parasitas intracelulares, apresentando estratégias muito específicas, de modo a interferir nos mecanismos de sinalização e desenvolvimento do hospedeiro (GRUENHEID E COLS, 2003). Os parasitas atuam a nível intracelular no hospedeiro ou sobrevivem nos fluidos extracelulares, podendo produzir infecções crônicas duradouras de forma a maximizar as chances de transmissão bem sucedida (SACKS E COL, 2002).

Para acessar o nicho intracelular, os parasitas atuam de formas variadas, principalmente interagindo com o sistema de citoesqueleto: bactérias gram-negativas alteram a estrutura da rede de actina submembranar através de um sistema de secreção (TTSS), que ativa GTPases do tipo Rho ou alteram fosfatidilinositóis. Esta ativação remodela a membrana plasmática, produzindo assim ondulações que facilitarão sua entrada no hospedeiro (GRUENHEID E COLS, 2003).

Já os protozoários, utilizam mecanismos muito variados de entrada no hospedeiro através de segundo mensageiros, fatores de transcrição, e interação com uma grande variedade de receptores de superfície cuja transdução de sinal induz a modulação da expressão gênica da célula hospedeira e liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  para remodelamento de membrana (BURLEIGH E COLS, 2002).

Uma vez dentro do hospedeiro, os patógenos intracelulares utilizam diversas estratégias de sobrevivência, sendo uma delas, a alteração e/ou interrupção do tráfico de vesículas intracelulares (Tabela 1). Alguns se adaptaram para resistir ao inóspito ambiente fagolisossomal, enquanto outros lisam a parede do vacúolo, escapando para o citoplasma, e/ou alterando de modo ativo as características vacuolares para que suas necessidades sejam atendidas. Este mecanismo de sobrevivência também é mediado por alteração, paralisação ou remodelamento de moléculas de citoesqueleto, já que este se encontra diretamente relacionado com o tráfego de vesículas (Tabela 1). Todavia, os parasitas que utilizam o escape citoplasmático como modo de sobrevivência também utilizam interações com o citoesqueleto do hospedeiro, mas poucos trabalhos abordam o tema (SACKS E COL, 2002).

Tabela 1- Estratégias de sobrevivência de patógenos intracelulares.

<b>Estratégia</b>	<b>Patógenos</b>	<b>Mecanismo de sobrevivência intracelular</b>
Atraso da maturação	<i>Salmonella enterica</i> sv. Typhimurium	Inibição da fusão de vesículas mediada por SPI-2 Remodelamento do vacúolo de <i>Salmonella</i> via SifA Acúmulo de colesterol no vacúolo
	<i>Mycobacteria</i>	Modulação de proteína SNARE Inibição da aquisição fagossomal de EEA1 por ManLAM
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Expressão de porina PorB permeabiliza o fagossomo e inibe maturação
	<i>Leishmania donovani</i>	Inibição da despolimerização de actina do fagossomo Alteração direta da fusão fago-endossomo por lipofosfoglicano (LPG)
Escape para o citoplasma	<i>Shigella flexneri</i>	Rompimento do vacúolo por IcsB, IpaB, IpaC.
	<i>Listeria</i>	A expressão de Listeriolisina permeabiliza o vacúolo
	<i>Monocytogenes</i>	A entrega de PI-PLC e ativação de PLC e PLD rompem o vacúolo
	<i>Rickettsia prowazekii</i>	O fagossomo é desestabilizado pela secreção de fosfolipase A2
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Direciona o recrutamento de lisossomos durante/após invasão Rápida lise do vacúolo por Tc-TOX
Formação de inclusões citoplasmáticas	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Interrupção e atraso da fusão fago-endossômica
	<i>Legionella pneumophila</i>	Associação com vesículas do retículo endoplasmático
	<i>Toxoplasma gondii</i>	Forma vacúolos não fusogênicos que se associa com mitocôndria e retículo endoplasmático

Adaptado de SCOTT, 2003.

### 1.1.1 Protozoários

As infecções por protozoários afetam meio bilhão de pessoas no mundo, suas doenças relacionadas (malária, Doença de Chagas e leishmaniose visceral) são a maior causa de mortalidade em países tropicais, representando então, um grande impacto no desenvolvimento econômico (SACKS E COLS, 2002). A inexistência de vacinas efetivas para tais doenças é atribuída à complexidade dos patógenos e suas complicadas estratégias de evasão do sistema imune (SACKS E COLS, 2002). Dentre tais estratégias estão o escape da resposta humoral e celular, regulando a resposta de células T e suprimindo a resposta efetora. Da mesma forma, diversas adaptações permitem a evasão da resposta imune inata, como transposição da barreira epitelial, cascata complemento, hidrolases lisossomais e metabólitos de oxigênio tóxicos, gerados pelos fagócitos mononucleares (SACKS E COLS, 2002).

### 1.1.2 Leishmaniose

A doença leishmaniose é causada por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. O protozoário apresenta duas formas em seu ciclo de vida: promastigota, de estrutura fina e alongada nas dimensões 10-20  $\mu\text{M}$  de comprimento por 2 $\mu\text{M}$  de largura possuindo um longo flagelo localizado na região anterior podendo estar na fase procíclica (não infectiva, replicativa) ou metacíclica (infectiva não replicativa); ou na forma amastigota, de formato oval de 2-5  $\mu\text{M}$  de comprimento, não móveis.



### 1.1.3 Ciclo de vida

A transmissão do parasita se dá através do repasto sangüíneo do inseto da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, do gênero *Phlebotomus* (África, Europa e Ásia) e do gênero *Lutzomyia* (Américas). No intestino do inseto vetor, os parasitas permanecem na forma promastigota. Os promastigotas não infectivos em replicação (procíclico) se encontram aderidos ao epitélio do intestino e se transformam na forma infectiva não replicativa (metacíclica). Os parasitas metacíclicos se soltam do epitélio e migram ao final do trato digestivo. A transmissão dos promastigotas ao hospedeiro vertebrado ocorre na inoculação dos mesmos no momento do repasto sangüíneo. Ao entrarem em contato com o sistema sangüíneo do hospedeiro, os promastigotas infectam fagócitos mononucleares, resistindo à ação lítica do sistema complemento. Uma vez internalizados, estes se transformam em amastigotas que proliferam por divisão binária (RUSSEL & TALAMAS-ROHANA, 1991). A proliferação dos parasitas pode vir a causar o rompimento das células fagocíticas mononucleares liberando-os ao ambiente do entorno onde podem infectar os macrófagos vizinhos.

Ao se alimentar em um mamífero, o vetor pode ingerir fagócitos contendo amastigotas. Na digestão do sangue, os amastigotas são liberados, se diferenciam em promastigotas que se aderem ao epitélio intestinal, para evitar ser excretado juntamente com o sangue digerido (AWASTHI E COLS, 2004).

A *Leishmania* encontra-se em constante confronto com os ambientes inóspitos de ambos hospedeiros, como enzimas digestivas do intestino do vetor e atividade lisossômica do hospedeiro. Para isto utiliza seu lipofosfoglicano (LPG) de superfície para transformar a situação a seu favor, conforme explicado mais adiante (MAIOLLI E COLS, 2004).

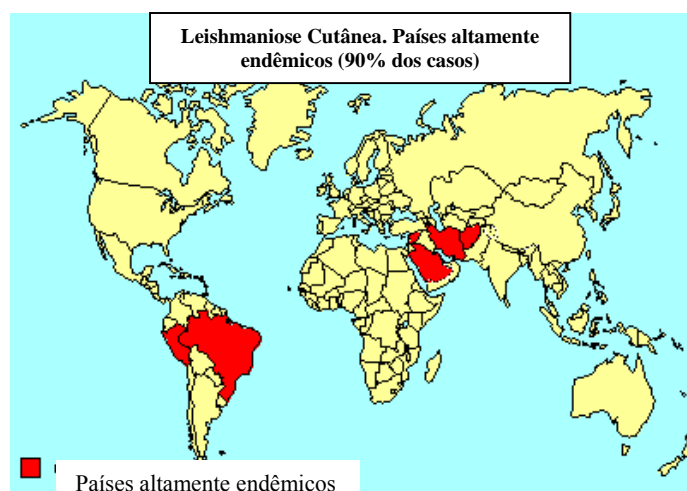
### 1.1.4 A Doença

As leishmanioses são doenças que apresentam um largo espectro de manifestações clínicas que vão desde lesões cutâneas auto-regenerativas à doença visceral severa e morte. Apesar de diferentes manifestações clínicas, todas as leishmanioses são causadas por espécies do protozoário parasita do gênero *Leishmania* (BULLEN E COLS, 2002). As espécies de leishmania são distinguidas através de sua localização geográfica, técnicas bioquímicas, biomoleculares e características clínicas. As formas clínicas mais comuns são:

- Leishmaniose visceral (calazar) - geralmente provocada pelas espécies *L. donovani*, *L. chagasi* e *L. infantum* podendo ser endêmica, epidêmica ou esporádica. Pode haver infecção do fígado, baço, e medula óssea. Os sintomas incluem febre noturna, diarreia, febre, taquicardia, esplenomegalia, hepatomegalia, caquexia e em casos mais severos, pode haver o desenvolvimento de leishmaniose dérmica, com formação de nódulos faciais.
- Leishmaniose cutânea - pode ser provocada pelas espécies *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. Caracterizada inicialmente por lesões únicas nas extremidades do corpo, que em casos mais graves se espalham em áreas expostas do corpo, geralmente chegando à ulceração. O período de incubação varia de duas a seis semanas.
- Leishmaniose mucocutânea - causada pela espécie *L. braziliensis*, provocando lesões nas extremidades corporais que após alguns meses atingem a região nasofaríngea, causando obstrução nasal e epistaxia.

A leishmaniose humana é distribuída por todo o mundo, principalmente nos trópicos e subtropicais com uma prevalência de 12 milhões de casos sendo 0,5 milhão na forma visceral e 11,5 milhão da forma cutânea (OMS, 2005). A leishmaniose é considerada endêmica em 88 países, dos quais 72 são países em desenvolvimento (Figura 1) (OMS, 2005):

- 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão;
- 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru;
- 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria.



**Figura 1-** Mapa indicando os países em que a leishmaniose cutânea é altamente endêmica. Adaptado do site da OMS, 2005.

### 1.1.5 Evasão do Sistema Imune

As espécies de *Leishmania* não apenas escapam da lise mediada por proteínas da cascata do complemento, mas as utilizam em seu favor para invadir a célula hospedeira (BAETAS-DA-CRUZ E COLS, 2004). Quando no intestino do flebotômio, o promastigota procíclico se transforma em metacíclico, sua membrana se altera, exibindo LPG, o que previne a inserção do complexo de ataque à membrana (MAC) C5b-C9 quando o protozoário entrar em contato com o hospedeiro vertebrado. Além disso, aumenta-se a expressão de gp63, que cliva o componente C3 em C3bi, evitando também a deposição do C5b-C9. Adicionalmente, C3bi opsoniza o parasita tornando-o alvo de fagócitos profissionais, o que facilitaria sua entrada na célula hospedeira (SHER E COLS, 2002). Desta forma, o *uptake* de *Leishmania* depende da espécie, presença de soro, e estágio de desenvolvimento do parasita.

Os promastigotas quando já no organismo do vertebrado, se ligam a algumas moléculas receptoras de complemento como CR1 e CR3. O receptor CR1 é o maior ligante de macrófagos para promastigotas maduros (DA SILVA E COLS, 1989). A ligação do promastigota com os receptores do complemento (CR) pode ocorrer de três formas: soro-dependente ativando o componente C3 através do fragmento C3bi; através de ligação soro-independente se ligando a protease de superfície gp63 ao CR3; através da ligação do lipofosfoglicano do parasita ao epítipo lectina-like do CR3 e CR1 (BULLEN E HANDMAN, 2002).

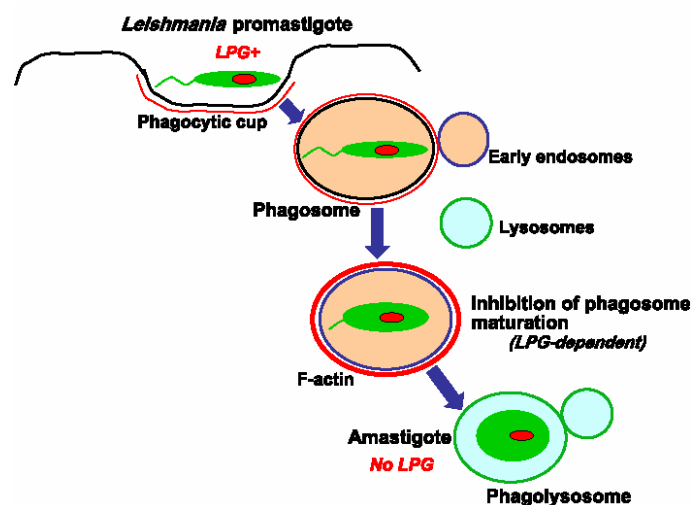
A *Leishmania* possui um denso glicocálice que recobre toda sua superfície de membrana, formado por uma família de fosfoglicanos denominada LPG. Sabe-se que este LPG se encontra envolvido em diversas atividades dos promastigotas e amastigotas de *Leishmania*. (DERMINE E COLS, 2005).

A invasão por amastigotas ocorre independente de LPG, exceto em *L.major*. Em *L.amazonensis*, a invasão se dá através do ligante de heparina, receptor Fc para imunoglobulina G, além de ligação a glicosfingolipídios (DESCOTEAUX E COLS, 2005).

Sabe-se que espécies de *Leishmania* possuem receptores de superfície ancorados a GPI com duas porções sinalizadoras responsáveis pela produção de citocinas em células de mamíferos como interleucina 12 (IL-12) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) além de síntese de óxido nítrico (NO). Além disso, a ativação de receptores do tipo Toll induzem a morte da *Leishmania* (AKIRA, 2003). A eliminação bem-sucedida da *Leishmania* requer a participação de células imunes e citocinas envolvidas em resposta do tipo Th1. Tal resposta envolveria a secreção de IL-12 em macrófagos e células dendríticas nos estágios iniciais de infecção. A IL-12 induz secreção de IFN- $\gamma$  em linfócitos T e *natural killers*, além de induzir secreção autócrina de TNF- $\alpha$ , o que ativaria sinergisticamente a transcrição de fatores microbicidas. Os mecanismos de evasão do protozoário incluem inibição da secreção de IFN- $\gamma$  e IL-12, supressão da produção de NOS (Óxido Nítrico Sintase), e expressão de iNOS (Indutor de Óxido Nítrico) impedindo a via oxidativa, supressão da expressão de complexo de histocompatibilidade principal classe II (MHC classe II), dentre outros (STAFFORD E COLS, 2002). A indução de apoptose em células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> também é um mecanismo de escape utilizado por *L. braziliensis* o que inibiria a imunidade eficiente anti-leishmania (LUNDER E COLS, 2001). Soares em 2003 sugeriu a participação de fosfolipase C como um importante mediador do reconhecimento e sobrevivência no hospedeiro de *L. amazonensis*. A fosfolipase C encontra-se presente em interações parasito-hospedeiro e na sobrevivência na maioria dos tripanossomatídeos, demonstrando a relevância da ativação das fosfolipases nas infecções por protozoários (SOARES E COLS, 2003).

### 1.1.6 Ciclo de Vida Intracelular

Assim que o parasita se liga ao macrófago, a membrana do primeiro apresenta marcação de proteínas (por microscopia de fluorescência) constituintes de vesículas da via endocítica da célula hospedeira (HENRIQUES E COLS, 2000). Tal fato indica a existência de um processo dinâmico de trânsito de lipídios e glicoproteínas associadas à membrana entre o parasita e a célula hospedeira. Após a internalização em fagossomos, os vacúolos contendo parasitas se fundem a lisossomos secundários para completar o vacúolo parasitóforo (VP) (em até 30 minutos) e os parasitas promastigotas na forma metacíclica se transformam em amastigotas (Figura 2) (DESCOTEAUX, 2005; DE SOUZA, 2005).



**Figura 2-** Esquema ilustrando a inibição da maturação do fagossomo em um macrófago que internalizou um promastigota de *L. donovani*. Tais fagossomos não interagem com endossomos tardios ou lisossomos até que os promastigotas se diferenciem totalmente em amastigotas (DESCOTEAUX E COLS, 2005).

O vacúolo parasitóforo mantém o pH ácido e atividade hidrolítica através de constante fusão com organelas da via endocítica (DE SOUZA, 2005), fato confirmado através da utilização de marcadores como LAMP-1 e 2, rab7, moléculas envolvidas na apresentação de antígenos via MHC II e próton ATPases.

A morfologia do vacúolo parasitóforo (VP) é muito variada dependendo da espécie de *Leishmania* e do estágio de desenvolvimento. Em *L. amazonensis* e *L. mexicana* os vacúolos são largos, com o parasita aderido parcialmente à membrana enquanto *L. major* e *L. donovani* produzem pequenos VPs com justaposição quase total de membranas (BULLEN E COLS, 2002). A diferença entre os VPs pode ser também atribuída à presença de LPG em sua superfície. O LPG do parasita migra para a superfície do macrófago através do sistema de fusão de vesículas (AWASTHI E COLS, 2004). Tal molécula interferiria nas propriedades fusogênicas do VP e a transformação de promastigotas em amastigotas (RASMUSSEN E COLS, 2004). A transformação de promastigotas em amastigotas ainda é assunto obscuro, mas diversos autores correlacionaram a atividade de serino-, aspártico-, e metaloproteinases nesta transformação (ALVES E COLS, 2005).

Resultados sugerem que para a saída da célula, os vacúolos parasitóforos se acumulam na periferia da célula, saindo horas depois por via exocítica (BULLEN E COLS, 2002).

As células hospedeiras transportam os parasitas dos sítios de infecção para os linfonodos drenantes, onde apresentam os antígenos destes parasitas às células T imaturas e onde os parasitas persistem indefinidamente (AWASTHI E COLS, 2004).

As diferentes espécies de *Leishmania* utilizam como alvo principal os macrófagos, mas já foram relatados outros alvos de infecção como células da glia, neutrófilos, monócitos e células dendríticas (BAETAS-DA-CRUZ E COLS, 2004).

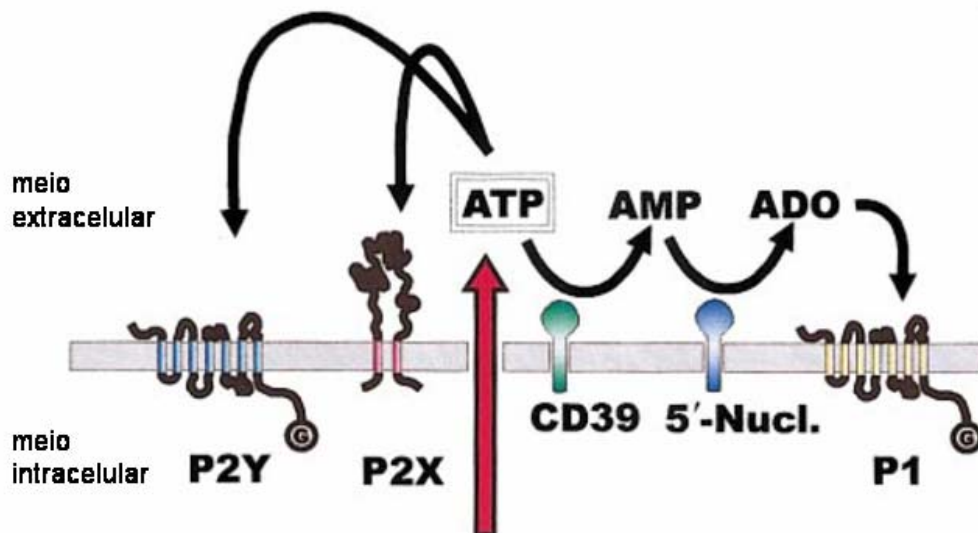
Por utilizar o macrófago como hospedeiro preferencial, a *Leishmania* promove alterações no hospedeiro para evadir de seus efeitos microbicidas. Macrófagos ativados utilizam como sistema microbicida peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. Macrófagos secretam citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-18, IL-12 e IFN- $\gamma$  quando em infecções parasitárias. Sabe-se que leishmania inibe a produção de IL-12, conseqüentemente IFN- $\gamma$ , que ativaria resposta do tipo Th1 (AWASTHI E COLS, 2004).



## 1.2 RECEPTORES P2

Nucleotídeos e nucleosídeos são parte de uma família bem estabelecida de mensageiros extracelulares. Em 1929 Drury e Szent-Gyorgyi evidenciaram pela primeira vez o papel fisiológico dos nucleotídeos extracelulares ao perfundir ATP no sistema cardiovascular de cobaia (DRURY & SZENT-GYORGYI, 1929) gerando bradicardia e hipotensão. Os nucleotídeos encontram-se presentes em altas concentrações no citoplasma (ATP 5-10mM e UTP 0,5-1mM) enquanto no compartimento extracelular sua concentração é mantida na ordem de nanomolar (ATP 1-10 nM) (DI VIRGILIO, 2005). Uma vez no meio extracelular, o ATP pode atuar sobre receptores para nucleotídeos ou ser metabolizado para suas formas di- ou monofosfato, ativando diferentes receptores (Figura 3).

O principal mecanismo responsável por controlar a concentração do ATP extracelular é a ação de um grupo de enzimas denominadas ecto-nucleotidases. Estas enzimas podem ser encontradas associadas ao lado extracelular da membrana plasmática, podendo também estar presentes no meio intersticial ou nos fluidos corporais (ZIMMERMANN, 2001). Estas enzimas são responsáveis pela clivagem do ATP em suas moléculas relacionadas, pela retirada do fosfato inorgânico até a molécula de adenosina (ZIMMERMANN, 2000; ZIMMERMANN, 2001). Além das ecto-nucleotidases, existem também outras enzimas que são capazes de promover a troca do fosfato inorgânico entre os nucleotídeos, como é o caso do nucleosídeo difosfocinase que pode fazer a fosforilação reversa entre UDP (difosfato de uracila) ou GDP (difosfato de guanina) com ATP ( $ATP + UDP \leftrightarrow ADP + UTP$  [trifosfato de uracila]) e da adenilil ciclase que a partir de duas moléculas de ADP é capaz de gerar uma de ATP e uma de AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) (NOVAK, 2003).



**Figura 3-** Ação das ecto-nucleotidasas sobre o ATP extracelular. O esquema ilustra uma situação hipotética de liberação de ATP, onde uma vez no meio extracelular este pode atuar em receptores próprios, ou ainda ser metabolizado pela ecto-nucleotidase fosfato difosfatase 1 (CD39) e pela 5'-nucleotidase, gerando AMP e adenosina respectivamente. A adenosina por sua vez é capaz de ativar os receptores próprios. (DI VIRGILIO E COLS, 2001)

A identificação de receptores para ATP e AMP em organismos unicelulares e invertebrados permitiu notar a importância destas moléculas como sinalizadoras (GERISH E COLS, 1975; SMALL E COLS, 1987). Neste contexto, no curso da evolução celular, o ATP e outros nucleotídeos podem ter sido moléculas quimiotáticas indicando a posição de células danificadas ou mortas. Então, as células que tinham receptores para tais moléculas devem ter sido positivamente selecionadas, determinando sobrevivência e sucesso reprodutivo.

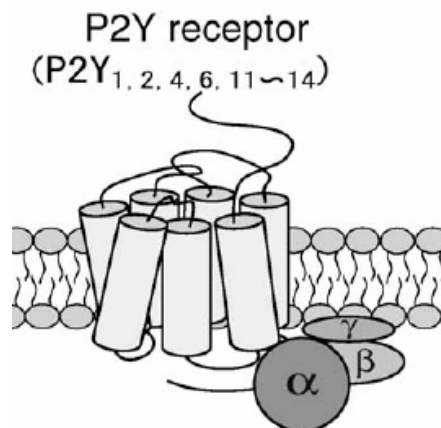
O ATP é um pequeno soluto (650 Da) podendo apresentar de 2 a 4 cargas negativas que dependem do pH e da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , sendo um importante mediador nos sistemas nervoso (HOLTON E COLS, 1953) e cardiovascular (BANGA E COLS, 1951). Células como neurônios, plaquetas, macrófagos, linfócitos T, endoteliais e epiteliais liberam ATP através de vias não-líticas tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (SABIROV E COLS, 2005), em casos de estimulação por endotoxina, agregação de plaquetas, etc. Sua liberação pode se dar através de via exocítica e de grânulos de células secretórias. O ATP também modula respostas imunes em linfócitos T e B, em mastócitos e em macrófagos, nestes últimos induzindo liberação de  $\text{IL1-}\beta$  (FERRARI E COLS, 2006).

Sabe-se atualmente que os nucleotídeos também podem atuar como moléculas mensageiras de perigo, induzindo células apresentadoras de antígenos (APCs) a iniciar a resposta imune com a liberação de citocinas pró-inflamatórias como  $\text{IL1-}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{cyclooxygenase-2}$  e produção de superóxidos, o que promoveria a morte de patógenos. Em eosinófilos, o ATP induz a produção de metabólitos de oxigênio, ativa  $\text{Ca}^{2+}$  transiente e regula positivamente a integrina  $\text{CD11b}$  (DICHMANN E COLS, 2000).

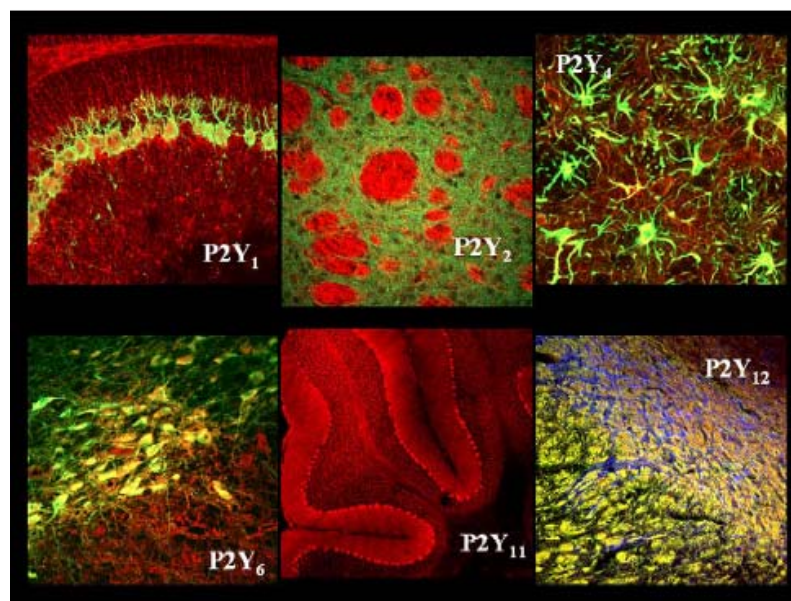
Os receptores para nucleotídeos podem ser divididos em P1 e P2 de acordo com diversos critérios, tais como seqüência protéica, vias de transdução de sinal, farmacologia e etc

(DI VIRGILIO, 2005). Os P1 são receptores associados a alguns tipos de proteína G, ativados por adenosina sendo subclassificados através de diferenças estruturais e farmacológicas em A1, A2a, A2b, e A3. O receptor A1 transduz sinal através da proteína  $G_i$ , sua ativação inibe a adenilato ciclase e diminui os níveis de AMPc. O receptor A2a está associado à proteína  $G_e$  e a união com o ligante estimula a adenilato ciclase, aumentando os níveis de AMPc. A ativação do receptor A2b, associado às proteínas  $G_e$  e  $G_q$ , aumenta os níveis de AMPc e de  $IP_3$  através da ativação da fosfolipase C. Finalmente, o receptor A3 está associado às proteínas  $G_i$  e  $G_q$  e através delas a sua ativação inibe a adenilato ciclase e ativa a fosfolipase C (KLOTZ E COLS, 2000).

Os receptores P2 participam de vários processos de indução de vias de sinalização principalmente através da ativação de MAPKs (DA CRUZ E COLS, 2005). Estão divididos em duas famílias P2X e P2Y. Os receptores P2Y são metabotrópicos, possuem N-terminal extracelular e C-terminal intracelular que apresenta região de ligação a proteínas kinases. Possuem de 328 a 379 aminoácidos (41 a 53 Kd), sete domínios transmembrana, sendo as alças extracelulares ligadas por pontes bissulfeto (Figura 4) (DI VIRGILIO E COLS, 2001). Esta família de subtipo de P2 possui oito membros (P2Y<sub>1</sub>, 2, 4, 6, 11, 12, 13 e 14) os quais encontram-se distribuídos em uma grande variedade de tecidos, sendo riquíssimo no sistema nervoso (Figura 5) (BURNSTOCK, 2006).



**Figura 4-** Esquema da estrutura dos receptores P2Y e sua inserção na membrana plasmática (KUGELGEM & WETTER, 2000)



**Figura 5-** Distribuição de receptores P2Y em sistema nervoso central de ratos adultos. O receptor P2Y<sub>1</sub> é mostrado em células de Purkinje no cerebelo (amarelo); O receptor P2Y<sub>2</sub> é observado em substância branca (vermelho); O receptor P2Y<sub>4</sub> é expresso em astrócitos (amarelo); O receptor P2Y<sub>6</sub> está presente na substância negra compacta (amarelo); O receptor P2Y<sub>11</sub> é encontrado nas células de Purkinje no cerebelo (vermelho); O receptor P2Y<sub>12</sub> é localizado em oligodendrócitos (amarelo) (VOLONTÉ E COLS, 2006).

Os nucleotídeos UTP e UDP são conhecidos por serem as principais moléculas sinalizadoras ativadoras de receptor P2Y, mas a baixa homologia geral entre os membros da família P2Y proporciona farmacologia variada (Tabela 2). Os receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>12</sub> são ativados por nucleosídeos difosfatados, enquanto os receptores P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>4</sub> por nucleosídeos trifosfatados (ABBRACCHIO E COLS, 2006).

Os receptores P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> e P2Y<sub>6</sub> são ativados por purinas e pirimidinas enquanto P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub> são ativados apenas por purinas (BURNSTOCK, 2004). Cada receptor P2Y faz ligações com uma proteína G heterotrimérica, sendo que cada subtipo pode formar associações homo- e heteromultiméricas, o que promoveria de maneira geral a geração de 1,4,5 inositol e liberação dos estoques de cálcio intracelular (LA SALA E COLS, 2006). Estes podem ser agrupados em: receptores ligados a proteína G<sub>q</sub> (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> e P2Y<sub>11</sub>) que ativam fosfolipase C β; e ligados a proteína G<sub>i</sub> (P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub>) que inibem adenilato ciclase (INOUE, 2005; DI VIRGILIO, E COLS, 1996; ABBRACCHIO E COLS, 2006). O principal agonista para os receptores P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>12</sub> e P2Y<sub>13</sub> é o 2-MeSADP, sendo seus antagonistas o PPADS (P2Y<sub>1</sub>) e o Clopidogrel (P2Y<sub>12</sub>) respectivamente, não tendo sido identificados ainda antagonistas para o receptor P2Y<sub>13</sub>. Os receptores P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>4</sub> possuem o UTP como principal agonista e como antagonistas a suramina e o PPADS respectivamente. Já o UDP é o agonista principal do receptor P2Y<sub>6</sub> que é antagonizado por PPADS e suramina. O receptor P2Y<sub>11</sub> possui como agonista principal o ARC67085 e como antagonista a suramina, enquanto o receptor P2Y<sub>14</sub> é ativado por UDP- glucose e não possui antagonistas conhecidos (Tabela 2) (KÜGELGEN, 2005).

Os receptores P2Y acoplados a proteína de tipo Gq são ligados a sinalização via fosfolipase C, aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular e ativação de proteínas kinase C. Já os receptores acoplados a proteína Gi, promovem acúmulo de AMPc.

Os receptores P2Y encontram-se expressos em macrófagos humanos participando da sinalização de morte celular (OSHIMI E COLS, 1999), em membrana basolateral de túbulos proximais de rato (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>4</sub>) onde o receptor P2Y<sub>2</sub> quando inativado pode ser substituído pelo receptor P2Y<sub>6</sub> (BAILEY E COLS, 2001). Em adição, foi demonstrado que a expressão dos receptores P2Y<sub>4</sub> e P2Y<sub>6</sub> oscila de acordo com o tempo de cultura em células epiteliais (OKUDA E COLS, 2003). Além disso, o receptor P2Y<sub>2</sub> participa ativamente da ativação e diferenciação de células promonocíticas humanas (SANTIAGO-PEREZ E COLS, 2001), sendo seu mRNA detectado em rins, baço, pulmão, fígado e coração. Este receptor exibe 89% de homologia na seqüência de aminoácidos entre camundongos e humanos. A dessensibilização do receptor P2Y<sub>2</sub> ocorre 5 minutos após a exposição ao UTP pela fosforilação do seu C-terminal por proteínas kinases, e sua recuperação é observada 5-10 minutos após a remoção do agonista (BRUNSCHWEIGER & MÜLLER, 2006).

O receptor P2Y<sub>4</sub> foi originalmente clonado de placenta humana e cérebro de rato. Este receptor é mais relacionado ao subtipo P2Y<sub>2</sub> que ao P2Y<sub>6</sub>, apresentando 83% de homologia na seqüência de aminoácidos entre rato e humano (KÜGELGEN, 2006). Não apresentam antagonistas específicos, sendo fracamente responsivos a suramina e sensíveis a PPADS em células murinas.

O receptor P2Y<sub>6</sub> foi clonado em ratos, camundongos e humanos. Este receptor em humanos apresenta homologia de 37% na seqüência de aminoácidos com o receptor humano P2Y<sub>2</sub> e 40 % com o receptor P2Y<sub>4</sub> humano. Foi demonstrado que o receptor P2Y<sub>6</sub> se encontra

expresso em doenças intestinais inflamatórias, sua ativação em monócitos medeia a produção de IL-8 e, é alvo na terapêutica de fibrose cística (BRUNSCHWEIGER & MÜLLER, 2006). O receptor P2Y<sub>6</sub> exibe dessensibilização lenta após 30 minutos de exposição ao seu agonista.

O receptor P2Y<sub>11</sub> encontra-se envolvido na maturação induzida por ATP em células dendríticas (TANG E COLS, 1999).

O receptor P2Y<sub>14</sub> apresenta como seu principal agonista o UDP-glucose, sendo clonado de tecidos de humano, camundongo e rato. Ainda não foram descritos antagonistas a este receptor (ABBRACHIO E COLS, 2003).

Os receptores P2Y podem ser estudados em contextos fisiológicos através de análises do acúmulo de fosfolipase C, diacilglicerol (DAG), inositol trifosfato (IP3) e cálcio intracelular utilizando agonistas e antagonistas (P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> e P2Y<sub>6</sub>). Já o receptor P2Y<sub>14</sub> pode ser estudado através do acúmulo ou inibição de AMP cíclico (BRUNSCHWEIGER & MÜLLER, 2006).



Tabela 2- Distribuição e principais agonistas/antagonistas de receptores P2Y

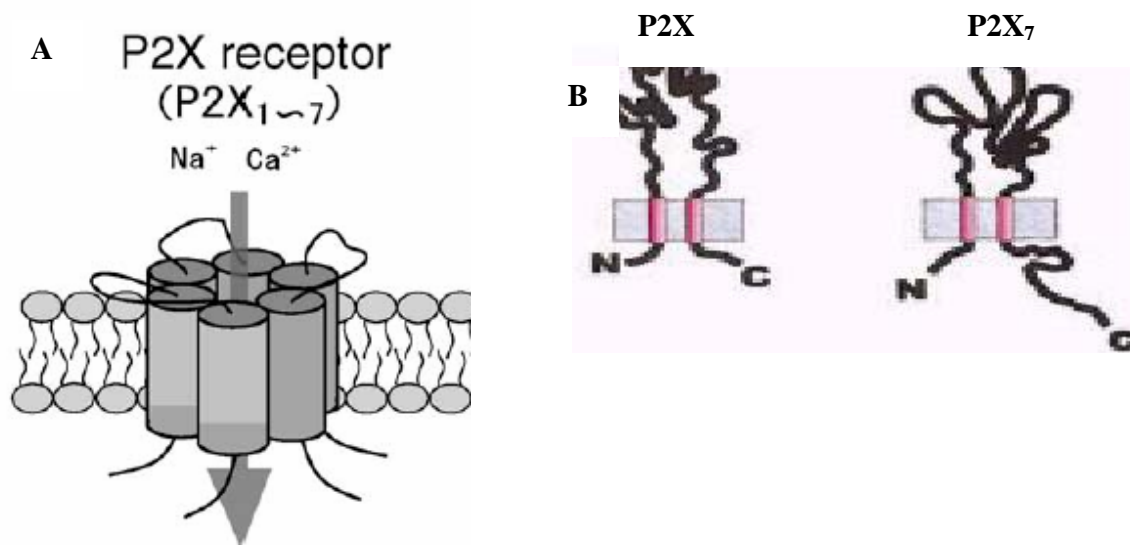
<i>Tipo</i>	<i>Espécie</i>	<i>Tecido</i>	<i>Agonista principal</i>	<i>Antagonistas</i>
P2Y <sub>1</sub>	Humano	Amplo: plaquetas, coração, músculo esquelético, tecidos neuronais, trato digestivo	(N)-me-2-MeSADP>ADP=ADPβS>ATP	MRS 2179 PPADS
	Rato Camundongo		2-MeSADP=2-MeSATP>ADP 2-MeSATP>2Cl-ATP>ATP	
P2Y <sub>2</sub>	Humano	Amplo: pulmões, coração, músculo esquelético, baço, rim	UTP=ATP>INS37217>Ap4A>ATPγS	Suramina
	Rato Camundongo		UTP=ATP>CTP>GTP UTP=ATP>Ap4A	
P2Y <sub>4</sub>	Humano	Placenta, pulmões, músculo liso vascular, cérebro e fígado	UTP> UTPγS	PPADS
	Rato Camundongo		UTP=ATP=Ap4A UTP=ATP	
P2Y <sub>6</sub>	Humano	Pulmão, coração, aorta, baço, placenta timo, intestino e cérebro	UDP=5Br-UDP>>UTP>2-MeSADP	PPADS Suramina
	Rato Camundongo		UDP>UTP>ADP>2-MeSADP UDP>UTP>ADP>2-MeSADP	
P2Y <sub>11</sub>	Humano	Baço, intestino	ARC67085≥ ATPγS=BzATP>ATP	Suramina RB-2
P2Y <sub>12</sub>	Humano	Plaquetas, tecidos neurais	2-MeSADP>ADP>>(N)-me-2-MeSADP	Clopidogrel
	Rato Camundongo		2-MeSADP>ADP,ATP 2-MeSADP>ADP>ADPβS	
P2Y <sub>13</sub>	Humano	Baço, leucócitos, medula óssea, fígado e cérebro	2-MeSADP>ADP>ADPβS	-
	Rato Camundongo		ADP> 2-MeSADP >>ATP ADP= 2-MeSADP = ADPβS	
P2Y <sub>14</sub>	Humano	Placenta, tecido adiposo, intestino, cérebro e baço	UDP-glucose>UDP-galactose	-
	Rato Camundongo		UDP-glucose UDP-glucose	

Adaptado de KÜGELGEN, 2005.

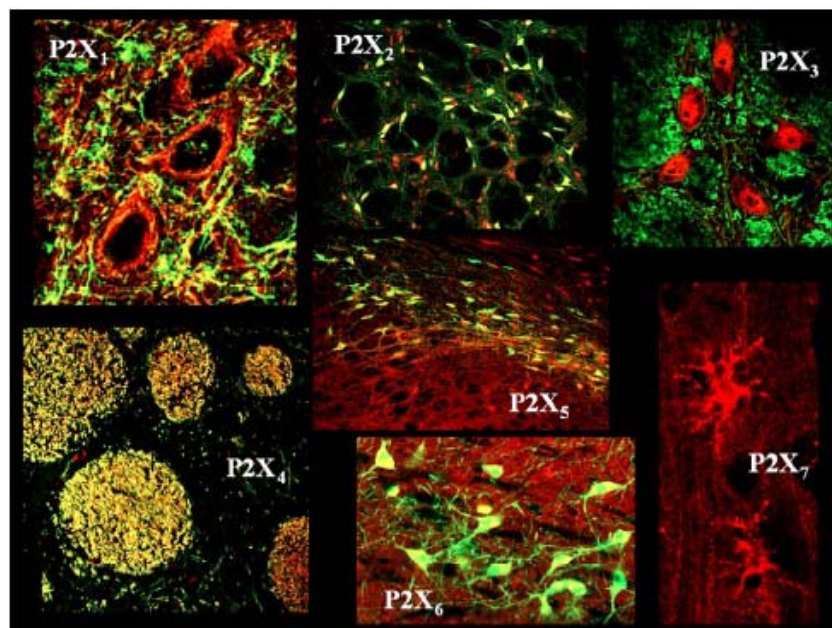
Os receptores P2X são ionotrópicos formadores de canais iônicos, sendo seus terminais amino- e carboxi- localizados do lado citoplasmático, apresentando regiões de ligação a proteínas kinases. Possuem de 379 a 595 aminoácidos, apresentando dois domínios transmembrana hidrofóbicos, sendo que o primeiro (TM1) está envolvido na ligação com o canal e o segundo (TM2) ao poro iônico (RALEVIC, 1998).

O domínio extracelular apresenta-se em alça constituída de 10 resíduos de cisteína conservados formando uma série de ligações do tipo pontes bissulfeto (Figura 6). Através da ativação de receptores P2X, o gradiente de concentração de ATP extracelular promove atração de células dendríticas imaturas, bloqueia a síntese de citocinas pró-inflamatórias e a capacidade de promover resposta Th1, favorecendo a resposta Th2 nestas células (LA SALA E COLS, 2003).

Até o momento foram clonados sete subtipos de receptores P2X (P2X<sub>1-7</sub>) em mamíferos que apresentam ampla distribuição em diferentes tecidos (Figura 7). Os receptores P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>3</sub> formam heteromultímeros em gânglios, P2X<sub>4/6</sub> em neurônios do sistema nervoso central, P2X<sub>1/5</sub> em células sanguíneas e P2X<sub>2/6</sub> em células do cérebro (NORTH, 2002). O receptor P2X<sub>7</sub> apresenta o terminal carboxi 100-200 aminoácidos mais longo, o que lhe confere sítios de ligação para sinalizações diferentes das outras 6 subunidades de receptores P2X.



**Figura 6-** (A)Esquema da organização dos receptores P2X. (B)Note na figura da direita o C-terminal alongado característico do receptor P2X<sub>7</sub> se comparado com outros P2X a esquerda (DI VIRGILIO E COLS, 2001).



**Figura 7-**Distribuição dos receptores P2X em tecidos de sistema nervoso central de ratos adultos. O receptor P2X<sub>1</sub> é mostrado em neurônios corticais (vermelho); O receptor P2X<sub>2</sub> presente no striatum (vermelho e amarelo); P2X<sub>3</sub> em neurônios (vermelho); O receptor P2X<sub>4</sub> é observado na substância branca (amarelo); Os receptores P2X<sub>5</sub> e P2X<sub>6</sub> em neurônios(amarelo); O receptor P2X<sub>7</sub> se localiza em microglia de córtex (vermelho)(VOLONTÉ E COLS, 2006)

O receptor P2X<sub>1</sub> foi inicialmente clonado a partir de preparações de vasos deferentes de ratos, de humanos e da bexiga urinária de camundongos. A dessensibilização do receptor P2X<sub>1</sub> ocorre quando a aplicação do agonista é superior a 100 milisegundos (NORTH E COLS, 2002).

O receptor P2X<sub>2</sub> foi clonado a partir de células PC12 de ratos (BRAKE E COLS, 1994; RALEVIC & BURNSTOCK, 1998) e possui 41% de homologia com o receptor P2X<sub>1</sub>, entretanto não há antagonistas seletivos para os receptores P2X<sub>2</sub>. Estes receptores apresentam dessensibilização baixa ou nula (NORTH, 2002).

O receptor P2X<sub>3</sub> foi clonado a partir do gânglio dorsal de ratos por CHEN E COLS em 1995 (Apud (RALEVIC E BURNSTOCK, 1998)) e possui 43% de homologia com o receptor P2X<sub>1</sub> e 47% com o receptor P2X<sub>2</sub>. Os antagonistas para este receptor são a suramina e o trinitrofenil- ATP (TNP-ATP), entretanto tais antagonistas não são capazes de distinguir entre os receptores P2X<sub>1</sub> e P2X<sub>3</sub>. Sob concentrações de ATP (30µM), a dessensibilização do receptor ocorre em um tempo menor que 100ms (NORTH E COLS, 2002).

O receptor P2X<sub>4</sub> foi o primeiro da família de receptores P2X a ser identificado no cérebro (SOTO E COLS, 1996; RUBIO & SOTO, 2001); contudo, foi mostrado recentemente que ele é largamente expresso em tecidos periféricos incluindo pâncreas, ductos biliares, órgãos reprodutivos femininos, trato gastrintestinal, árvore pulmonar, em macrófagos e em células dendríticas (COUTINHO-SILVA E COLS, 1999; BO E COLS, 2003; COUTINHO-SILVA E COLS, 2005).

O receptor P2X<sub>5</sub> é largamente expresso em tecidos periféricos incluindo pâncreas, ductos biliares, órgãos reprodutivos femininos, trato gastrintestinal e árvore pulmonar (BO E COLS, 2003). O receptor P2X<sub>5</sub> foi clonado a partir de gânglio celíaco de ratos, sendo seus

antagonistas a suramina e o PPADS (COLLO E COLS, 1996). Este receptor, contudo, não se dessensibiliza (NORTH E COLS, 2002).

O receptor P2X<sub>6</sub> foi isolado do gânglio cervical superior de ratos, sendo parcialmente inibido pelo PPADS ou suramina (COLLO E COLS, 1996; RALEVIC & BURNSTOCK, 1998; NORTH E COLS, 2002).

O receptor P2X<sub>7</sub> quando ativado por ATP ou 2',3'-(4-benzoil)-benzoil ATP (Bz-ATP) (seu agonista mais potente), em células HEK 293 transfectadas, induz perturbações de membrana plasmática denominadas *blebs*, com protusões semiesféricas de 1 a 10 µM de diâmetro, sendo geralmente precedida do aparecimento de pequenas vesículas (MACKENZIE E COLS, 1999). Adicionalmente, quando ativado por períodos maiores que 20 minutos causa apoptose (MACKENZIE E COLS, 2005).

Os receptores P2 são ativados por uma ampla variedade de nucleotídeos extracelulares em diferentes tecidos (Tabela 3).

Tabela 3- Distribuição e principais agonistas/antagonistas de receptores P2X

<i>Tipo</i>	<i>Espécie</i>	<i>Tecido</i>	<i>Agonista principal</i>	<i>Antagonistas</i>
P2X <sub>1</sub>	Humano	Plaquetas, bexiga, músculo liso, tecidos neuronais, intestino.	-2-MeSADP> $\alpha,\beta$ -meATP>ATP $\gamma$ S=ATP Dessensibilização rápida	Suramina PPADS
	Rato		-2-MeSADP> $\alpha,\beta$ -meATP>ATP $\gamma$ S=ATP	
	Camundongo		-2-MeSADP= $\alpha,\beta$ -meATP>ATP $\gamma$ S=ATP	
P2X <sub>2</sub>	Rato	Sistema nervoso central, periférico, medula, epitélio, esqueleto e músculo cardíaco	-2-MeSADP= $\alpha,\beta$ -meATP>ATP $\gamma$ S=ATP	Suramina PPADS
P2X <sub>4</sub>	Rato	Gânglio de raiz dorsal e nodosa, pele, juntas, pulmões, ureteres e trato gastrointestinal	ATP>-2-MeSATP>>>> $\alpha,\beta$ -meATP	TNP-ATP
P2X <sub>5</sub>	Rato	Pulmão, coração, aorta, baço, placenta, timo, intestino e cérebro	ATP>-2-MeSATP> ADP	PPADS Suramina
P2X <sub>6</sub>	Rato	Baço, intestino	ATP>-2-MeSATP> ADP	PPADS
P2X <sub>7</sub>	Humano	Plaquetas, tecidos neurais, células apoptóticas no sistema imune, pele e pâncreas	Bz-ATP>ATP>2-MeSATP	
	Rato		2-MeSADP>ADP,ATP	KN-62 BBG, ATP <sub>o</sub>

Subtipos de receptores P2X expressos em tecidos de mamíferos. Adaptado de BURNSTOCK, 2006

O receptor P2X<sub>7</sub>, em especial, possui papel importantíssimo no sistema imune inato mediando inflamação e eliminação de patógenos intracelulares (DI VIRGILIO, 2001; COUTINHO-SILVA E COLS, NO PRELO; WATTERS E COLS, 2001). Este receptor, quando estimulado com baixas doses de ATP ou Bz-ATP, abre um canal reversível na membrana permeável a pequenos cátions (Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>) (COUTINHO-SILVA E COLS, 1996). O receptor P2X<sub>7</sub> se distingue dos demais receptores P2X devido à sua habilidade de aumento progressivo de resposta se mantido sob constante estímulo, gerando um poro de membrana reversível, não seletivo e permeável a solutos hidrofílicos de baixo peso molecular. Tal fato é confirmado pela permeabilidade à corantes fluorescentes como YO-PRO e Brometo de Etídio, o que facilita o fluxo bidirecional de cátions, gerando despolarização e massivo influxo de Ca<sup>2+</sup> (DI VIRGILIO E COLS, 2001). O domínio carboxi-terminal mais longo do receptor P2X<sub>7</sub> confere controle sobre a formação do poro e transdução de sinal (SUPRENANT E COLS, 1996; WORTHINGTON E COLS, 1998). Este receptor apresenta diversos sítios que são homólogos à sítios de outros receptores envolvidos em interações proteína-proteína e ligação a LPS (DELINGER E COLS, 2001).

O receptor P2X<sub>7</sub> pode ser encontrado em diferentes tipos celulares como neurônios, macrófagos, células dendríticas e da microglia, fibroblastos, linfócitos e células endoteliais (SUPRENANT E COLS, 1996; DI VIRGILIO E COLS, 2001; KNIGHT & BURNSTOCK, 2004).

O receptor P2X<sub>7</sub> quando ativado, promove a produção e liberação de IL1-β em microglia, monócitos e macrófagos via fusão de vesículas (FERRARI E COLS, 1997; MACKENZIE E COLS, 2001) e, em macrófagos ativados por LPS, o processamento e liberação de tal citocina pró-inflamatória ocorre com a formação de *blebbing* de membrana via P2X<sub>7</sub>, fato confirmado com a utilização de célula HEK transfectada (MORELLI E COLS, 2003). Adicionalmente, este receptor medeia a apoptose em diversos tipos celulares (COUTINHO-SILVA E COLS, 1999; GRÖSCHEL E COLS, 1999; COUTINHO-SILVA E COLS, 2001; MORELLI E COLS, 2001).

O receptor P2X<sub>7</sub> encontra-se associado à vias clássicas de ativação de kinases/JNK, caspase 3, ativação de fosfolipase D e A<sub>2</sub> (PFEIFFER E COLS, 2004). O receptor P2X<sub>7</sub> promove apoptose induzida por ATP em células dendríticas (COUTINHO-SILVA E COLS, 1999) e em células epiteliais cervicais humanas, onde envolve a ativação de caspase 9 (WANG E COLS, 2004). Estudos utilizando camundongos deficientes em receptores P2X<sub>7</sub> comprovaram seu envolvimento na inflamação. O silenciamento do gene do receptor P2X<sub>7</sub> promove inflamação crônica e dor neuropática atenuados (LABASI E COLS, 2002; CHESSELL E COLS, 2005). Adicionalmente, este receptor também está envolvido em processos de fusão celular, proliferação, formação óssea, reorganização dos filamentos de actina de forma direta, comprovado pela utilização de citocalasina D (LEONG E COLS, 1994; CHIOZZI E COLS, 1997; LASALA E COLS, 2003; PFEIFFER E COLS, 2004), choque séptico, *binding* de LPS (HU E COLS, 1998; WATTERS E COLS, 2001), além do envolvimento no fenômeno de pseudoapoptose em células HEK quando ativado brevemente (MACKENZIE E COLS, 2005). Em 1995, Falzoni sugeriu o possível envolvimento do receptor P2X<sub>7</sub> em formação de células multinucleadas em situações de infecção (FALZONI E



COLS, 1995). O receptor P2X<sub>7</sub> como descrito acima, desempenha papéis importantíssimos na imunidade inata mediando principalmente mecanismos de inflamação. Apesar do destaque dado ao receptor P2X<sub>7</sub>, o ATP extracelular no sistema imune, também é capaz de ativar outros receptores P2, que podem atuar em conjunto, apesar do mecanismo ainda não estar muito claro (LA SALA E COLS, 2003).

### **1.3. Papel de Receptores P2 na Morte Celular**

Apoptose é um processo homeostático regulado, orquestrado pelo genoma do hospedeiro, de deleção específica de células sem indução de resposta inflamatória (WANG E COLS, 2004). Diversos trabalhos documentam que as vias intrínseca e extrínseca da apoptose resultam em alterações celulares tanto morfológicas quanto bioquímicas. (SAUNDERS, 1966; TWOMEY & MACCARTHY, 2005). A apoptose inicia-se com vias de sinalização que incluem de modo geral estresse oxidativo, injúria, e níveis altos de fatores tróficos extracelulares (TWOMEY & MACCARTHY, 2005).

Em 1987 Steinberg e Silverstein demonstraram que a exposição prolongada de macrófagos de linhagem de camundongo J774, a altas concentrações de ATP acarretava na morte da maioria das células; enquanto as células restantes se apresentavam insensíveis aos efeitos permeabilizantes do ATP (STEINBERG, E COLS 1987). Di Virgilio nos anos 90 demonstrou que células *natural killers* de linhagem (P-815 e YAC) apresentavam morte induzida por ATP com características como fragmentação de DNA e externalização de fosfatidilserina (PS). Desde então diversos autores reportaram os efeitos citotóxicos do ATP

via ativação de receptores purinérgicos utilizando agonistas e antagonistas específicos (FERRARI E COLS, 2005).

A citotoxicidade do ATP em macrófagos se encontra diretamente relacionada a presença do receptor P2X<sub>7</sub>, confirmado com o uso de seus antagonistas específicos como oxATP (MELO E COLS, 2001) e brilliant blue G (BBG), além da utilização de macrófagos provenientes de animais P2X<sub>7</sub><sup>-/-</sup>, os quais não entram em morte celular quando na presença de ATP (COUTINHO-SILVA E COLS, 2003). De modo geral, o receptor P2X<sub>7</sub> é capaz de promover a exteriorização de fosfatidilserina (MACKENZIE E COLS, 2005) apesar de evidências que, o receptor P2X<sub>7</sub> seja capaz de realizar a alteração da posição da fosfatidilserina sem comprometer a célula com apoptose (ELLIOTT E COLS, 2005). Adicionalmente, o receptor P2X<sub>7</sub> se encontra associado às cascatas clássicas de ativação de kinases JNK e caspase 3 ativadas por estresse oxidativo (HUMPHREYS E COLS, 2000).

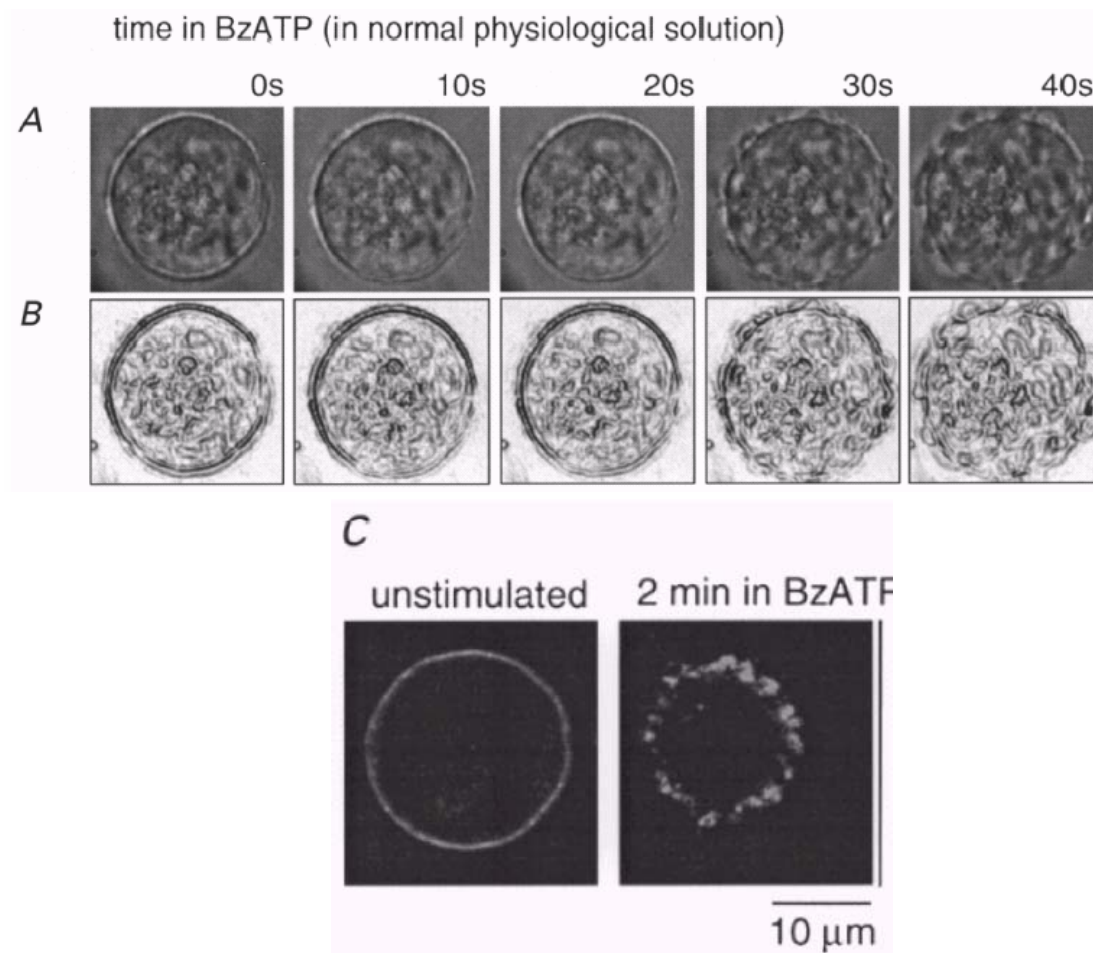
Em macrófagos, o acoplamento de ATP no receptor P2X<sub>7</sub> gera um poro de membrana reversível que permite o influxo e efluxo de moléculas de até 900Da (COUTINHO-SILVA E COLS, 1997). Particularmente, a exposição intermitente do macrófago ao ATP a concentrações milimolares, promoveria um programa de suicídio que inevitavelmente seria sucedido de apoptose, mesmo que o ATP não esteja mais presente (DI VIRGILLIO, 1995; DI VIRGILLIO E COLS, 1998). Macrófagos de linhagem J774 apresentam morte celular induzida por ATP de duas formas: rápida, com características de lise colóide-osmótica, rápida retração citoplasmática ou liberação do conteúdo citoplasmático, caracterizando uma morte tipicamente necrótica (MURGIA E COLS, 1992). O mecanismo de apoptose neste sistema se daria pela ativação de caspases 1 e 3 (LE FREUVE E COLS, 2003), exposição de fosfatidilserina, blebbing de membrana, fragmentação de DNA e liberação de TNF- $\alpha$  em

microglia (FERRARI E COLS, 2005). Tal aparato constituiria uma via clássica de ativação e sensibilização dos macrófagos aos efeitos líticos do ATP (BOURS E COLS, 2006).

O mesmo mecanismo de indução de morte após prolongada exposição ao ATP em concentrações milimolares se repete em células dendríticas (COUTINHO-SILVA E COLS, 1999; SLUYTER E COLS, 2004), o que contribuiria com a remoção destas células após a apresentação de antígenos, auxiliando na manutenção da homeostase. Os efeitos citotóxicos do ATP se dariam através do receptor P2X<sub>7</sub> e ativação de caspases 1 e 3 (COUTINHO-SILVA E COLS, 1999; FERRARI E COLS, 1997).

Sugiyama e colaboradores reportaram que em pericitos, a apoptose induzida via P2X<sub>7</sub> seria revertida quando da ativação do receptor P2Y<sub>4</sub> com UTP, e que nas mesmas células o processo de morte via ativação do receptor P2X<sub>7</sub> seria exacerbada pela abertura de canais de cálcio dependentes de alta voltagem (VDCCs) (SUGYIAMA E COLS, 2005).

Suprenant e colaboradores demonstraram que a ativação do receptor P2X<sub>7</sub> induz microvesiculação e *bebbling* de membrana expondo células HEK 293 por segundos ao ATP (Figura 8) (VIRGINIO E COLS, 1999). Entretanto este mesmo autor sugere que a rápida exposição do receptor P2X<sub>7</sub> ao ATP promoveria o fenômeno de pseudoapoptose já que apesar de apresentação dos sinais de morte clássicos, a célula conseguiria se recuperar evitando a morte. Adicionalmente, Verhoef demonstrou que o ATP induziria o *bebbling* de membrana através da ativação de quinases efetoras do tipo Rho, promovendo alterações dramáticas na membrana plasmática características de vias de apoptose (VERHOEF E COLS, 2003).



**Figura 8-** Alterações morfológicas e lise celular em células HEK 293 expressando receptor P2X<sub>7</sub> de rato, após exposição de 40s a 30  $\mu$ M de BzATP (A) e após melhoramento digital da imagem (B). A ruptura da membrana é evidente a partir de 30s. Em (C), detecção imunohistoquímica para P2X<sub>7</sub>R (VIRGINIO E COLS, 1999).

A morte celular ativada por ATP também pode se dar através de liberação espontânea de ATP através de ativação autócrina/parácrina. *In vitro*, macrófagos murinos que expressam altos níveis de receptor P2X<sub>7</sub> apresentam níveis mais altos de apoptose basal (ADINOLFI E COLS, 2005). Células cervicais humanas utilizam mecanismos autócrinos-parácrinos de controle do receptor P2X<sub>7</sub> no cálcio citosólico utilizando a via mitocondrial na indução da apoptose em situações de injúria celular (WANG E COLS, 2004).

No que concerne a relação entre receptores P2Y e a apoptose, trabalhos recentes reportam apoptose induzida pelo receptor P2Y<sub>1</sub> em célula de astrocitoma (SELLERS E COLS, 2001; MAMEDOVA E COLS, 2006). Adicionalmente, confirmou-se a apoptose induzida por P2Y<sub>1</sub>, via ativação com ADP, e não P2Y<sub>12</sub> (que se torna responsivo a 2-MeSADP), antagonizando a apoptose induzida por TNF- $\alpha$ , via modulação da fosforilação de ERK  $\frac{1}{2}$ , Akt e c-Jun N-terminal kinase (SELLERS E COLS, 2001). O receptor P2Y<sub>1</sub> também é capaz de induzir apoptose em células de carcinoma intestinais através da ativação com ADP (COUTINHO-SILVA E COLS, 2005).

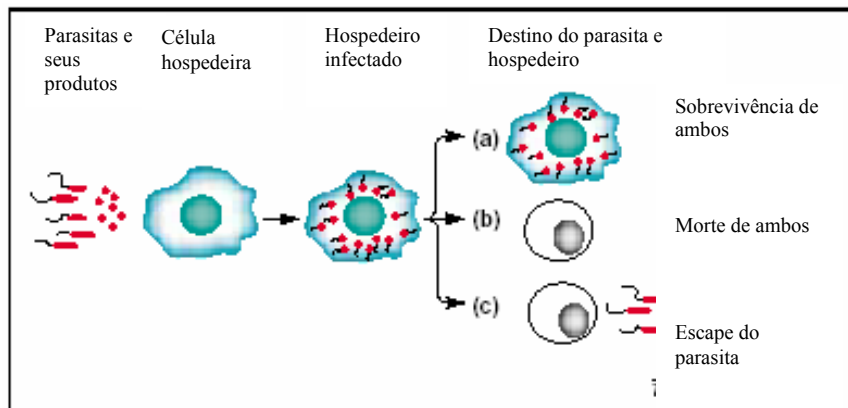
Os receptores P2Y<sub>2</sub> conferem resistência a morte por hipoxia em hepatócitos (CARINI E COLS, 2006) e também a neurônios (ARTHUR E COLS, 2006). Em contrapartida, este receptor possui efeitos anti-proliferativos e apoptóticos em células de carcinoma humano, células epiteliais, coloretais e esofageais (HOLLOPETER E COLS, 2001; HOPFNER E COLS, 2001; INOHARA E COLS, 2003).

O receptor P2Y<sub>4</sub> foi associado com o comprometimento de vias de morte em células de neuroblastoma humano (CAVALIERE E COLS, 2005).

O receptor P2Y<sub>6</sub> encontra-se superexpresso em corações transplantados, promovendo maior integração com TNF- $\alpha$  potenciando a morte de cardiomiócitos (BANFI E COLS, 2005). Em contrapartida, este receptor expresso em astrocitomas humanos previne a apoptose induzida por TNF-  $\alpha$  através da ativação de ERKs (KIM E COLS, 2003).

#### **1.4. Papel de Receptores P2 na Infecção**

Os parasitas intracelulares, conforme já descrito anteriormente, provocam mudanças moleculares e morfológicas na célula hospedeira, gerando também, injúrias teciduais culminando em sítios de inflamação. Sabe-se que os nucleotídeos possuem papel chave nestes sítios, sendo secretados ou liberados através de lise (ABBRACCHIO E COLS, 2006). Células infectadas podem vir a liberar ATP como tentativa de inibição da replicação parasitária, ou liberar após o ciclo de infecção com a subsequente lise do hospedeiro (SIKORA E COLS, 1999). Desta forma, a liberação local de ATP, por exemplo, promove a sinalização de injúria e infecção às células adjacentes (Figura 9). O ATP extracelular induz tanto apoptose quanto necrose em células infectadas, enquanto outros estímulos conhecidos de apoptose não o fazem; a morte de bactérias intracelulares através da fusão fagolisossômica ativada por ATP é de modo geral, via ativação de fosfolipase D (COUTINHO-SILVA E COLS, NO PRELO).



**Figura 9-** Efeito direto dos parasitas e seus produtos na morte celular do hospedeiro (LÜDDER E COLS, 2001).

Adicionalmente, alguns parasitas intracelulares como *M. bovis*, *Vibrio cholerae*, *M. tuberculosis*, *T. cruzi* e *Leishmania* secretam ou expressam enzimas que degradam ou sintetizam nucleotídeos em sua superfície (PUNJ E COLS, 2000; BISAGGIO E COLS, 2003). Os promastigotas, e principalmente os amastigotas de *L. amazonensis* hidrolisam moléculas de ATP com ecto-NTPDases gerando ADP, AMP e adenosina; sendo também demonstrado que estas ATPases promovem maior interação entre os promastigotas e macrófagos peritoneais (PINHEIRO E COLS, 2006). Sabe-se também que tais enzimas são consideradas fator de virulência destes patógenos, demonstrando assim, a importância de nucleotídeos na sobrevivência destes (Tabela 4) (BERREDO-PINHO E COLS, 2001; BISAGGIO E COLS, 2003; CHOPRA E COLS, 2003). No modelo de *Leishmania* e *T. cruzi*, os parasitas mais eficientes na hidrólise de ATP através de ATPases dependentes de Mg (2+), apresentaram-se mais virulentos (BERREDO-PINHO E COLS, 2001; MEYER-FERNANDES, 2004).

Tabela 4- Efeito do ATP extracelular em patógenos extracelulares

<i>Tipo Celular</i>	<i>Patógeno</i>	<i>Efeito descrito</i>	<i>Subtipo de receptor P2 envolvido</i>
Macrófagos humanos	BCG	<i>Clearance</i> mycobacteriano	Indeterminado
Macrófagos humanos	BCG - <i>M. tuberculosis</i> H37Ra	<i>Clearance</i> micobacteriano Acidificação dos fagossomos	P2X <sub>7</sub> , P2Y P2X <sub>7</sub>
Macrófagos murinos	BCG	Produção de NO e ROI	P2Y ?
Macrófagos humanos	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>Clearance</i> micobacteriano; ativação de fosfolipase D	P2X <sub>7</sub> P2 ?
Macrófagos murinos e Linhagem J774	BCG	<i>Clearance</i> micobacteriano; ativação de fosfolipase D; fusão fagossomo-lisossomo	P2X <sub>7</sub>
Macrófagos bovinos	BCG	<i>Clearance</i> micobacteriano e aumento de mRNA de P2X <sub>7</sub>	P2X <sub>7</sub>
Linhagem J774	<i>C. caviae</i>	<i>Clearance</i> de Chlamydia Inibição da apoptose mediada por P2X <sub>7</sub>	P2X <sub>7</sub>
Macrófagos murinos	<i>C. trachomatis</i>	<i>Clearance</i> de Chlamydia; ativação de fosfolipase D; fusão fagossomo-lisossomo	P2X <sub>7</sub>
Timócitos murinos	<i>T. cruzi</i>	Modulação da morte de timócitos	P2X <sub>7</sub> ?
Macrófagos murinos	<i>T. cruzi</i>	Inibição da permeabilização mediada por P2X <sub>7</sub>	P2X <sub>7</sub>
Macrófagos murinos	<i>L. amazonensis</i> ; <i>L. donovani</i>	Aumento da permeabilização mediada por P2X <sub>7</sub>	P2X <sub>7</sub>

Abreviaturas: NO- óxido nítrico; ROI- intermediários reativos de oxigênio. Adaptado de COUTINHO-SILVA e colaboradores revisão no prelo.



Sabe-se que a atividade bactericida dos macrófagos se dá através de algumas vias incluindo a apoptose (DI VIRGILIO, 2005). A apoptose é um tipo de morte celular programada, caracterizada por ser um fenômeno fisiológico para manutenção da homeostase, e também como fator chave no auxílio à contenção de doenças infecciosas humanas. Desta forma, muitos dos parasitas apresentam adaptações que interferem nas vias de morte, modulando assim o adiantamento ou atraso da morte do hospedeiro (BOCCHINO E COLS, 2005). Durante a infecção aguda com *Plasmodium falciparum*, diversas células imunes do hospedeiro entram em vias de apoptose induzida pelo parasita modulando a fisiologia linfocitária e conseqüente diminuição de resposta proliferativa à antígenos da malária (TOURE-BALDE E COLS, 1995; TOURE-BALDE E COLS, 1996). Já organismos infectados com *Toxoplasma gondii*, apresentam inibição da apoptose em macrófagos infectados, de modo a prolongar o período de resistência parasitária (NASH E COLS, 1998).

#### **1.4.1 Na Infecção Bacteriana**

A micobactéria *Mycobacterium tuberculosis* é causadora da tuberculose, doença que atinge as vias respiratórias, amplamente disseminada no mundo. Na infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, a bactéria utiliza como estratégia de sobrevivência o adiamento da maturação endocítica. O ATP extracelular é capaz de levar a morte micobacteriana em macrófagos murinos, bovinos e humanos infectados com o bacilo BCG através da aceleração da fusão lisossômica (SIKORA E COLS, 1999; KUSNER E COLS, 2000; STOBER E COLS, 2001), por um mecanismo dependente de fosfolipase D (EL MOATASSIM E COLS, 1992). A fosfolipase D é conhecida como molécula envolvida em diversas rotas de eliminação parasitária, incluindo aceleração da fusão lisossômica, o que culmina na morte micobacteriana

sem ocorrer necessariamente a morte do hospedeiro (KUSNER E COLS, 2000). Neste sistema, a fosfolipase D é ativada graças a fosforilação de MAPKs, ERKs e PI3-K (FRANCO-MARTINEZ E COLS, 2006). Sabe-se que durante a fase intracelular da bactéria *Listeria monocytogenes*, a fosfolipase D é regulada pelo patógeno, podendo este ser um mecanismo que interfira da eliminação bacteriana (KRAWCZYK-BALSCA E COLS, 2004). Em comparação com outros ligantes que possam induzir a lise em macrófagos, incluindo citólise mediada por complemento, ligante de Fas, e a ativação de CD69 apenas o tratamento com ATP pode estimular a morte do hospedeiro e da micobactéria (SIKORA E COLS, 1999; KUSNER E COLS, 2000; STOBER E COLS, 2001).

Bactérias do gênero *Chlamydia* são parasitas intracelulares obrigatórios, agente etiológico de ampla variedade de doenças incluindo tracoma, infertilidade e aborto, além de progressão de algumas doenças como aterosclerose, artrite e Alzheimer (RUDEL E COLS, 2001). Estas bactérias sobrevivem no hospedeiro macrófago em inclusões envoltas por membrana. Assim como as micobactérias, este patógeno utiliza como estratégia de sobrevivência o retardamento da via lisossômica; Coutinho-Silva e colaboradores demonstraram que o ATP extracelular, ativando fosfolipase D, induz a fusão fago-lisossômica em macrófagos infectados com *Chlamydia trachomatis*, culminando na morte bacteriana. Experimentos com animais deficientes do receptor P2X<sub>7</sub> comprovaram a necessidade deste receptor para a ativação com ATP extracelular (COUTINHO-SILVA E COLS, 2003). Experimentos com outras espécies de *Chlamydia* demonstraram que estas podem inibir a apoptose induzida por diferentes estímulos inclusive modulando negativamente o receptor P2X<sub>7</sub> (COUTINHO-SILVA E COLS, 2001).

### 1.4.2 Na Infecção por Protozoários

A doença de Chagas é causada por um protozoário intracelular facultativo denominado *Trypanosoma cruzi*. Tal doença é caracterizada por uma condição inflamatória crônica com cardiomiopatias e desordens digestórias.

O protozoário *Trypanosoma cruzi*, utiliza o ATP extracelular como via sinalizadora na fase aguda da infecção, causando atrofia tímica (LEITE-DE-MORAES E COLS, 1992). Na fase aguda de infecção, os timócitos, especialmente a população CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> duplo positiva, se encontram mais sensíveis ao ATP apresentando alta permeabilização de membrana e morte do hospedeiro. A utilização de inibidores do receptor P2X<sub>7</sub> como  $\alpha$ -ATP, Mg<sup>2+</sup> e agonistas mais potentes como Bz-ATP, demonstraram a importância deste receptor no *clearance* de timócitos e seu papel na atrofia tímica (MANTUANO-BARRADAS E COLS, 2005). Por outro lado, macrófagos infectados com *T. cruzi* permeabilizam menos, sugerindo a regulação negativa do receptor P2X<sub>7</sub> nos mesmos (Tabela 4).

Torres-Santos em 2002 sugeriu a regulação positiva do receptor P2X<sub>7</sub> durante a infecção com *L. amazonensis* *in vivo* e *in vitro*, gerando respostas funcionais quando da sua ativação, como maior permeabilidade plasmática ao *Lúcifer yellow* através do ATP. Tal permeabilidade aumentada também foi observada em células de baço infectadas com *L. donovani*. A presença de ATP extracelular durante a infecção com *L. amazonensis* parece não interferir na invasão, mas macrófagos tratados com este nucleotídeo apresentam taxa parasitária diminuída (TORRES-SANTOS E COLS, 2002). Também foi observado que o ATP não possui efeito direto na viabilidade de promastigotas. Corroborando com Torres-Santos, Chaves em 2005, demonstrou *in vivo* e *in vitro* diminuição da taxa parasitária em animais infectados com *L. amazonensis*, quando tratados com ATP e UTP (CHAVES, 2005).

Ainda não é conhecido o mecanismo de ação dos nucleotídeos para culminar na diminuição da carga parasitária de *Leishmania*, provavelmente se daria de forma diferenciada das infecções bacterianas. Visto que os parasitas de *Leishmania* necessitam do pH ácido dos fagolisossomos para replicação e sobrevivência no hospedeiro, utilizando um mecanismo muito peculiar que interfere no tempo de maturação do fagolisossomo (Figura 2). Enquanto nas inclusões bacterianas, o ATP propicia a morte do patógeno induzindo acidificação das inclusões utilizando a fosfolipase D. Portanto, como o ATP e o UTP atuariam nas infecções de *Leishmania*? A possível regulação positiva do receptor P2X<sub>7</sub> na infecção com *L. amazonensis* (proposto anteriormente) abre a possibilidade a questionamentos como: quais mecanismos estariam envolvidos na redução da taxa parasitária; se estariam sendo modulados diferentes receptores P2; se estes receptores seriam funcionais; se sim, qual o papel dos mesmos na infecção; O que significaria a regulação destes receptores na infecção?

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a modulação funcional de receptores P2 na infecção *in vitro* com *Leishmania amazonensis*.

## 2.2 Objetivos Específicos

1. Detectar alterações morfológicas em células infectadas com *L. amazonensis* quando tratadas com agonistas para receptores P2X e P2Y.
2. Avaliar a modulação de receptores P2X e P2Y na infecção de macrófagos com *Leishmania amazonensis* através de técnicas de medidas de cálcio intracelular.
3. Avaliar se há morte de macrófagos infectados em resposta a ativação dos receptores P2 modulados. Examinando o tipo de morte (necrose x apoptose) e se células de camundongos P2X<sub>7</sub><sup>-/-</sup> infectadas apresentam morte com a utilização de diferentes agonistas para receptores P2.

### **3. Materiais e Métodos**

### **3.1 NUCLEOTÍDEOS**

Foram utilizados como agonistas dos receptores P2 os nucleotídeos: Trifosfato de Adenosina (ATP), 5'- Trifosfato de Uridina (UTP) e 5'- Difosfato de Uridina (UDP). Na qualidade de antagonistas de receptores P2 foram utilizados: ATP oxidado (oxATP), Suramina, ácido pirodoxalfosfato-6-azofenil-2', 4'-dissulfônico (PPADS). Todos os materiais supracitados foram obtidos da Sigma e estocados em PBS a -20°C até o uso.

### **3.2 CAMUNDONGOS**

Os camundongos utilizados das linhagens BALB/c e C57BL/6, foram mantidos em biotério climatizado com água, maravalha e ração comercial esterilizada. Também foram utilizados camundongos deficientes para o receptor  $P2X_7$  ( $P2X_7^{-/-}$ ) gentilmente cedidos pelo Doutor James Mobley (PGRD, Pfiser Inc., Groton,CT) e mantidos no biotério de animais Transgênicos do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Foram utilizados animais de ambos sexos, com idades entre 10 a 15 semanas para extração de macrófagos peritoneais.

### **3.3 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS**

Os animais foram sacrificados por asfixia em câmara de CO<sub>2</sub>, seguido de deslocamento cervical, seguindo condutas de bioética de acordo com as normas do Instituto de biofísica. A extração de macrófagos residentes foi realizada por injeção de 10 mL de meio



DMEM/BIC/HEPES (Dubelco's Modified Eagle's Medium, 3,7g/L de bicarbonato de sódio e 5g/L de HEPES) (Invitrogen) gelado no peritônio dos animais, seguindo-se de massagem e aspiração das células. Então, após centrifugação, as células foram ressuspensas em meio DMEM/BIC/HEPES e contadas através de exclusão por Azul de Tripán em câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram ajustadas a uma concentração de  $2 \times 10^6$  células por 50 $\mu$ L. Cada placa, poço ou lamínula recebeu 50  $\mu$ L de células, permanecendo em repouso por 1 hora na estufa a 37°C em atmosfera umidificada e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, todos os poços foram lavados 2 vezes com PBS estéril a 37°C, de modo a selecionar positivamente as células aderidas. Finalmente, todos os poços receberam meio DMEM/BIC/HEPES suplementado (100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina, 1% de L-glutamina e 10% de soro fetal bovino-SFB) (Invitrogen).

### 3.4 PARASITOS

Utilizou-se promastigotas de *Leishmania amazonensis* da cepa Josefa (designação MHOM/BR/Josefa), transfectadas com GFP através de eletroporação. Os protozoários foram obtidos com a Dr<sup>a</sup> Bartira Rossi Bergman (IBCCF/ UFRJ). Os promastigotas foram mantidos em meio 199 (Sigma) suplementado (5% de hemina, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina, 0,3 mg/L de L-glutamina e 10% de soro fetal bovino SFB) a 26° C. Repiques periódicos foram feitos a partir da fase estacionária da cultura até no máximo a 4<sup>a</sup> passagem.

Os parasitas são contabilizados após fixação com formalina a 4% e contagem direta em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico.

### 3.5 INFECCÃO

Para a infecção, as células obtidas do lavado intraperitoneal foram plaqueadas a uma concentração de  $2 \times 10^6$  células por poço, placa ou lamínula (de acordo com o experimento) e deixadas para aderir por 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Em seguida, para seleção positiva das células, foram lavadas duas vezes com PBS estéril, descartando-se as células não aderentes. As células aderentes foram infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* (10 parasitos/macrófago) por 4 horas. Os parasitos não internalizados foram então, removidos lavando-se com PBS pré-aquecido, e os macrófagos infectados, mantidos em meio DMEM/BIC/HEPES suplementado e mantido a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera umidificada e 5% de  $\text{CO}_2$  por 48 horas, quando os diferentes tratamentos serão realizados.

### 3.6 MICROSCOPIA ÓPTICA

#### 3.6.1 Contraste de fase

Após o plaqueamento e a infecção ou não em placas de cultura estéreis de 35mm por 36 horas, cada placa recebeu seu respectivo tratamento com nucleotídeos diluídos em PBS por 40 minutos a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera umidificada e 5% de  $\text{CO}_2$ . Então, os poços foram incubados com DMEM/ HEPES suplementado e mantidos por mais 8 horas a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera umidificada e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após o período de incubação, estas foram levadas ao microscópio óptico invertido da Zeiss, onde foram fotografadas em objetivas de 40 X ou 63X e suas

imagens adquiridas no programa Image Pro Plus (Olympus) e processadas no programa Adobe Photoshop 7.0.

### **3.6.2 Fluorescência**

Após o plaqueamento e a infecção ou não em placas de cultura estéreis de 35mm por 36 horas, cada placa recebeu seu respectivo tratamento com nucleotídeos por 40 minutos a 37° C em atmosfera umidificada e 5% de CO<sub>2</sub>. Então, as placas foram incubadas com DMEM/ HEPES suplementado e mantidas por mais 8 horas a 37°C em atmosfera umidificada e 5% de CO<sub>2</sub>. Logo após, as células receberam o tratamento com o corante Hoescht ( excitação 350 nm e emissão 461nm ) na concentração de 1:1000 por 10 minutos de incubação a 37° C em atmosfera umidificada 5% de CO<sub>2</sub>, ao abrigo da luz.

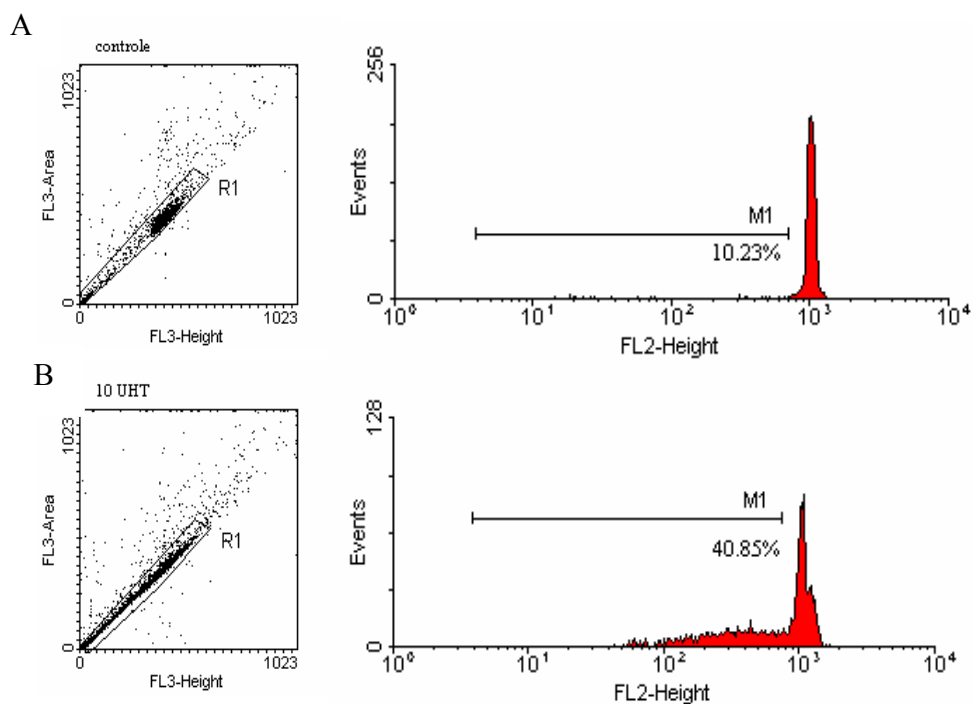
### **3.7 ENSAIOS DE APOPTOSE**

Para medidas de apoptose celular, foram realizados ensaios de citometria de fluxo baseados na análise da formação de núcleos hipo-diplóides.

Após plaqueamento e infecção ou não em placas de 24 poços por 36 horas, cada poço foi incubado com seu respectivo tratamento com nucleotídeos diluídos em PBS por 40 minutos a 37°C em atmosfera umidificada e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, os poços foram suplementados com DMEM/ HEPES suplementado e mantidos por mais 8 horas a 37°C em atmosfera umidificada e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram removidas por raspagem e ressuspensas em tampão de ciclo celular (50 µg/mL de brometo de etídeo, 0,01g de citrato de sódio, 0.1% de

Triton X-100) por pelo menos 15 minutos. O tampão de ciclo celular permite determinar a porcentagem de núcleos hipo-diplóides.

Foram coletados 5000 eventos por amostra sendo sua aquisição no programa Cellquest, no equipamento FACScalibur (Becton Dickinson) equipado com um laser de argônio (excitação a 488nm) avaliando-se: o espalhamento de luz frontal (*forward scatter*), o espalhamento de luz lateral (*side scatter*), a emissão de fluorescência à 575nm na escala logarítmica (FL2) e à 633nm na escala linear (FL3), além de área sobre a curva de fluorescência à 633nm (FL3 *area*). Avaliando a relação entre FL3, na abscissa, e FL3 área, na ordenada, fomos capazes de excluir os eventos que não se encontravam dentro da diagonal, que representa a relação direta entre a quantidade de luz detectada pelo fotodetector FL3 e o "tamanho" do evento avaliado (FL3 área). O evento dentro deste espalhamento obedece a uma relação direta entre tamanho e quantidade de material genético, onde traçávamos uma região para análise. Assim, se qualquer evento fora desta região (R1 na Figura 10) não era analisado, podendo corresponder a núcleos grumados, tamanho pequeno e muito material genético, representando falsos resultados que poderiam comprometer a qualidade da análise (Figura 10). O equipamento utilizado se localiza no Instituto de Microbiologia, CCS, UFRJ. Para análise dos resultados, utilizou-se o programa WinMDI (Multiple Document Interface Flow Cytometry Application, versão 2.8), desenvolvido por Joseph Trotter, The Scripps Research Institute (La Jolla, E.U.A.).



**Figura 10:** Gráficos ilustrativos do método de análise da fragmentação do DNA de macrófagos. A região R1 representa uma relação direta entre intensidade de brilho do DNA ligado ao BE, avaliada pelo fotodetector FL3 e a quantidade de material genético avaliada pela área de FL3. Os dados dentro deste grupo foram reavaliados quanto ao de fragmentação através da intensidade de brilho na escala logarítmica, onde determinamos o valor de  $10^3$  como o ponto de nossos núcleos  $2n$  íntegros, os valores abaixo até  $10^3$  foram considerados núcleos hipo-diplóides, estando dentro da região M1. Em **A** temos os macrófagos controle, em **B** os macrófagos incubados com 3mM de ATP extracelular.

### **3.8 ENSAIO DA LIBERAÇÃO DE LDH**

A enzima lactato desidrogenase (LDH), constitutivamente expressa em altas concentrações em todas as células estudadas é altamente estável e muito utilizada como marcador de lise celular, pelo comprometimento da membrana plasmática, caracterizado como morte por necrose.

Após plaqueamento e infecção ou não em placas de 96 poços por 36 horas, cada poço recebeu seu respectivo tratamento com nucleotídeos diluídos em PBS por 40 minutos a 37°C em atmosfera umidificada e 5% de CO<sub>2</sub>. Então, os poços foram incubados com DMEM/HEPES suplementado e mantidos por mais 8 horas a 37°C em atmosfera umidificada e 5% de CO<sub>2</sub>.

A avaliação do LDH liberado durante a indução de morte por ATP, UTP e UDP foi realizada com o auxílio de kit comercial (Dole's Reagentes, Goiás, Brasil) e mensurado em leitor de microplacas *Elisa* no comprimento de 490nm. O total de LDH liberado quando todas as células são rompidas com triton X-100 0.1% foi considerado como 100% de liberação da enzima.

### **3.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO**

Os macrófagos obtidos através de lavado intraperitoneal foram plaqueados e infectados (conforme descrito no item 3.5) e tratados com nucleotídeos por 30 minutos a 37°C em

atmosfera umidificada e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram fixadas 2, 4, 6, e 8 horas após o tratamento com os nucleotídeos, para emblocamento em resina hidrofóbica EPON (Sigma) com Glutaraldeído 2,5% (Sigma), paraformaldeído 4% (Reagen) em tampão Cacodilato de sódio 1mM e 2,5mM de sucrose (Reagen) pH 7,4, por 1 hora a temperatura ambiente.

As células fixadas foram removidas das garrafas de cultura através de raspagem com auxílio de um rodo de células. Estas foram peletadas, lavadas duas vezes em PBS e pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio (Sigma). Seguida da pós-fixação, as amostras foram novamente lavadas em PBS, endurecidas, cortadas em pequenos pedaços e desidratadas por 10 minutos em graus crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100% e 100% super seca). Então, infiltradas em resina hidrofóbica EPON em concentrações crescentes (acetona: epon): 2:1, 1:1, 1:2, puro 2X.

As amostras foram então, emblocadas e polimerizadas a 60 °C por 48 horas, o bloco cortado em fatias ultrafinas através de um ultramicrotomo (Leica) e coletados em grades (cobertas com formvar) de cobre previamente tratadas com ácido nítrico fraco.

As grades contendo os cortes foram contrastadas com 2% Acetato de Uranila e Citrato de chumbo (Sigma). O material foi observado no Microscópio eletrônico de transmissão ZEISS, localizado no LBBC, pavilhão Carlos Chagas, FIOCRUZ, Manguinhos, RJ.

### **3.10 MEDIÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR**

As células infectadas ou não, foram plaqueadas (descrito no item 3.3) em lamínulas de 40mm por 48 horas em meio DMEM/BIC/HEPES suplementado e mantidas a 37°C em atmosfera umidificada e 5% de CO<sub>2</sub>. Para a medição de cálcio, as células foram incubadas

com o fluorocromo FURA-2-AM a 4 $\mu$ M (Molecular Probes) e Probenicid (Sigma) a 5mM em meio DMEM/BIC/HEPES suplementado à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 40 minutos. As lamínulas foram então, lavadas por duas vezes com PBS e montadas em câmara de perfusão de três compartimentos no microscópio NIKON Diaphot 300. A câmara central, contendo as células, permanece com volume de 200 $\mu$ L, sendo sua velocidade de vazão de 1mL min<sup>-1</sup>. A perfusão foi feita com solução de PBS suplementada com CaCl<sub>2</sub> (Sigma) a 1mM pH 7,4 a 23 °C ou 37 °C. Os nucleotídeos (Sigma) (diluídos em PBS/Ca<sup>2+</sup> 1mM) foram aplicados em pulsos na forma de *bolus* a diferentes concentrações ou perfundidos constantemente por 500s. Os nucleotídeos são aplicados cinco vezes mais concentrados que na concentração final desejada na pré-câmara de perfusão. Para a realização de curva dose-resposta, concentrações crescentes dos nucleotídeos foram aplicados em pulsos seqüenciais com intervalos fixos de 5 minutos.

A captação da alteração de cálcio foi feita através do sistema de aquisição de um fotômetro de fluorescência Photon Technology, Princetown, NJ. O fluorocromo de escolha, FURA-2 AM (Molecular Probes) é excitado alternadamente a 340-380nm e sua emissão a 510nm é medida. A taxa de medida que é proporcional à variação da concentração de cálcio intracelular será determinada a cada 100ms. A escala de variação de emissão é arbitrária.

### **3.11 WESTERN BLOTTING**

Os macrófagos obtidos através de lavado intraperitoneal foram plaqueados, infectados (conforme descrito no item 3.5) e mantidos por 48 horas a 37°C em atmosfera umidificada e 5% de CO<sub>2</sub>. Após as 48 horas, as células eram transferidas para o gelo e com o auxílio de um



rodo de cultura eram homogeneizadas em tampão contendo: 20mM Tris-HCl, pH 7,5, 2mM EDTA, 10mM EGTA, 0,25M sucrose, leupitina (25 mg/mL), aprotinina (25 mg/mL) e PMSF (17 mg/mL). As células homogeneizadas eram então submetidas de 25 a 30 passagens pela agulha de seringa de insulina. Este procedimento cria as condições de pressão necessárias para causar o rompimento da membrana plasmática. As amostras foram submetidas à dosagem protéica pelo método de Bradford (DA CRUZ E COLS, 2006), seguido por adição de tampão de amostra cinco vezes concentrado (60 mM Tris-HCl, 25% glicerol, 2% SDS,(ou 5%), 14,4 mM 2-mercaptoetanol, 0,1% azul de bromofenol pH 6,8) e fervidas por 5 minutos a 98°C para subsequente separação por eletroforese SDS-PAGE.

Entre 20 – 40µg de proteína total das amostras foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE de 10% de acrilamida. As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose com o auxílio de um aparato de transferência (Bio Rad) a 90mA por 75 minutos. A membrana contendo as proteínas foi tratada com tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado em solução de Tris-HCl 20mM, Tween20 0,05%, pH 7,4 [TBS-T]) por 2 horas a temperatura ambiente ou durante a noite à 4°C. A membrana foi incubada com TBS-T por 2 horas em temperatura ambiente e sob agitação constante. Foram utilizados anticorpos contra P2X<sub>7</sub>, P2Y<sub>2,4 e 6</sub> (Alomone, Jerusalém-Israel) nas diluições de recomendadas pelos fabricantes. Ao término da incubação a membrana foi lavada por 3 vezes com TBS-T de 10 a 30 minutos à temperatura ambiente e incubada por 2 horas com anticorpo secundário específico conjugados à peroxidase diluído 1:2000 (Amersham Biosciences, São Paulo, Brasil) em TBS-T, seguindo as recomendações do fabricante. Finalmente, a membrana foi lavada conforme descrito acima e tratada para revelação por quimiluminescência com o kit ECL Plus (Amersham Biosciences, São Paulo, Brasil) de acordo com instruções do fabricante. A aquisição da imagem final da

revelação foi feita pela utilização do *scanner* para luminescência de géis STORM860 e o software ImageQuant versão 5.2 (Molecular Dynamics).

### 3.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises dos dados foram realizadas com *Student`s t test two tailed*.

A significância \*  $p < 0,01$  \*\*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,0001$ .

## **4. RESULTADOS**

## **4.1 Alterações morfológicas em macrófagos infectados com *L. amazonensis* tratados com nucleotídeos**

### **4.1.1 Microscopia Óptica**

Devido à ação anti-leishmania do UTP e ATP observada por Chaves em 2005 e aumento de permeabilização de células infectadas com *L. donovani* por Torres-Santos em 2003, decidimos verificar se o tratamento com nucleotídeos induziria alterações morfológicas em células infectadas e em células não infectadas. Para tanto, macrófagos residentes foram infectados ou não e deixados em repouso por 48 horas. Após este período, as células foram tratadas com os nucleotídeos ATP, UTP e UDP por 40 minutos em PBS e 6 horas após o tratamento, as células foram fotografadas em contraste de fase em microscópio óptico de fluorescência Zeiss LCM 10.

Observamos que macrófagos não infectados (Figura 11A) apresentam estrutura espaiada e alongada. A membrana plasmática se encontra contínua, células confluentes característico de culturas “saudáveis” e com alguns grânulos citoplasmáticos. As células infectadas com *L. amazonensis* (Figura 11B) apresentam-se aumentadas se compararmos com os não infectados. Algumas destas mudaram de formato tornando-se mais expandidas, com presença de grânulos citoplasmáticos e vacúolos parasitóforos. Os macrófagos também apresentaram-se com características de culturas “saudáveis” apesar da infecção.

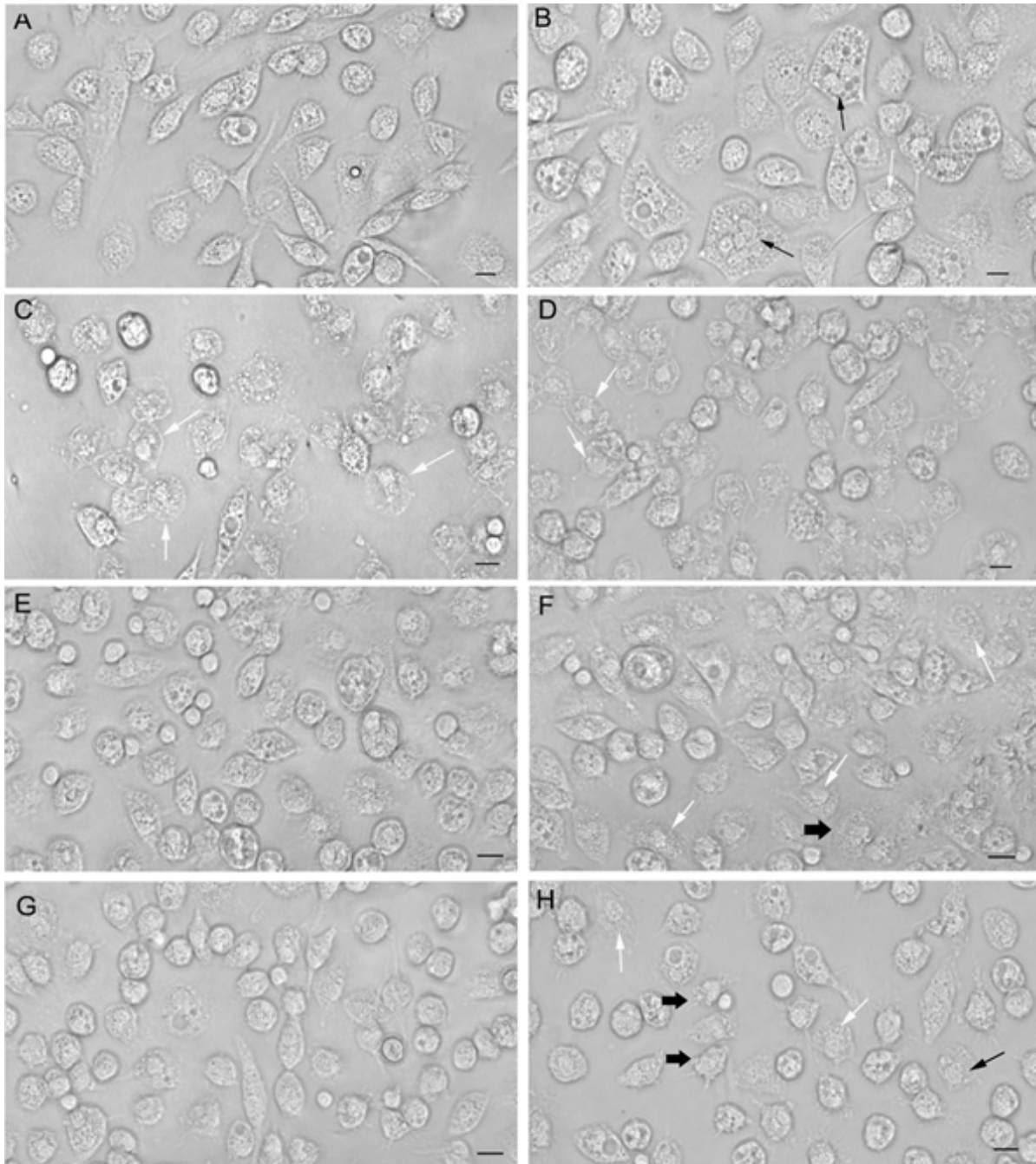
Já os macrófagos tratados com ATP 3mM (Figura 11C) apresentavam-se morfológicamente alterados, de formato arredondado e células dispendo-se em forma de grumos. O citoplasma neste tratamento apresenta menor densidade que o das células controle

(Figura 11A). As membranas plasmáticas dos macrófagos estavam onduladas, caracterizando-se os *blebs* de membrana. Os macrófagos infectados tratados com ATP (Figura 11D) também se apresentavam grumados, e membranas com *blebs* assim como na situação anterior (Figura 11C).

Os macrófagos não infectados tratados com UTP 100 $\mu$ M (Figura 11E) também apresentavam-se de formato mais arredondado que o não infectado (Figura 11A) mas seu citoplasma se encontrava ainda denso e a membrana plasmática aparentemente íntegra. Entretanto, as células infectadas que receberam o mesmo tratamento (Figura 11F) estavam grumadas, arredondadas e de citoplasma com pouca densidade, além disto, membrana plasmática com ondulações (*blebs* de membrana).

No tratamento de macrófagos não infectados com UDP 100 $\mu$ M (Figura 11G), observou-se células menos espreiadas que as não infectadas (Figura 11A) mas de densidade citoplasmática normal e membrana sem perturbações. Já as células infectadas que receberam este tratamento (Figura 11H), apresentavam morfologia característica de morte celular como citoplasma pouco denso e *blebs* de membrana. As observações morfológicas se encontram resumidas na **Tabela 5**.

**Figura 11-** Microscopia de contraste de fase, macrófagos em cultura. (A) (C) (E) (G) não infectados, (B) (D) (F) (H) infectados com *L. amazonensis*. (C e D) ATP 3mM; (E e F) UTP 100μM; (G e H) UDP 100μM. — representa 10 μm. As setas pretas e finas apontam os VPs, as setas pretas e grossas apontam para irregularidades na membrana plasmática, enquanto as setas brancas apontam alterações citoplasmáticas. Experimento em triplicata



Situação	Disposição	Citoplasma	Membrana
<b>Macrófagos não infectados</b>	espraiada	-denso -com poucos grânulos	Lisa e contínua
<b>Macrófagos Infectado</b>	Esticadas, mas alargadas	-denso -com poucos grânulos -presença de vacúolo parasitóforo bem definido	Lisa e contínua
<b>Macrófagos não infectados + ATP</b>	-arredondadas -grumadas	-pouco denso	-ondulada com formação de <i>blebs</i>
<b>Macrófagos infectados+ATP</b>	-arredondadas -grumadas	-pouco denso	-ondulada com formação de <i>blebs</i>
<b>Macrófagos não infectados + UTP</b>	-arredondadas	-densidade normal	-ondulada
<b>Macrófagos infectados + UTP</b>	-arredondadas -grumadas	-pouco denso	-ondulada com formação de <i>blebs</i>
<b>Macrófagos não infectados + UDP</b>	-pouco esticadas	-densidade normal	-lisa e contínua
<b>Macrófagos infectados+UDP</b>	-grumadas	-pouca densidade	-ondulada com formação de <i>blebs</i>

**Tabela 5-** Alterações morfológicas observadas através de microscopia óptica em células não infectadas e infectadas devido a ação do ATP, UTP e UDP.



#### 4.1.2 Microscopia Eletrônica

Para verificar as alterações morfológicas ultraestruturais sofridas pelo macrófago hospedeiro e pelos parasitas, os macrófagos foram infectados conforme já descrito, e tratados com ATP a 500 $\mu$ M, UTP a 100 $\mu$ M por 30 minutos, sendo sua fixação 8 horas após o tratamento com os nucleotídeos. O período de 8 horas foi o de escolha para verificar os passos iniciais de alteração morfológica induzida pelos nucleotídeos. As células fixadas foram então processadas para microscopia eletrônica em resina hidrofóbica (buscando melhor preservação da morfologia), cortadas em cortes ultrafinos e visualizadas no microscópio eletrônico de transmissão.

Os macrófagos não infectados (Figura 12A) apresentam forma e granulosidade típicas de quando presentes em boas condições de cultura, como: presença de filopódios, núcleo bem definido ocupando aproximadamente 2/3 do volume celular, rico em mitocôndrias no citoplasma com proximidade a figuras de retículo endoplasmático.

Os macrófagos infectados (Figura 12B) com *L. amazonensis* apresentavam forma esticada, contendo algumas vesículas próximas ao vacúolo parasitóforo (VP), que se fundem entre si e com os VPs. Foi encontrado apenas um parasita por vacúolo parasitóforo nas células observadas, exceto em duas células que continham duas *Leishmanias* em seus vacúolos. Estes parasitas se apresentavam na forma amastigota, aflagelados, arredondados com núcleo íntegro, o citoplasma granulado e membrana plasmática íntegra intimamente próxima à membrana do VP. Os vacúolos parasitóforos de alguns macrófagos se apresentam rompidos para o meio extracelular. Não foram observadas *Leishmanias* livres.

Macrófagos infectados tratados com ATP 500 $\mu$ M (Figuras 12C e 12E) ainda apresentavam a forma espreada, citoplasma muito granuloso, contendo muitas vesículas. Presença de muitas figuras reticulares no citoplasma especialmente próximas ao VP. Foram observadas algumas células sem parasitas em seu interior. A membrana plasmática se apresenta íntegra com filopódios. Os VPs se apresentam íntegros com algumas vesículas em seu interior talvez originadas do citoplasma do hospedeiro, estando os VPs localizados bem próximos da membrana plasmática do hospedeiro. A membrana dos VPs se encontra justapostas às membranas dos parasitas. Os parasitas presentes nos VPs de células tratadas com ATP apresentam vesículas eletrondensas em seu citoplasma. Também foram encontrados macrófagos em apoptose tardia (Figura 12H).

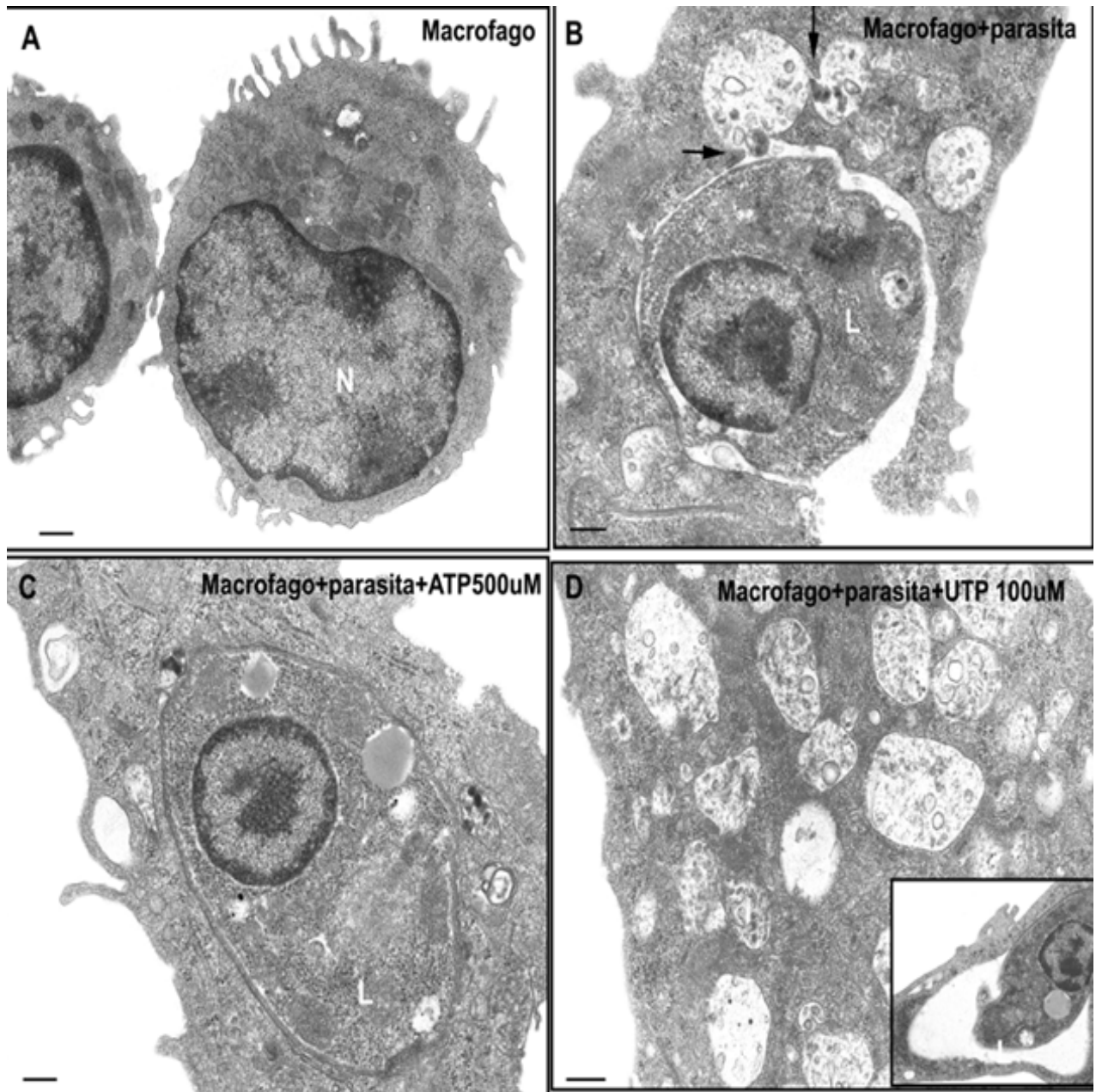
Macrófagos infectados tratados com UTP a 100 $\mu$ M (Figura 12D) apresentam-se espreados, com citoplasma rico em vesículas. Estas vesículas encontram-se em fusão umas com as outras. As células possuem mais de um VP que possuem de 1 a 3 parasitas cada um. Este VP é maior que os VPs das situações citadas anteriormente, possuindo parasitas de forma um pouco mais alongada. Os parasitas possuem vesículas eletrondensas como as encontradas no tratamento com ATP (Figura 12C), e estão com lesões na forma de vesículas citoplasmáticas (Figuras 12F e G) além de alterações na estrutura nuclear. Em algumas imagens foram necessários maiores aumentos para verificar a presença dos microtúbulos submembranares característicos de *Leishmania*, já que esta encontrava-se em estágio de processamento. Os VPs se encontram bem próximos à membrana plasmática do hospedeiro. Foram observados muitos parasitas livres e alguns macrófagos íntegros sem presença de infecção além de sinais de autofagia nestas células como aumento de vesículas de forma membranar (Figura 12F).

A análise ultraestrutural da infecção nos revela alguns pontos em comum: A infecção promove a maior vesiculação citoplasmática da célula hospedeira, sendo que estas vesículas parecem fundir-se com os VPs; células infectadas apresentam um formato espraído assim como em células não infectadas, aparentando estarem saudáveis; o tratamento com nucleotídeos promove maior vesiculação citoplasmática do hospedeiro; O tratamento com ATP é o único que mantém a justaposição da membrana do parasita com a membrana do VP, enquanto o tratamento com UTP apresenta VPs maiores.

O fato de células infectadas apresentarem rompimento de VPs com liberação de parasitas, em contradição com células tratadas com ATP apresentando parasitas ainda em VPs íntegros nos sugerem que o período de eliminação induzido pelo ATP pode ser mais lento ou por mecanismos diferentes que dos outros nucleotídeos. Adicionalmente, o ATP poderia estar promovendo um maior período de contenção do parasita dentro da célula hospedeira, exatamente para uma tentativa de eliminação por vias de apoptose do macrófago. As vesículas eletrondensas, vacúolos e alterações nucleares observadas no tratamento com ATP e UTP podem indicar injúria no parasita, mas análises mais detalhadas seriam necessárias para elucidar o teor de tais vesículas.

O tratamento com UTP induziu a formação de VPs largos com pouco contato com o parasita, que sugere um momento próximo a tentativa de eliminação do parasita, em seguida, rompendo a integridade da membrana como observado. A fusão de VPs observada nestes tratamentos pode indicar tanto a liberação da *Leishmania* para que infecte macrófagos vizinhos perpetuando a infecção, quanto a fusão para eliminação direta de todos os parasitas.

**Figura 12** -Micrografia eletrônica de macrófago controle e infectados tratados com diferentes nucleotídeos. Prancha1 (A) Macrófago controle (B)Macrófago infectado com *L. amazonensis* (C) Macrófago infectado tratado com ATP 500 $\mu$ M (D) Macrófago infectado tratado com UTP 100 $\mu$ M. A Barra \_\_\_\_\_ =0,5 $\mu$ M. Prancha 2 Macrófago infectado com *L. amazonensis* (E) e (H) tratado com ATP 500 $\mu$ M (F) e (G) tratado com UTP 100 $\mu$ M. A Barra \_\_\_\_\_ =2 $\mu$ M. L- *Leishmania*, N- núcleo do macrófago, VP- vacúolo Parasitóforo, RE- Retículo endoplasmático. As setas apontam os vacúolos em fusão

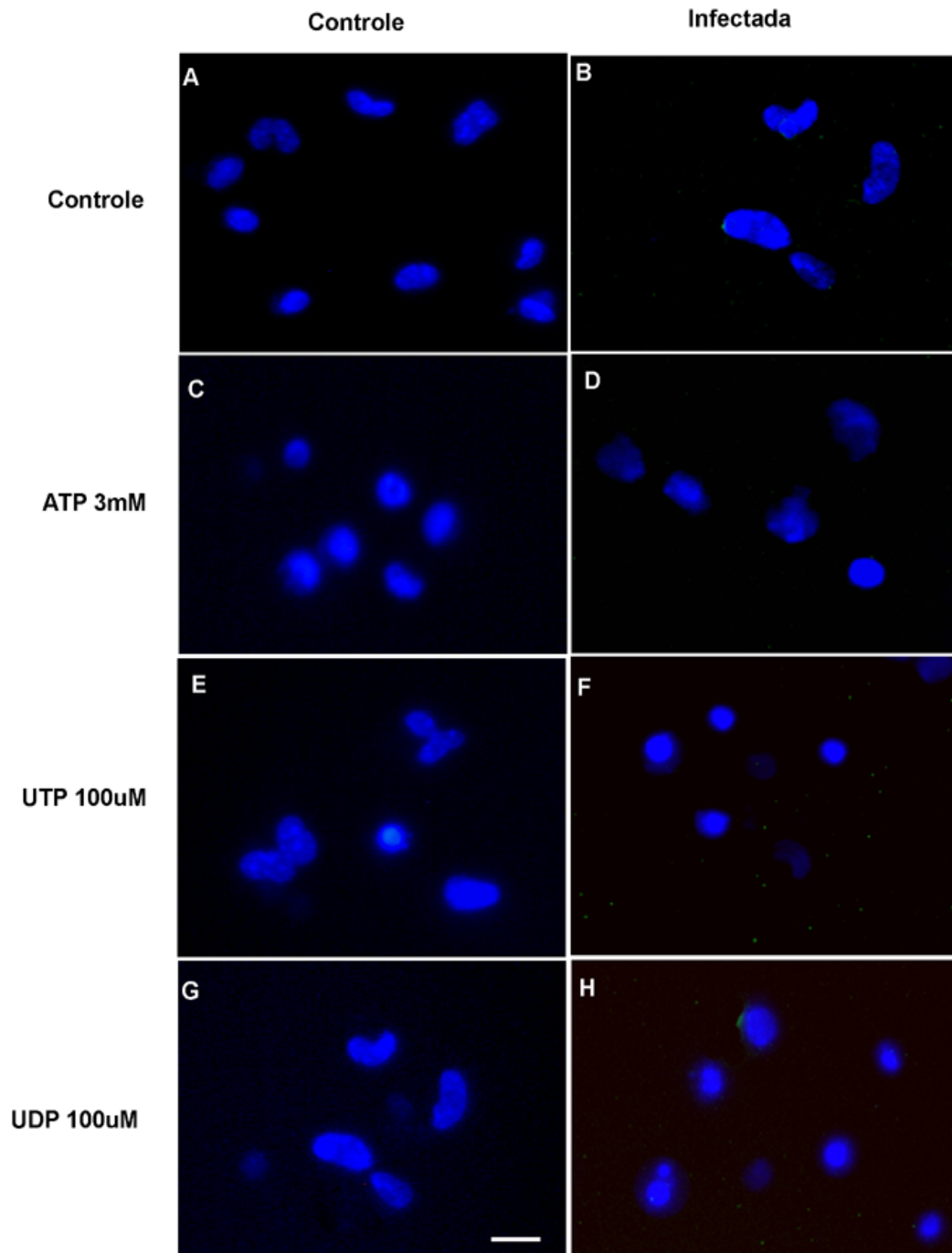


## 4.2- Microscopia Óptica de Fluorescência

Para observar os fenômenos envolvendo as alterações morfológicas *apoptosis-like* e a presença do amastigota de *L. amazonensis* nos macrófagos tratados com os nucleotídeos, foram realizados experimentos com o corante Hoescht. Este corante fluorescente entra passivamente pela membrana plasmática devido a seu pequeno tamanho e possui afinidade com moléculas de DNA, corando os núcleos. Para este experimento, também foi utilizada a fluorescência emitida pela molécula GFP (*green fluorescent protein*) transfectada aos promastigotas de *L. amazonensis* utilizados neste trabalho.

As células não infectadas não tratadas apresentaram a marcação azul do corante Hoescht na forma típica “*bean-shape*” de núcleo dos macrófagos, em tamanhos típicos (aproximadamente 3µm)(Figura 13A), enquanto os macrófagos não infectados tratados com ATP a 3mM apresentaram marcação nuclear arredondada, retraída e pontual (0,5 a 1µm de diâmetro), típico de agregação nuclear apoptótica (Figura 13C). Os macrófagos não infectados tratados com UTP (Figura 13E) e UDP (Figura 13G), apresentaram núcleos típicos de macrófagos em cultura, no formato “*bean-shape*” similares aos não tratados (Figura 13A). Os macrófagos infectados com *L. amazonensis* (Figura 13B) apresentaram a marcação nuclear com as mesmas características dos macrófagos não infectados (Figura 13A), mostrando que a infecção não alteraria por si só o núcleo celular. Entretanto, macrófagos infectados com *L. amazonensis* tratados com ATP (Figura 13D), UTP (Figura 13F) e UDP (Figura 13H) apresentaram a marcação para Hoescht (em azul na foto) pontual e retraída assim como em células não infectadas tratadas com ATP (Figura 13C).

**Figura 13-** *Microscopia óptica de fluorescência. Em azul marcação de núcleo com Hoescht. Macrófagos não infectados (A,C,E,G) e Infectados (B,D,F,H) tratados com ATP (C e D), UTP (E e F) e UDP (G e H). Experimento em triplicata \_\_\_\_ =10 $\mu$ M*





#### 4.2- Microscopia Óptica de Fluorescência com Sobreposição de GFP

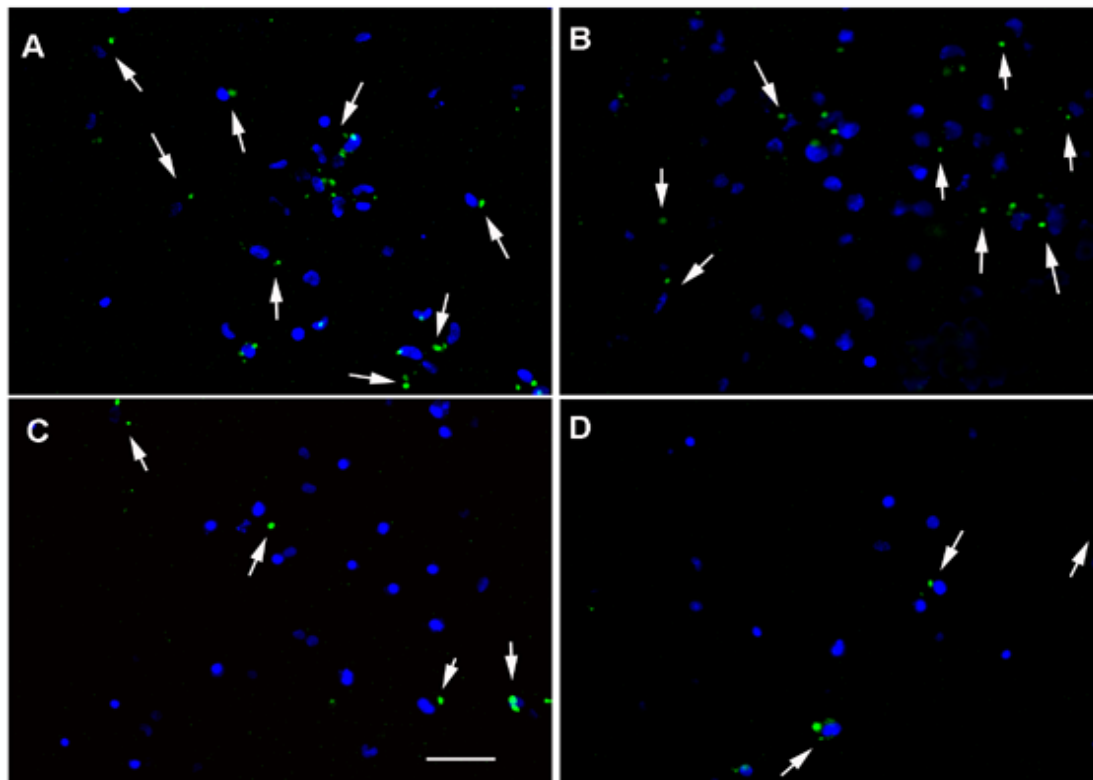
Baseando-se nas alterações nucleares observadas anteriormente entre macrófagos não infectados e infectados com *L. amazonensis* nos diferentes tratamentos (Figuras 13 A, C, E e G) e (Figuras 13 B, D, F, H) respectivamente, decidimos verificar se tais alterações estariam ligadas a presença ou não de *Leishmanias* viáveis. Para este experimento, foi utilizada a fluorescência emitida pelo parasita transfectado com GFP, excitado em luz ultravioleta, além da marcação com Hoescht em azul, dos núcleos dos macrófagos hospedeiros.

Os macrófagos infectados não tratados apresentaram a marcação de parasitas na maioria dos macrófagos do campo sendo de aproximadamente 24% das células não marcadas para *Leishmania* (Figura 14A). Já as células tratadas com ATP, apresentaram 57% das células sem marcação de *Leishmania* (Figura 14B). As células infectadas tratadas com UTP e UDP apresentaram uma redução de 86, 9% e 73% respectivamente na marcação GFP (Figuras 14C e D).

Note, que em todos os tratamentos as células em que os núcleos se encontravam retraídos não foi possível identificar a fluorescência emitida pelo GFP da *Leishmania* transfectada. Sabe-se que a perda de fluorescência do GFP poderia se dar por vários fatores, dentre eles a morte do parasita.

**Figura 14-** *Microscopia óptica de fluorescência. Em azul marcação de núcleo com Hoescht, em verde marcação GFP L. amazonensis. (A) Macrófagos Infectados, (B), (C) e (D) são macrófagos infectados tratados com os nucleotídeos (B) ATP; (C) UTP e (D)UDP. Note que com os tratamentos diminuíram as células contendo Leishmania GFP. As setas brancas apontam Leishmanias fluorescentes em verde*     *— =10µM.*

*Experimento em triplicata*



### **4.3 Apoptose Induzida por Nucleotídeos em Macrófagos Infectados com *L. amazonensis***

#### **4.3.1 Em Camundongos BALB/c**

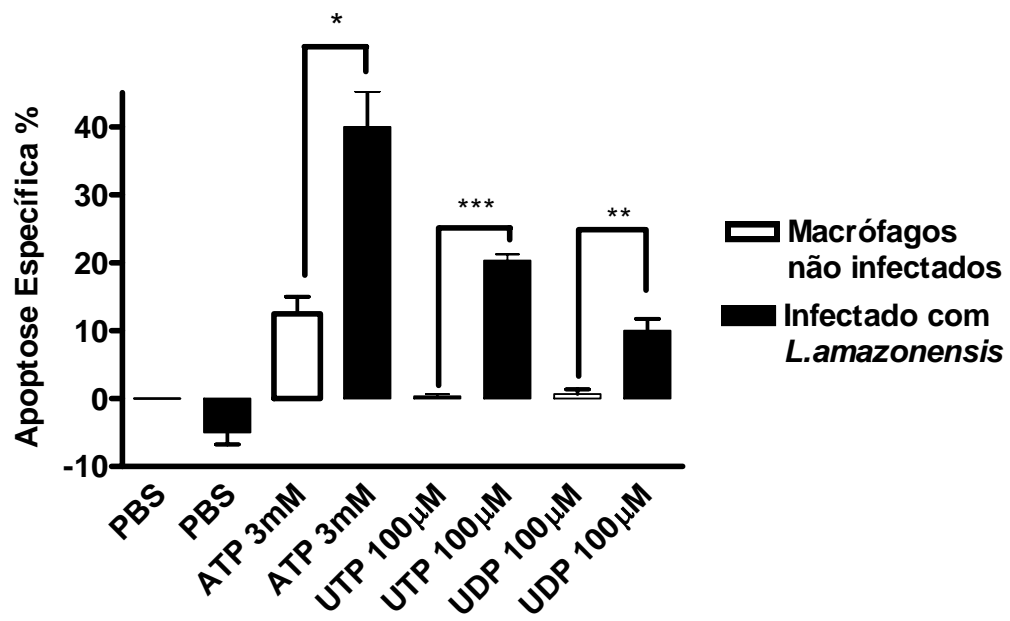
A diminuição da taxa parasitária no tratamento com ATP e UTP observada por Torres em 2003 e Chaves em 2005 vai de encontro com nossos achados em microscopia de fluorescência, com redução da marcação para *Leishmania* em macrófagos tratados com ATP, UTP e UDP. Adicionalmente, observamos que, macrófagos infectados tratados com os nucleotídeos apresentaram núcleos com características apoptóticas. A fim de confirmar se os macrófagos infectados estariam de fato, entrando em apoptose, macrófagos infectados tratados ou não, foram tratados com ATP 3mM, UTP 100 $\mu$ M e UDP 100  $\mu$ M por 30 minutos. Então, 8 horas após o tratamento, as células foram colocadas em tampão de apoptose. O material foi analisado por citometria de fluxo, onde os núcleos hipo-diplóides foram considerados apoptóticos.

Macrófagos infectados com *L. amazonensis* (Figura 15) apresentaram inibição da apoptose espontânea ( $7 \pm 2\%$ ) se comparados aos não infectados. Tal inibição seria um mecanismo de prolongamento da sobrevivência parasitária observado previamente por outros autores (LISI E COLS 2005; NGUEWA E COLS 2004; OUAISSI E COLS 2003; DEBRABANT E COLS 2003). Por outro lado, macrófagos não infectados tratados com ATP apresentaram ( $13 \pm 3\%$ ) de apoptose específica, enquanto macrófagos infectados apresentaram uma apoptose ainda maior, ( $40 \pm 6\%$ ) sendo 27% a mais que macrófagos não infectados tratados com a mesma concentração de ATP.

O tratamento com UTP não foi capaz de induzir apoptose em macrófagos não infectados, mas o UTP induziu ( $20 \pm 1\%$ ) de apoptose específica em macrófagos infectados (Figura 15).

O tratamento com UDP, como o do UTP, não induziu apoptose em macrófagos não infectados, mas resultou também em indução de ( $10 \pm 2\%$ ) de apoptose em macrófagos infectados com *L. amazonensis* (Figura 15).

**Figura 15-** Apoptose Induzida por Nucleotídeos em Macrófagos de Camundongos BALB/c Infectados com *L. amazonensis*. Os macrófagos infectados por 30 horas foram expostos ao ATP, UTP e UDP por 40 minutos. As células foram incubadas com tampão de apoptose. Média de 4 experimentos independentes em triplicata \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*  $p < 0,0001$ .



#### 4.3.2. Apoptose Em Camundongos P2X<sub>7</sub><sup>+/+</sup> e P2X<sub>7</sub><sup>-/-</sup>

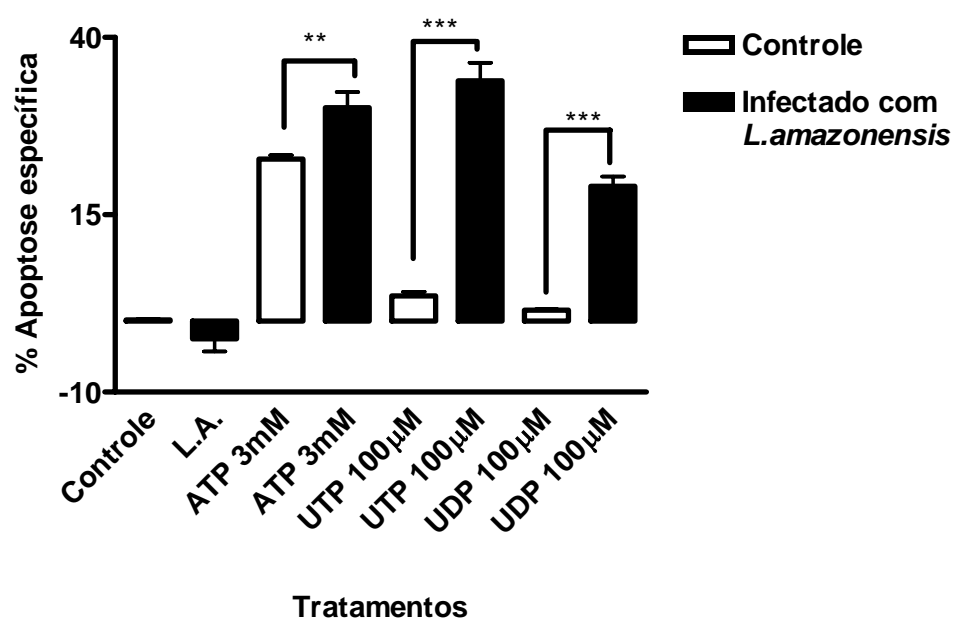
A apoptose induzida por ATP, UTP e UDP em macrófagos infectados sugerem que receptores P2 estariam sendo expressos ampliadamente somente na infecção. Sabendo-se que o receptor P2X<sub>7</sub> encontra-se envolvido no controle da infecção de diferentes agentes parasitários (COUTINHO-SILVA, NO PRELO), realizamos ensaios de apoptose em macrófagos de animais P2X<sub>7</sub><sup>+/+</sup> e P2X<sub>7</sub><sup>-/-</sup> originados da cepa de C57BL6 infectados ou não com *L. amazonensis*. Os macrófagos peritoneais de camundongos C57BL6 P2X<sub>7</sub><sup>+/+</sup> (Figura 6) infectados apresentaram redução da apoptose espontânea ( $3 \pm 2\%$ ) assim como observado em células de animais BALB/c (Figura 15). Os macrófagos tratados com ATP a 3mM apresentaram indução de apoptose específica ( $23,0 \pm 0,5\%$ ) e os macrófagos infectados que receberam o mesmo tratamento ( $30 \pm 2\%$ ). Entre infectados e não infectados, observamos um aumento de 7% da apoptose específica. Novamente, como observado em macrófagos de camundongos BALB/c, as células tratadas com UTP a 100  $\mu$ M não apresentaram apoptose. Entretanto, os macrófagos infectados quando tratados com este nucleotídeo apresentam apoptose específica ( $34 \pm 3\%$ ) (Figura 16). O tratamento com UDP a 100 $\mu$ M, assim como no tratamento com UTP, não induziu apoptose em células não infectadas, mas somente em células infectadas ( $19 \pm 1\%$ ). Tais resultados se pareiam aos resultados obtidos em células de camundongo BALB/c, mostrando que inicialmente o *background* genético não influenciaria na indução da apoptose por UTP e UDP em nosso modelo de infecção.

Nos macrófagos de camundongos P2X<sub>7</sub><sup>-/-</sup> (Figura 17) infectados, houve redução da apoptose espontânea ( $3 \pm 2\%$ ) assim como em células de animais BALB/c e P2X<sub>7</sub><sup>+/+</sup> (Figura 15 e 16). Os macrófagos tratados com ATP 3mM não apresentaram apoptose tanto em células

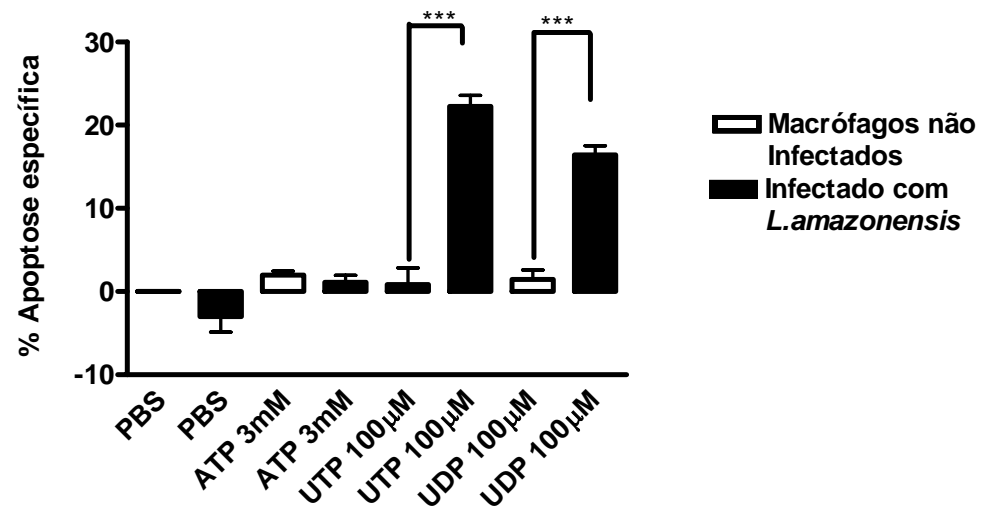


não infectadas como infectadas, em oposição aos resultados anteriores obtidos em camundongos C57BL6 selvagens e BALB/c. Este resultado confirma o ATP como indutor da apoptose exclusivamente através do receptor P2X<sub>7</sub>. Tal dado descarta a possibilidade de outros receptores P2 responsivos ao ATP estarem atuando na apoptose induzida por ATP em macrófagos. Entretanto, macrófagos infectados, e não os macrófagos não infectados, entraram em apoptose na presença de UTP e UDP, de forma similar ao observado previamente em macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL6 selvagem. Em células de camundongo P2X<sub>7</sub><sup>-/-</sup> infectadas, o UTP a 100 μM induziu apoptose específica de 22 ± 1% , enquanto no UDP a apoptose específica foi de 16 ± 1%. Estes resultados reforçam a hipótese de que outros receptores P2, além do receptor P2X<sub>7</sub>, responsivos somente para UTP e UDP mas não a ATP são modulados positivamente na infecção por *L. amazonensis*, contribuindo para a idéia de receptores pirimidinérgicos.

**Figura 16-** *Apoptose Induzida por Nucleotídeos em Macrófagos de camundongos C57BL6 infectados com L. amazonensis. Os macrófagos infectados por 30 horas foram expostos ao ATP, UTP e UDP por 40 minutos. As células foram incubadas com tampão de apoptose. Média de 3 experimentos independentes triplicata \*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*  $p < 0,0001$ .*

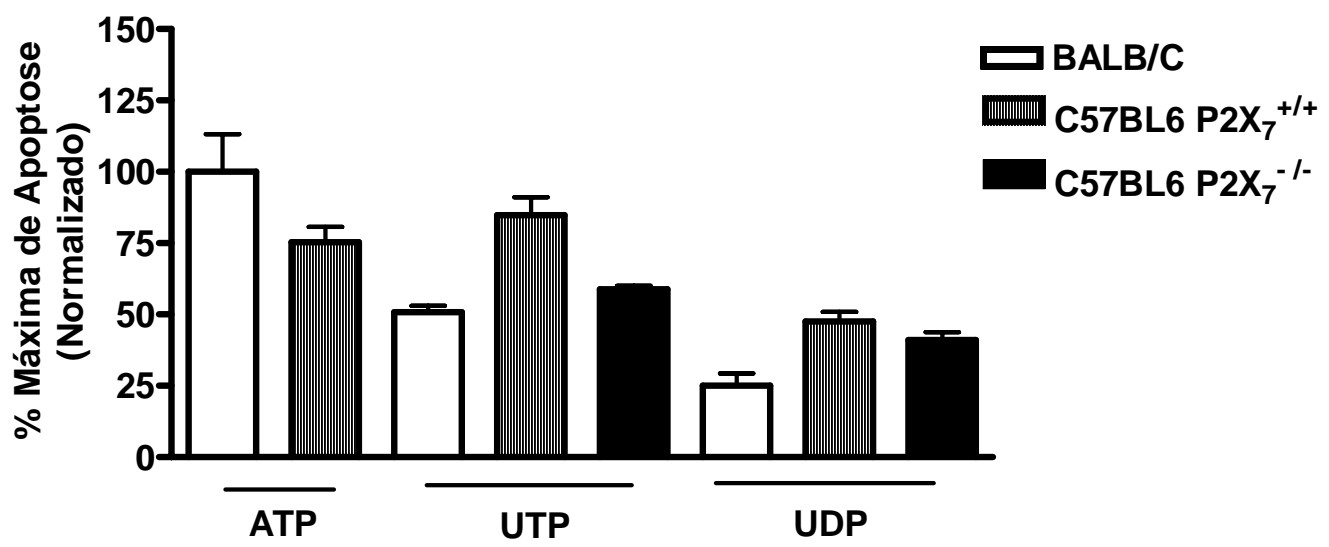


**Figura 17-** Apoptose Induzida por Nucleotídeos em Macrófagos de camundongos C57BL6 KOP2X<sub>7</sub> infectados com *L. amazonensis*. Média de 3 experimentos independentes triplicata  
\*\*\*  $p < 0,0001$ .



Os índices máximos de apoptose obtidos com ATP, UTP e UDP em macrófagos infectados de camundongos de diferentes cepas apresentam diferenças significativas consistentes com a idéia de diferentes modelos de resistência à infecção (Figura 18). Análises dos índices máximos de morte em todos animais, mostram que macrófagos de camundongos BALB/c são mais sensíveis a apoptose induzida por ATP que células de camundongo C57BL6 selvagem. Na apoptose induzida por UTP, animais C57BL6 selvagens são mais susceptíveis, enquanto animais BALB/c e  $P2X_7^{-/-}$  possuem a mesma sensibilidade a este nucleotídeo. Na apoptose induzida por UDP, animais C57BL6 selvagens são mais sensíveis que C57BL6  $P2X_7^{-/-}$ , sendo os macrófagos de camundongos BALB/c menos responsivos a este nucleotídeo (Figura 18).

**Figura 18-** *Comparação da porcentagem máxima de apoptose induzida em macrófagos infectados, por diferentes nucleotídeos. Apoptose induzida por ATP a 3mM em BALB/c foi a resposta máxima obtida. Nesta figura o ATP 3mM em camundongos BALB/c é considerado como 100% para a normalização dos demais pontos. N= 3 experimentos independentes em triplicata*





#### 4.4 Curvas Dose- Resposta na Apoptose

Na tentativa de melhor identificação dos receptores P2 envolvidos no fenômeno da apoptose induzida por nucleotídeos durante a infecção com *L. amazonensis*, foram realizados experimentos de quantificação de apoptose com concentrações crescentes de ATP (1 $\mu$ M a 5mM), UTP (0,1 $\mu$ M a 500 $\mu$ M) e UDP (0,05 $\mu$ M a 500 $\mu$ M) em macrófagos peritoneais infectados ou não.

As curvas dose-resposta obtidas para ATP em macrófagos infectados e não infectados foram qualitativamente diferentes. A resposta da apoptose induzida por ATP em macrófagos não-infectados teve seu início na concentração de 500 $\mu$ M e saturação em 3mM com EC<sub>50</sub> de 800  $\mu$ M (Figura 19A). Por outro lado, os macrófagos infectados se mostram mais sensíveis ao tratamento com ATP iniciando a resposta com 50 $\mu$ M e saturando em 1mM com EC<sub>50</sub> de 80 $\mu$ M.

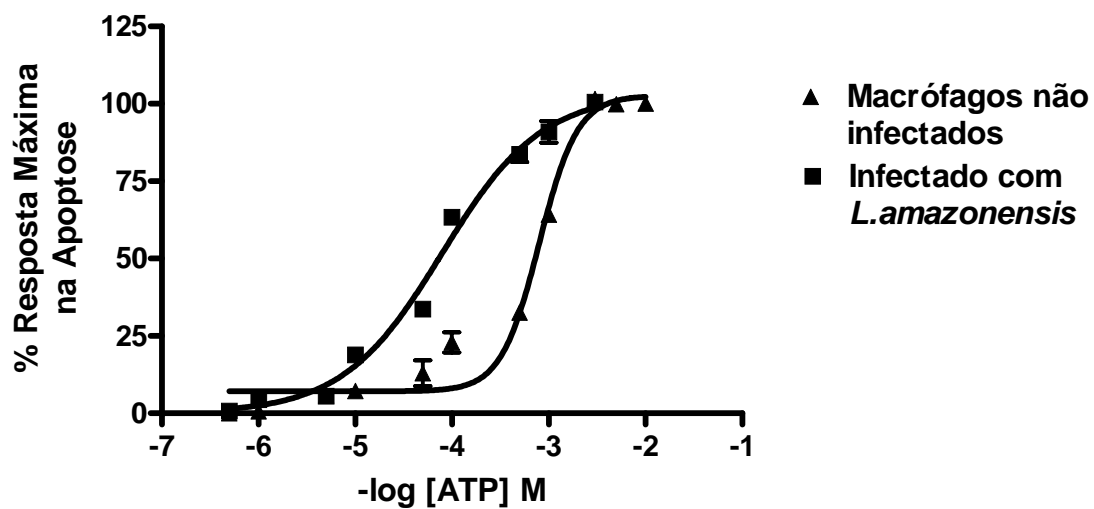
A curva dose- resposta de apoptose induzida por UTP mostra que macrófagos não-infectados não entram em apoptose em nenhuma das concentrações testadas deste nucleotídeo (Figura 19B). Entretanto, os macrófagos infectados apresentaram apoptose de forma dose-dependente, sendo 5 $\mu$ M a menor concentração responsiva a este nucleotídeo, e seu ponto de saturação em 100  $\mu$ M de UTP com um EC<sub>50</sub> de 10 $\mu$ M (Figura 19B).

A curva dose-resposta obtida ao UDP mostra que macrófagos não-infectados não entram em apoptose em nenhuma das concentrações testadas (Figura 19C). Contudo, como observado para o UTP, os macrófagos infectados apresentaram apoptose de forma dose-dependente ao UDP sendo sua resposta também iniciada na concentração de 10 $\mu$ M e saturada em 100 $\mu$ M sendo seu EC<sub>50</sub> de 20 $\mu$ M (Figura 19C). A comparação das curvas obtidas nas figuras 19B e 19C sugere que no estímulo apoptótico, os receptores envolvidos na resposta ao UTP e UDP

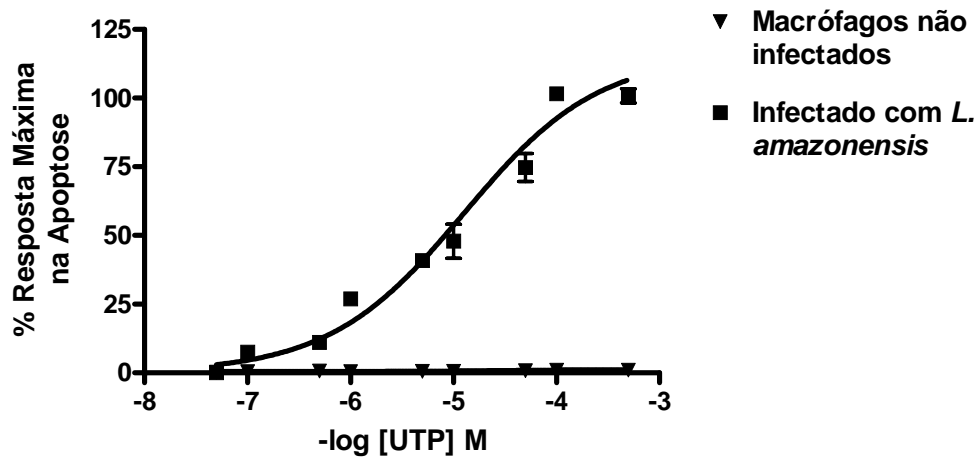
parecem agir de forma similar no que concerne a sua concentração de saturação e a concentração sensibilizante inicial.

**Figura 19-** Curva dose-resposta na apoptose. Os macrófagos infectados por 30 horas foram expostos ao ATP, UTP e UDP por 40 minutos. As células foram incubadas com tampão de apoptose. (A) ATP (B) UTP (C) UDP). Média de 6 experimentos independentes em triplicata

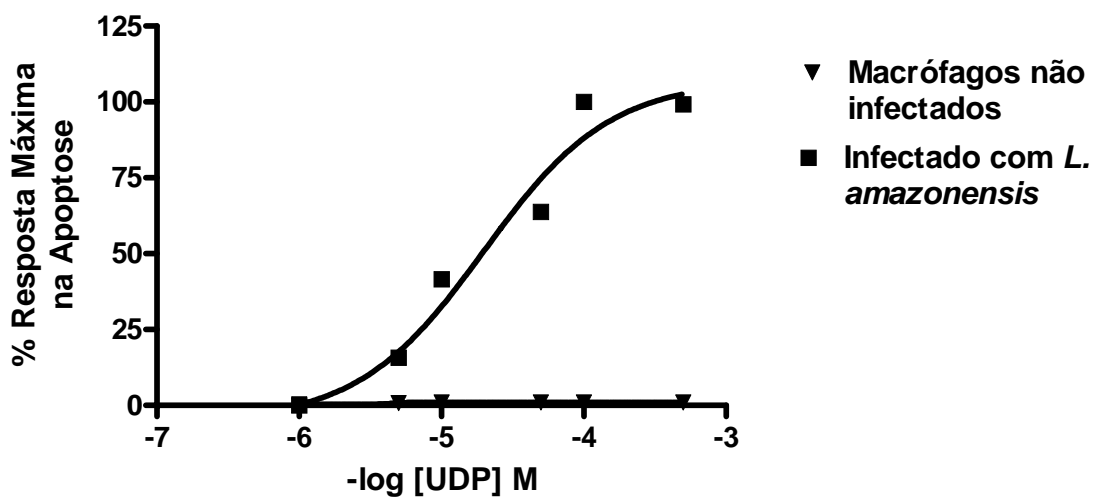
A



B



C



#### 4.5 Uso de Antagonistas de Receptores P2 na Apoptose Induzida por Nucleotídeos

Como já descrito, os nucleotídeos ATP, UTP e UDP induzem apoptose em macrófagos infectados com *L. amazonensis*, mas os receptores P2 envolvidos neste fenômeno ainda não foram completamente caracterizados. Para melhor identificar os receptores envolvidos na apoptose induzida por ATP, UTP e UDP, foram realizados experimentos com antagonistas de alguns receptores P2 como Suramina, PPADS e ATP oxidado. Após a infecção, as células permaneceram em repouso por 36 horas, quando então foram pré- tratadas com os antagonistas Suramina a 100 $\mu$ M, PPADS a 100 $\mu$ M e ATP oxidado a 300 $\mu$ M , quando então foram tratadas por 30 minutos com os nucleotídeos, lavadas e mantidas na estufa em repouso por mais 8 horas, para então serem avaliadas quanto a presença de células hipodiplídes. (Figura 20).

Em macrófagos não-infectados (Figura 20A), a apoptose induzida por ATP não foi inibida pela suramina, indicando a possível exclusão dos receptores P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub> e P2Y<sub>11</sub> na apoptose induzida por ATP. O PPADS na presença de ATP promoveu uma inibição de aproximadamente 75% da apoptose, mesmo possuindo citotoxicidade espontânea inicial. A inibição por parte do PPADS indica como responsável pela apoptose o receptor P2X<sub>7</sub>.

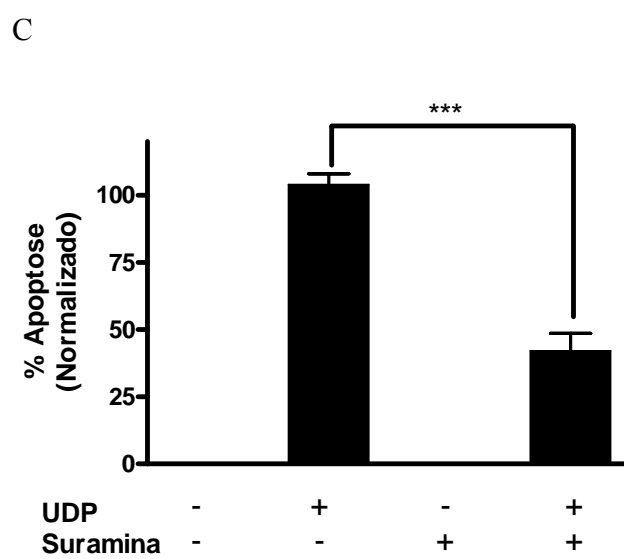
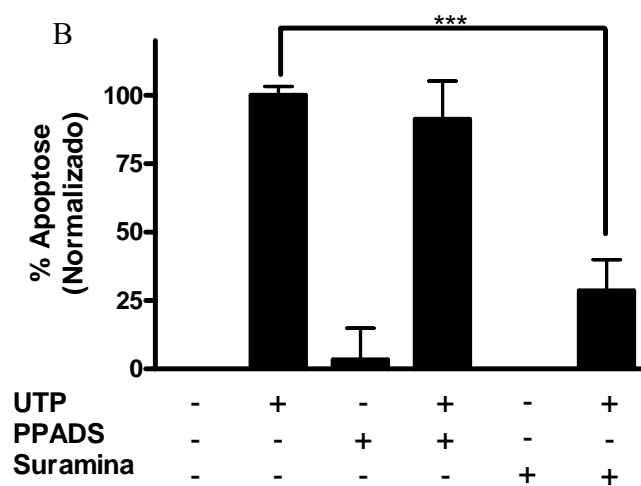
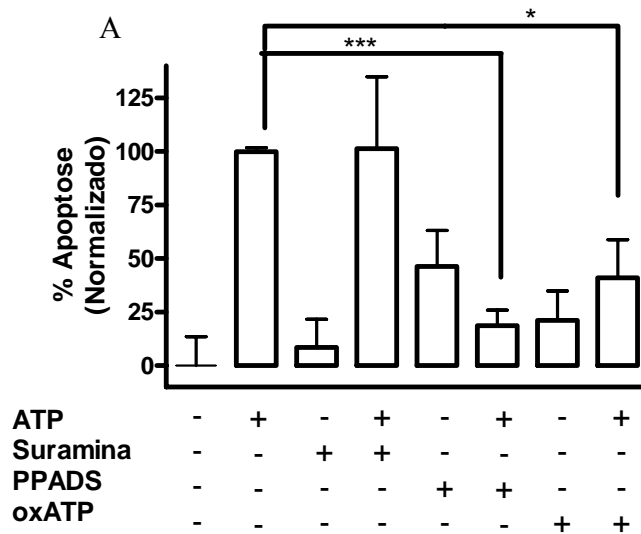
O oxATP também promoveu inibição da apoptose em aproximadamente 70%, ratificando o receptor P2X<sub>7</sub> como responsável pela apoptose induzida por ATP. Em macrófagos infectados, o PPADS não apresentou nenhum efeito de inibição na resposta ao UTP, enquanto a suramina inibiu a apoptose em aproximadamente 70% na apoptose induzida por UTP (Figura 20B). Sabendo-se que a suramina é antagonista dos receptores P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>,

P2X<sub>5</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub> e P2Y<sub>11</sub>, estes podem ser possíveis candidatos a apoptose em macrófagos infectados induzida por UTP.

Entretanto, os receptores P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>5</sub>, e P2Y<sub>11</sub> não são ativados por UTP, restando como candidatos a apoptose induzida por UTP em células infectadas os receptores P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>6</sub>.

Quanto a apoptose induzida por UDP em macrófagos infectados, a suramina promove inibição da apoptose em 55%, apresentando um patamar diferente do UTP com o mesmo antagonista (Figura 20C).

**Figura 20-** *Antagonistas de receptores P2 na Apoptose induzida por nucleotídeos. (A) Macrófagos não-infectados tratados com ATP 3mM (B) Macrófagos Infectados com L. amazonensis tratados com UTP 100µM (C) Macrófagos Infectados com L. amazonensis tratados com UDP a 100 µM. Suramina a 100 µM, PPADS a 100 µM e ATP oxidado a 300 µM. Média S.E.M. de experimentos independentes feitos em triplicata. \*  $p < 0.05$ , e \*\*\*  $p < 0,0001$ .*



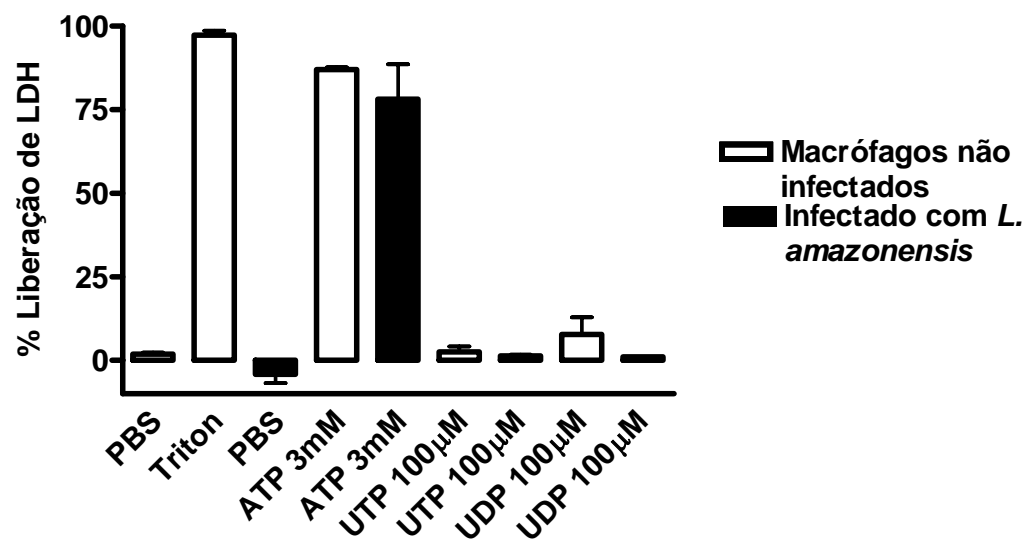


#### **4.6 Avaliação do Possível Efeito Indutor de Necrose no Tratamento de Macrófagos com ATP, UTP e UDP**

Os resultados obtidos nos ensaios de apoptose indicam ocorrência de morte celular de macrófagos infectados no tratamento com ATP, UTP e UDP. Para avaliar se a morte observada anteriormente se daria somente por apoptose, ou um misto de necrose e apoptose, foram realizados ensaios de liberação da enzima Lactato Dehidrogenase (LDH). Esta enzima se encontra liberada em processos de morte por perda de integridade de membrana, logo morte por necrose. Os macrófagos foram obtidos e infectados conforme o protocolo do experimento de apoptose e receberam exatamente o mesmo tratamento.

Os dados obtidos (Figura 21) mostram a liberação de LDH em células tratadas com ATP 3mM tanto em macrófagos infectados (75%) quanto em macrófagos não infectados (85%). Comparando-se com os não infectados, o ATP induz uma liberação de  $85 \pm 1\%$  da liberação máxima de LDH. Os nucleotídeos UTP e UDP a 100 $\mu$ M não provocaram a liberação de LDH tanto em macrófagos infectados como não infectados, sugerindo que a morte de macrófagos induzida por estes nucleotídeos seria por uma via apenas de apoptose.

**Figura 21-** Ensaio de liberação de LDH em macrófagos infectados ou não com *L. amazonensis*. Os macrófagos infectados por 30 horas foram expostos ao ATP, UTP e UDP por 40 minutos. As células foram incubadas com MTT. Média de 2 experimentos independentes em triplicata.



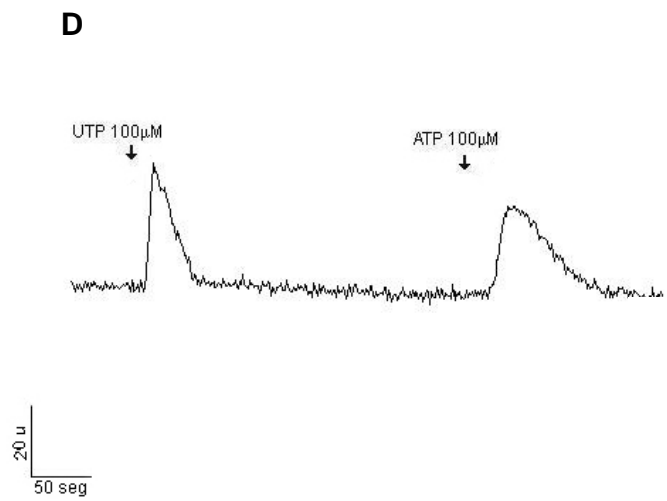
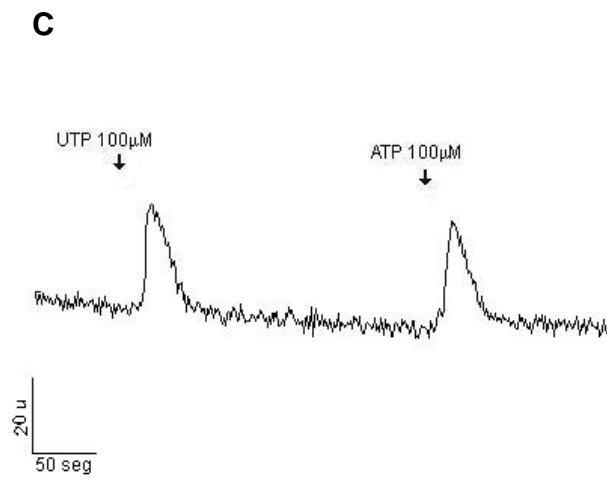
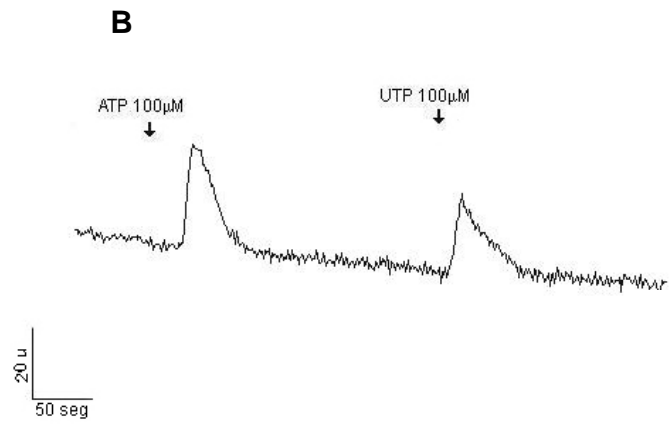
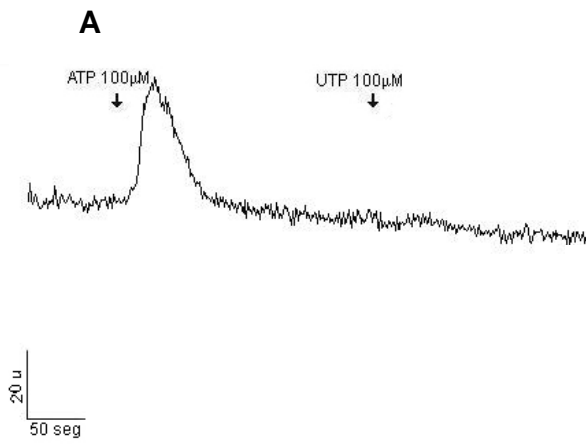
#### **4.7 Alteração do Recrutamento de Cálcio Intracelular Induzido por Nucleotídeos após Infecção por *Leishmania***

Devido à ação anti-leishmania do UTP e ATP no tratamento de camundongos infectados com *L. amazonensis*, observado por Torres-Santos (2003) e Chaves (2005), buscou-se avaliar a ação funcional de receptores P2 na membrana de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c não-infectados e infectados. Para a medição de cálcio foi utilizado o corante fluorescente FURA-2, que se complexa ao cálcio, e também foi utilizado Probenicid, um inibidor de transportador de membrana, para impedir a extrusão do FURA-2 do meio intracelular durante o tempo de incubação. Após os 40 minutos de incubação, as lamínulas foram lavadas e transferidas para o microscópio. Então, as células receberam ATP e UTP em forma de bolus (100 $\mu$ M em um minuto), sendo os intervalos entre as aplicações de 4 minutos em todas as situações.

Ao aplicarmos ATP a 100 $\mu$ M seguido de UTP a 100 $\mu$ M (seqüência 1), foram observadas respostas bem diferentes nos dois grupos estudados: macrófagos não infectados responderam ao ATP com variação transiente de cálcio sendo que o UTP não induziu resposta (Figura 22A), enquanto macrófagos infectados apresentaram resposta transiente de cálcio para ambos os nucleotídeos (ATP e UTP) (Figura 22B). Ao invertermos as seqüências de pulsos de nucleotídeos, isto é, aplicação de UTP seguida da aplicação de ATP (seqüência 2), a resposta com variação de cálcio transiente se dá para ambos os nucleotídeos tanto em macrófagos não infectados (Figura 22C) quanto em macrófagos infectados (Figura 22D). Buscando a razão de tal mudança, uma hipótese seria de que a fagocitose de *Leishmania* fosse responsável pelo efeito observado. Para tanto, realizamos experimentos de fagocitose de látex *beads* e óleo

mineral Nujol em macrófagos e avaliamos a modulação de receptores P2 por diferentes metodologias. A fagocitose de óleo mineral mostrou-se capaz de modular negativamente o receptor P2X<sub>7</sub> e estes resultados são melhor descritos no ANEXO 1. Já na fagocitose com *beads* de látex. Os macrófagos que fagocitaram as *beads* de látex (Figuras 23 A e B) apresentaram o mesmo padrão de resposta que os que não fagocitaram, ou seja, na seqüência 1 de aplicação a resposta transiente de cálcio somente ao ATP e não ao UTP. Na seqüência 2 de aplicação, foram observadas respostas transientes a ambos nucleotídeos, o mesmo padrão de resposta obtido na seqüência 2 de aplicação em células que não fagocitaram.

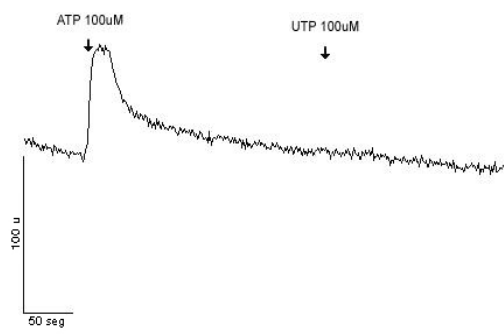
**Figura 22-** *Medições de Cálcio Intracelular. As células foram infectadas por 48 horas em lamínulas de vidro, então incubadas com FURA-2 por 40 minutos e postas sob perfusão. (A e C) Macrófagos controle; (B e D) Macrófagos infectados com L. amazonensis. u =unidades de fluorescência (escala arbitrária) seg = segundos. Traçados representativos de 5 experimentos independentes para cada situação experimental.*



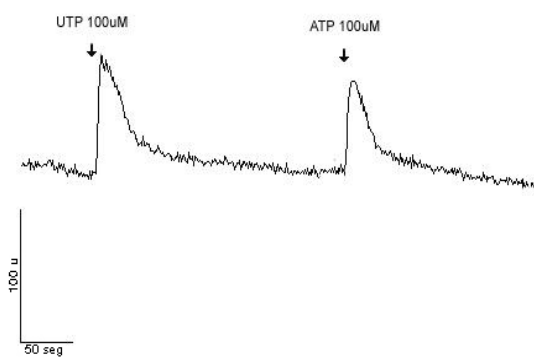
**Figura 23-** *Medições de Cálcio Intracelular. (A e B) Macrófagos que fagocitaram partículas de látex. u =unidades de fluorescência (escala arbitrária) seg = segundos. Traçados representativos de 3 experimentos independentes para cada situação experimental.*



**A**



**B**



O tempo entre o início e o pico máximo de resposta ( $T/2$ ) da variação de cálcio intracelular por ATP e UTP foram analisados (sumarizada na Tabela 6). Observou-se que, o  $T/2$  (Tabela 6) do ATP na seqüência 1 nos macrófagos não infectados é maior ( $26 \pm 3s$ ) que em macrófagos infectados ( $14,0 \pm 0,5s$ )  $p < 0,05$ . O  $T/2$  da resposta ao ATP ( $26 \pm 3s$ ) na seqüência 1 em macrófagos não infectados, maior que em macrófagos infectados, sugere a possível ativação de tanto receptores P2X quanto P2Y igualmente responsivos a este nucleotídeo.

Nos macrófagos infectados, na seqüência 1 de aplicação, o  $T/2$  ao UTP foi de  $7,63 \pm 0,04s$ , metade do  $T/2$  obtido com ATP (Tabela 6). Como esta resposta foi observada apenas nos macrófagos infectados, pode-se indicar a presença de receptores P2Y na infecção não responsivos ao ATP.

Na seqüência 2 (aplicação de UTP seguida de ATP) não se observou diferença no  $T/2$  da variação de cálcio para UTP entre os macrófagos não infectados ( $17 \pm 7s$ ) e infectados ( $14 \pm 3s$ ) entretanto, o  $T/2$  da resposta ao ATP tende a ser maior em infectados ( $39 \pm 12s$ ) que em não infectados ( $18 \pm 7s$ ).

A amplitude de resposta nas seqüências 1 e 2 em macrófagos controle e infectados não apresentou variação estatística. Portanto, as situações das figuras 22A e 22B, que mostram respectivamente a resposta somente ao ATP em células não infectados, e resposta a ambos nos infectados, sugere que a situação de infecção possivelmente estaria apresentando um quadro de receptores funcionais na membrana diferente dos não infectados. Ao observarmos as figuras 22C e 22D pode-se dizer que os receptores P2Y estariam sendo sensibilizados com o UTP, mas que ainda existiriam receptores seletivos a ATP responsivos na membrana,

provavelmente os receptores P2X são expressos tanto em macrófagos não infectados como em macrófagos infectados.

**Tabela 6-** Tempo de resposta aos nucleotídeos. Tempo de duração da resposta aos nucleotídeos. *Seqüência 1: ATP 100 $\mu$ M seguido de UTP100 $\mu$ M , Seqüência 2: UTP seguido de ATP. Tempo em segundos, s = segundos, Média  $\pm$ SEM N=5 Teste t foi utilizado  $**p<0.001$ .*

Situação	Nucleotídeos			
	Seqüência 1		Seqüência 2	
	ATP 100 $\mu$ M	UTP 100 $\mu$ M	UTP 100 $\mu$ M	ATP 100 $\mu$ M
<b>Controle (s)</b>	26 $\pm$ 3	-	17 $\pm$ 7	18 $\pm$ 7
<b>Infectado (s)</b>	14.4 $\pm$ 0.5**	7.63 $\pm$ 0.04	14 $\pm$ 3	39 $\pm$ 12

#### 4.8 Curva dose-resposta de variação de cálcio intracelular por ATP , UTP e UDP

Os dados até então obtidos neste trabalho mostram que nucleotídeos extracelulares agem de forma diferenciada em células infectadas com *L. amazonensis*, inclusive na dinâmica de mobilização de cálcio intracelular em resposta a estes nucleotídeos. Sabendo-se que mais de um receptor P2 responde ao ATP e também ao UTP em macrófagos, os nucleotídeos ATP, UTP, e UDP foram aplicados em diferentes concentrações e a resposta de variação de cálcio intracelular foi medida. Isto permitiu traçar curvas dose-resposta para aos nucleotídeos nas duas situações estudadas (macrófagos não infectados e infectados com *L. amazonensis*).

Como mostrado na figura 24A não foi observada diferença de sensibilidade entre macrófagos não infectados e infectados tratados com ATP, uma vez que as curvas obtidas se encontram na mesma faixa logarítmica, sendo o EC<sub>50</sub> encontrado de 1µM em macrófagos controle e infectados (Figura 24A). As curvas obtidas apresentam características diferentes de curvatura o que poderia indicar tanto aumento de expressão do receptor envolvido, como a presença de um receptor adicional também responsivo ao ATP nestas concentrações, ou até mesmo, os mesmos receptores atuando de maneiras diferentes devido a interação com moléculas oriundas da infecção com *L. amazonensis*. Os macrófagos infectados com *L. amazonensis* apresentaram um amplitude de resposta inferior em comparação com macrófagos não-infectados (Figura 24B) mostrando que a infecção inibiu o recrutamento de cálcio induzido por ATP.

As curvas dose-respostas da variação de cálcio para em ambas situações (macrófagos não-infectados e infectados com *L. amazonensis*), apresentam as mesmas inclinações. Isso sugere que ambas situações seriam relacionadas ao mesmo receptor responsivo, entretanto, observou-se um aumento de sensibilidade de um log ao UTP com desvio para a esquerda na curva dose *versus* resposta nos macrófagos infectados, em relação aos macrófagos não infectados (Fig 25C). O EC<sub>50</sub> encontrado para os macrófagos não infectados foi de 7 μM e em macrófagos infectados 0,7μM. Diferente do tratamento com ATP (Figura 25A), a amplitude de resposta a liberação de cálcio intracelular com UTP em macrófagos infectados com *L. amazonensis* é maior que em macrófagos não-infectados (Figura 25B).

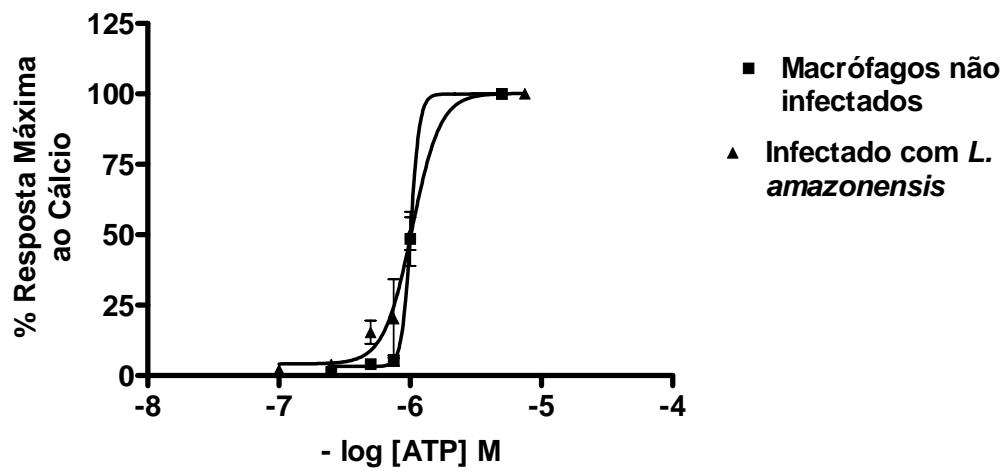
Na curva dose- resposta obtida com o UDP, ambas situações (macrófagos controle e infectados com *L. amazonensis*) apresentaram curvas de inclinações parecidas e com a mesma faixa de variação, ambas com EC<sub>50</sub> de 4μM. Como observado no tratamento com ATP (Figura 26A) o tratamento com UDP recrutou menos cálcio nas células infectadas que nas células não infectadas(Figura 26 B).

A mobilização de cálcio máxima obtida em resposta a cada nucleotídeo foi diferente entre macrófagos infectados ou não (Figura 27). No tratamento com ATP, a mobilização de cálcio máxima obtida em macrófagos infectados foi aproximadamente 50% menor que não-infectados. Resultado similar foi obtido no tratamento com UDP, com redução de 50% da mobilização máxima de cálcio em macrófagos infectados na comparação com não infectados. Entretanto, no tratamento com UTP os macrófagos infectados mobilizaram 60% a mais de cálcio que os macrófagos não infectados. O aumento ou diminuição de recrutamento de cálcio não infectados e infectados em resposta aos diferentes nucleotídeos indica que a infecção por *Leishmania* modula receptores que respondem de maneiras diferenciadas a infecção.

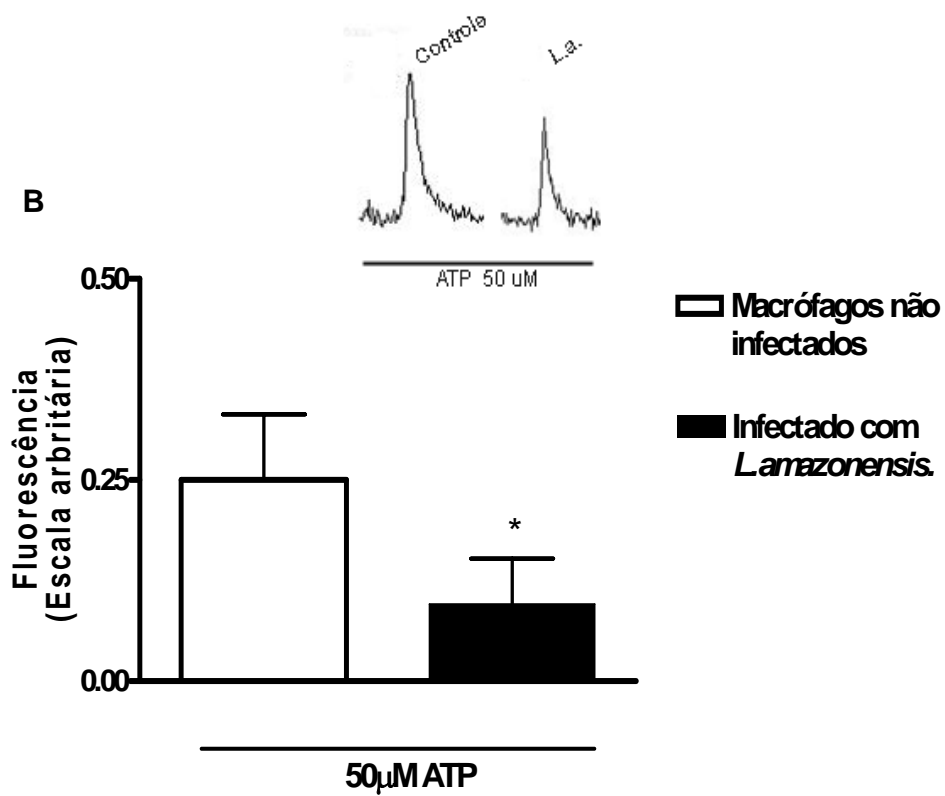
**Figura 24** - (A) Curva dose-resposta da mobilização de cálcio ao ATP em macrófagos não infectados e Infectados com *L. amazonensis*. (B) Comparação de amplitudes de fluorescência na resposta ao cálcio. As células foram infectadas por 48 horas em lamínulas de vidro, então incubadas com FURA-2 por 40 minutos e postas sob perfusão. N= 6 Experimentos em triplicata \*  $p < 0.05$ .



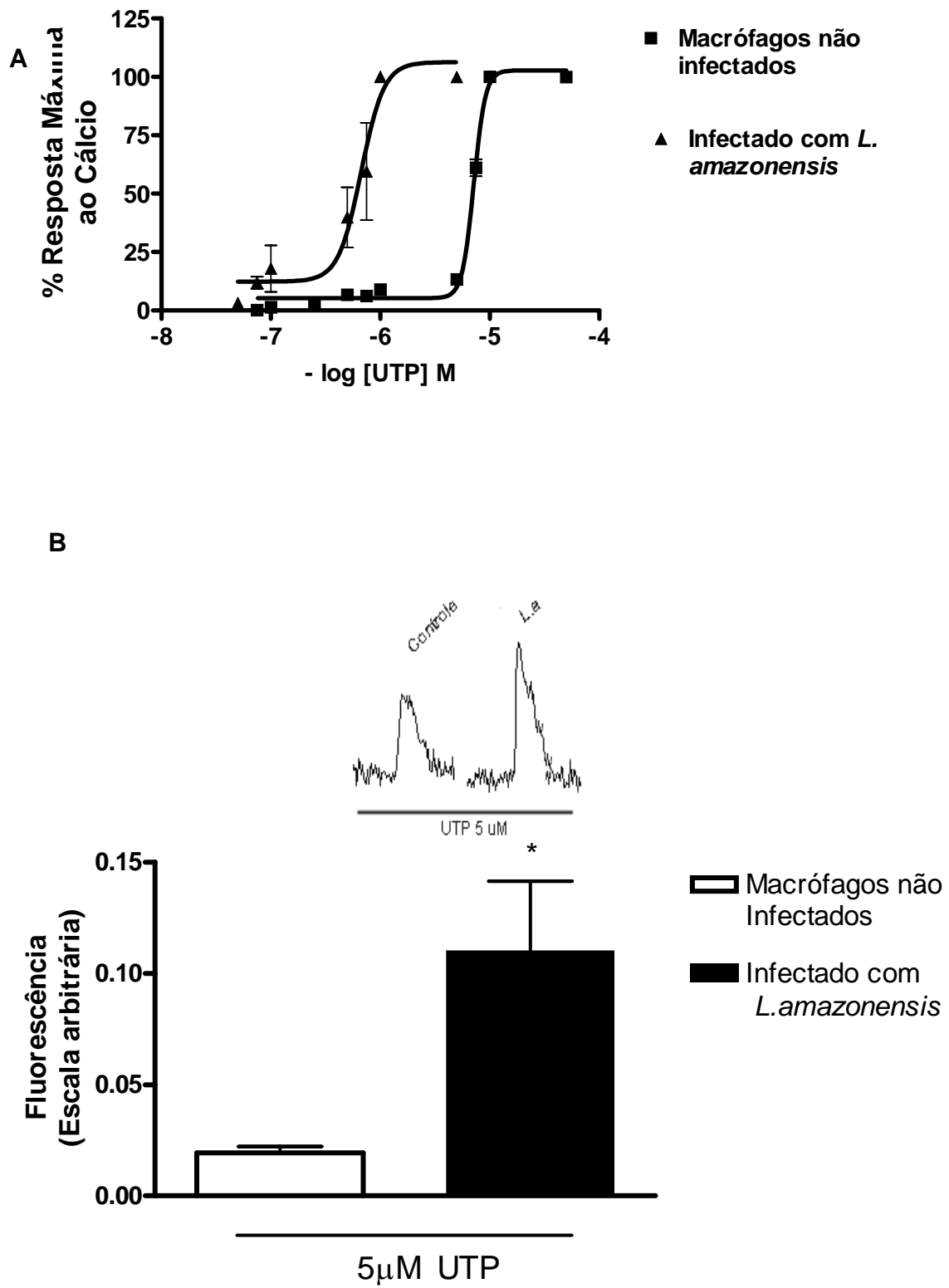
A



B

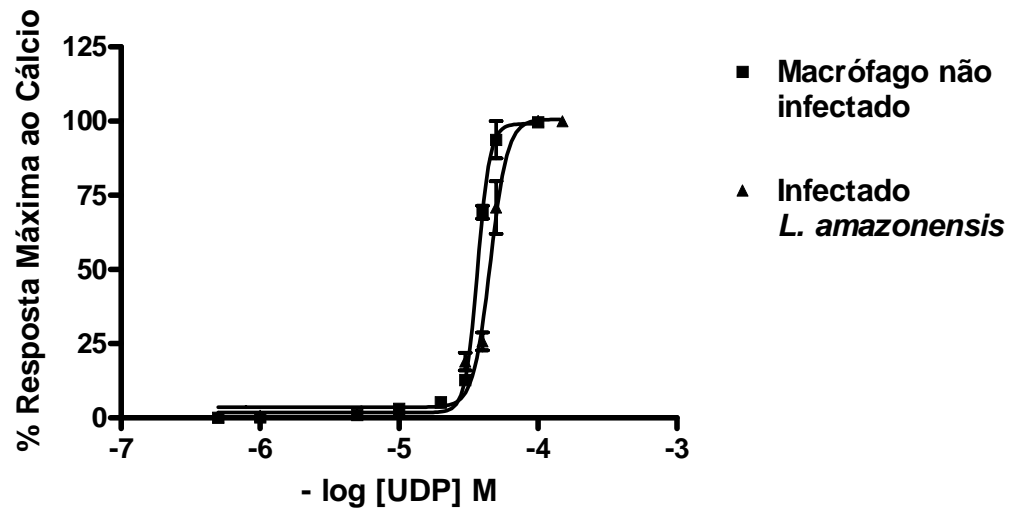


**Figura 25** - (A) Curva dose-resposta da mobilização de cálcio ao UTP em macrófagos não infectados e Infectados com *L. amazonensis*. (B) Comparação de amplitudes de fluorescência na resposta ao cálcio. As células foram infectadas por 48 horas em lamínulas de vidro, então incubadas com FURA-2 por 40 minutos e postas sob perfusão. N= 6 Experimentos em triplicata \*  $p < 0.05$ .

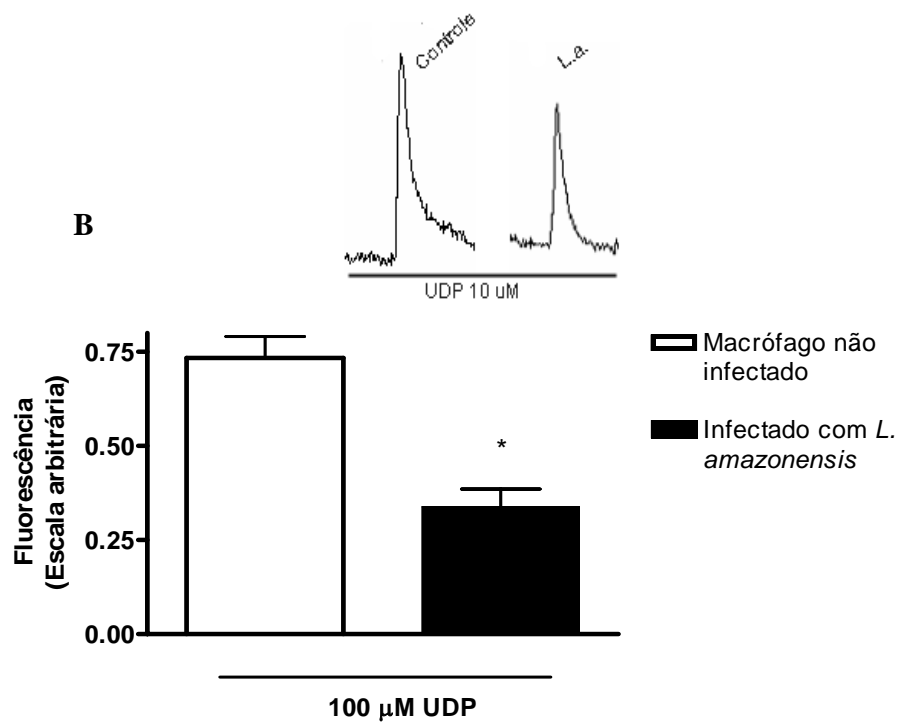


**Figura 26-** (A) Curva dose-resposta da mobilização de cálcio ao UDP em macrófagos não infectados e Infectados com *L. amazonensis*. (B) Comparação de amplitudes de fluorescência na resposta ao cálcio As células foram infectadas por 48 horas em lamínulas de vidro, então incubadas com FURA-2 por 40 minutos e postas sob perfusão.. N= 6 Experimentos em triplicata \*  $p < 0.05$ .

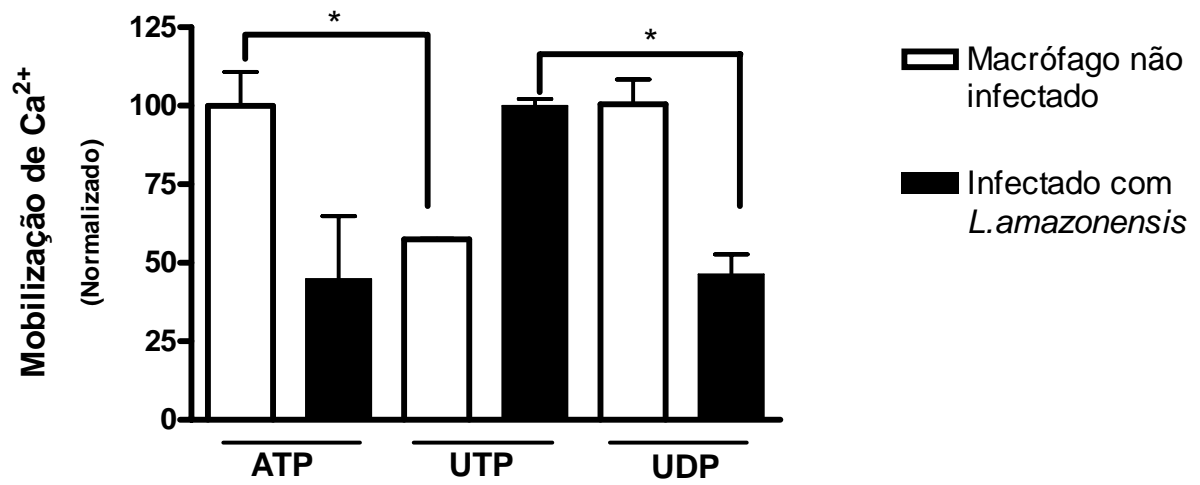
A



B



**Figura 27-** *Comparação da mobilização máxima de cálcio entre macrófagos não infectadas e infectados. N=3 experimentos independentes em triplicata \* p<0.05.*



#### 4.9 Variação de Cálcio Intracelular em Perfusão contínua de ATP

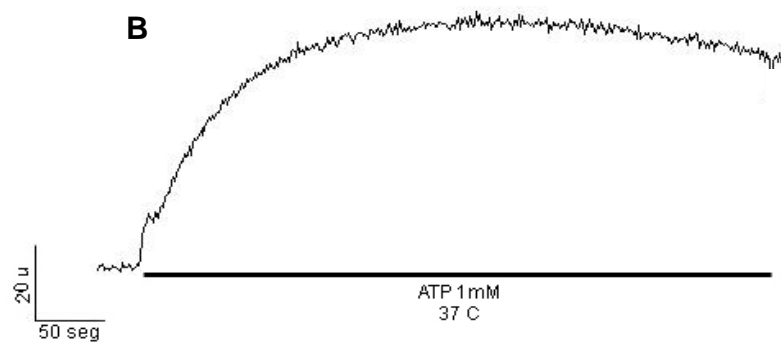
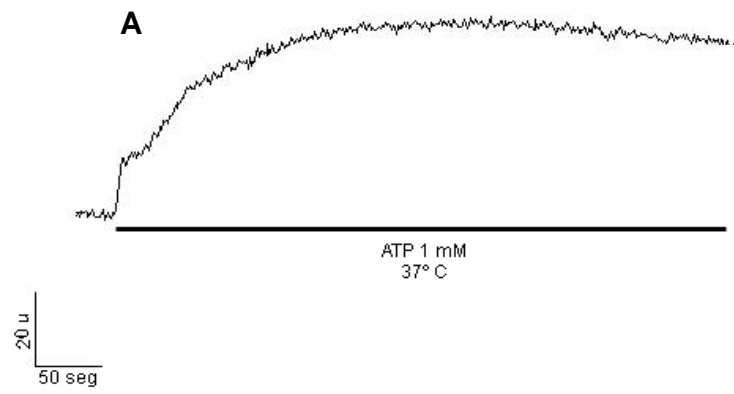
Os macrófagos infectados ou não, em lamínulas de vidro, foram incubados com FURA-2 AM e Probenicid (como descrito anteriormente) e postas em perfusão contínua por 500 segundos com uma solução de ATP a 1mM em solução salina PBS suplementado com  $\text{Ca}^{2+}$  a 1mM, sendo mantida a 37 °C.

Os registros obtidos nas situações macrófagos não-infectados e infectados mostraram resposta em platô mantida pelos 500 segundos em que a solução contendo ATP esteve em contato com as células. Entretanto, a amplitude de resposta foi no macrófago não infectado menor 0,05 (ou 50u) que aquela observada no macrófago infectado 0,06 (ou 60u) (escala arbitrária)(Figura 28).

A resposta de mobilização do cálcio na forma de platô é característica da ativação do receptor  $\text{P2X}_7$ , quando estimulado por doses milimolares de ATP (COUTINHO-SILVA E COLS, 1999). Desta forma, nossos resultados indicam ativação e resposta de receptor  $\text{P2X}_7$  funcional na membrana tanto de infectados como nos não infectados, apresentando uma ampliação de resposta em células infectadas. O aumento de resposta observado nos macrófagos infectados pode indicar a potenciação de resposta do receptor  $\text{P2X}_7$ .



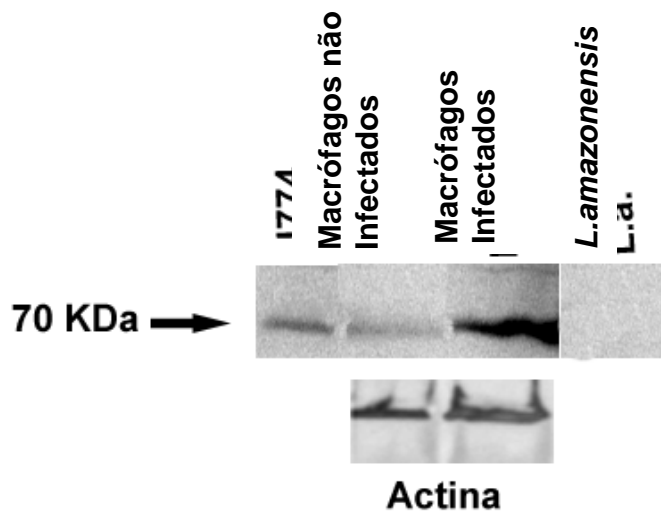
**Figura 28** - Variações de cálcio intracelular ao constante estímulo com ATP 1mM. (A) Macrófagos não infectados (B) Macrófagos infectados com *L. amazonensis*. As células foram infectadas por 48 horas em lamínulas de vidro, então incubadas com FURA-2 por 40 minutos e postas sob perfusão. u=unidades de fluorescência (escala arbitrária) seg=segundos.N=2.



#### **4.10 O receptor P2X<sub>7</sub> se encontra expresso em maior quantidade em macrófagos infectados**

Os resultados dos experimentos de cálcio e apoptose na presença de ATP e dos inibidores do receptor P2X<sub>7</sub>, sugerem a modulação positiva do mesmo na infecção com *L. amazonensis*. A disponibilidade de anticorpos específicos para este receptor permitem uma busca da expressão da proteína de interesse. Utilizando a técnica de *western blot* observamos na figura 29 a presença de uma banda de 70 KDa em macrófagos infectados e não infectados compatível com o esperado para o receptor P2X<sub>7</sub>. Os macrófagos murinos J774 foram utilizados como controle positivo da marcação. Observamos que extratos de culturas de macrófagos, infectados e não infectados, apresentaram a banda de 70 KDa, compatível com a presença do receptor P2X<sub>7</sub> entretanto, a banda obtida dos extratos de macrófagos infectados foi muito maior e de marcação mais intensa. O extrato de cultura de *Leishmania* pura na fase promastigota não apresentou marcação. Este resultado sugere então, maior quantidade de receptores P2X<sub>7</sub> em macrófagos infectados com *L. amazonensis*.

**Figura 29** - Western Blotting . Marcação com anticorpo anti-P2X<sub>7</sub> em macrófagos de linhagem J774, macrófagos não infectados, infectados com *L. amazonensis* e promastigotas de *L. amazonensis* livres.



## **5. DISCUSSÃO**

A relação entre mecanismos pró- e anti-inflamatórios durante respostas inflamatórias e imunológicas, é crítica para evitar injúrias teciduais excessivas, o que comprometeria o hospedeiro. A secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e TNF- $\alpha$  em resposta a agentes microbianos é um mecanismo de defesa essencial durante estágios iniciais de infecção.

Macrófagos e células dendríticas, possuem papel fundamental como iniciadores e reguladores da imunidade inata e adaptativa. Estas células compõem os principais alvos de citocinas e mediadores como são também para agentes patológicos, além de reagirem ativamente a danos teciduais. As regiões de injúria tecidual possuem características peculiares, devido à liberação de conteúdo intracelular de células lisadas, como a presença de nucleotídeos em concentrações milimolares. Portanto, a presença de nucleotídeos inicia o alerta ao sistema imune de injúria celular, liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e IL-6, cicloxigenase-2, geração de superóxidos como favorecimento da morte de patógenos intracelulares (Tabela 7) (FERRARI E COLS, 1997;AGA E COLS, 2002). Para evitar as atividades microbicidas dos macrófagos hospedeiros, os patógenos intracelulares

Ligante (sinal de perigo)	Receptor (sensor de perigo)
Proteínas HSP 60, 70, 90	CD 91, TLR4, TLR2, LOX-1
DNA	TLR9
ssRNA	TLR3, TLR7, TLR8
nucleotídeos	P2Y/P2X
Metabólitos de açúcar	P2Y <sub>14</sub>

Tabela 7- moléculas intracelulares sinalizadoras de perigo .Adaptado de DI VIRGILIO, 2005.

desenvolveram diversas estratégias para contornar sua destruição, incluindo atraso da maturação endocítica no modelo de *Mycobacterium*, atraso da fusão fago-lisossômica em *Chlamydia*, formação de vacúolos parasitóforos em *T. cruzi* e *Leishmania* (KUSNER E COL, 2000; HARB E COLS, 2000; SACKS E COL, 2002; COUTINHO-SILVA E COLS, NO PRELO). Ao final do ciclo de infecção, os parasitas são liberados culminando na morte do macrófago hospedeiro e liberação de nucleotídeos que induzirão inflamação local.

Neste sentido, o presente trabalho vem avaliar o comportamento de macrófagos infectados com o parasita intracelular *L. amazonensis* em contato com nucleotídeos extracelulares, definindo assim, o papel dos receptores para nucleotídeos destas células infectadas.

Torres-Santos em 2003 e Chaves em 2005 evidenciaram a importância do receptor P2X<sub>7</sub> em células de camundongos infectados com *Leishmania*, que apresentaram aumento de sensibilidade ao ATP extracelular através de ensaios de permeabilização, e diminuição da carga parasitária após o tratamento com este nucleotídeo. Estes dados sugerem a modulação positiva do receptor P2X<sub>7</sub> na infecção por *Leishmania*. Em um passo inicial foram realizadas observações morfológicas associadas à presença de nucleotídeos na infecção. As células infectadas apresentam morfologia usual, sem o perfil de dano celular por parte do parasita, o que vai de encontro com a estratégia de sobrevivência do patógeno mantendo o hospedeiro íntegro até sua eliminação. Em contrapartida, as células infectadas apresentaram características de desorganização celular, alterando-se a estrutura de membrana plasmática e citoplasma na presença dos nucleotídeos ATP, UTP e UDP. As células não infectadas também apresentaram alterações visuais ao serem incubadas com os nucleotídeos, entretanto a desestruturação celular não pareceu tão agravada quanto em células infectadas. Dados prévios



de nosso laboratório mostraram alterações morfológicas em células expostas ao ATP (MENDES, 2006). Uma das características mais marcantes observadas foi a retração celular, com perda de filopódios nos tratamentos com nucleotídeos.

Verhoef em 2003 demonstrou por microscopia óptica, que macrófagos expostos a ATP e outros agonistas de receptor P2X<sub>7</sub> apresentavam contínua formação de blebs de membrana em curso temporal com retração de projeções de membrana. Também, já foi demonstrado que o UTP através da ativação do receptor P2Y<sub>4</sub> promove alteração morfológica em células de neuroblastoma, entretanto, poucos trabalhos reportam alterações morfológicas em resposta a nucleotídeos de uracila. Estes resultados não deixam claro quais os receptores responsáveis pelas alterações morfológicas, ou o estado dos parasitas de *Leishmania* dentro dos macrófagos tratados. Para isto, foram realizadas imagens de fluorescência com o corante de núcleo Hoescht juntamente com a fluorescência GFP da *Leishmania* transfectada. As imagens obtidas mostraram que macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com ATP, UTP e UDP apresentavam diminuição da marcação GFP de *Leishmania*, além de marcação de núcleos apoptóticos nos macrófagos.

Estes resultados em conjunto apontam para um processamento ou morte do parasita quando seu hospedeiro é incubado com nucleotídeos, tal resultado se adiciona as observações feitas por Chaves em 2005 de diminuição de carga parasitária em células incubadas com ATP e UTP (VER ANEXO 3). Adicionalmente, as observações feitas de mudanças estruturais nos núcleos do hospedeiro apontam para processos de morte celular, especialmente a apoptose caracterizada por condensação do núcleo.

Ainda no contexto de alterações morfológicas, as imagens ultraestruturais obtidas neste trabalho mostram alterações ainda mais expressivas nas células ativadas por nucleotídeos. O

ATP e UTP promovem aumento de vesiculação citoplasmática e perturbações nos vacúolos parasitóforos, conseqüentemente perturbando o ciclo de infecção de *L. amazonensis*. O tratamento com UTP gera mais interesse por apresentar parasitas com sinais de morte, ou processamento. Contudo, algumas perguntas surgem em decorrência das diferenças ultraestruturais observadas: estariam os nucleotídeos promovendo uma aceleração do ciclo de leishmania e liberando-a para infectar células adjacentes? Ou ainda, processando-as promovendo a morte das mesmas?

A possibilidade de morte celular nas células hospedeiras (observada com a marcação com o corante nuclear hoescht em células infectadas) foi também testada com os mesmos nucleotídeos, utilizando a citometria de fluxo para determinação de células hipodiplóides, comprovando a ocorrência de morte celular, por apoptose em células infetadas. A células infectadas com *Leishmania* promoveram inibição da apoptose espontânea dos macrófagos em cultura (MOORE E COL, 1994; AGA E COLS, 2002; LISI E COLS, 2005; RUHLAND E COLS, 2006). Este resultado de inibição de morte espontânea vai de encontro com mecanismos de sobrevivência parasitária na persistência da infecção (AGA E COLS, 2002). Adicionalmente, sabe-se que espécies de *Leishmania* são capazes de conferir resistência aos macrófagos na apoptose induzida por diversos estímulos conhecidos, através de interferência na sinalização endógena mitocondrial ativando PI3K/Akt (; AGA E COLS, 2002; LISI E COLS, 2005 ;RUHLAND E COLS, 2006). A morte celular observada em macrófagos não infectados em decorrência da ativação por ATP é conhecida através da via do receptor P2X<sub>7</sub> em diferentes tipos celulares (MURGIA, E COLS, 1992; COUTINHO-SILVA, E COLS, 1999; COUTINHO-SILVA, E COLS, 2003;WANG E COLS, 2004; ADINOLFI E COLS, 2005; SUGIYAMA E COLS, 2005; MACKENZIE E COLS, 2005). Em contrapartida, os

parasitas de *Leishmania* não conseguiram reverter, ou inibir a morte celular induzida por ATP, UTP e UDP assim como conseguem com diferentes estímulos (RUHLAND E COLS, 2006). Como já descrito, parasitas de *Leishmania* utilizam a via PI3K/Akt de resistência a apoptose do hospedeiro, interessantemente foi mostrado recentemente que esta via também é ativada na indução de apoptose de macrófagos por ATP via receptor P2X<sub>7</sub> (COSTA-JUNIOR, 2006). Não está claro como a mesma via de sinalização estaria associada na morte de macrófagos infectados com *L. amazonensis*.

As curvas dose-resposta obtidas na apoptose com ATP em macrófagos não infectados e infectados mostra curvas com inclinações diferentes em cada situação, sugerindo o envolvimento de diferentes receptores para nucleotídeos, ou diferentes quantidades expressas destes receptores alterando a cinética de dose-resposta. Entretanto, fica claro pelo aumento de sensibilidade nas células infectadas que a apoptose induzida por ATP de fato é um efeito atribuído a maior expressão funcional dos receptores P2X<sub>7</sub> na infecção por *Leishmania*. É sabido que UTP e UDP não tem qualquer efeito indutório sobre a apoptose em macrófagos. (COUTINHO-SILVA E COLS, 2001). Portanto, o efeito indutor de apoptose por UTP e UDP foi totalmente inesperado e sugere a modulação de um ou mais receptores pirimidinérgicos nestas células. As curvas dose-resposta de UTP e UDP na indução de apoptose em macrófagos infectados foram muito parecidos o que dificulta a dissociação dos fenômenos observados na apoptose por UTP e UDP, mas em uma análise mais cuidadosa pode-se perceber que as concentrações mais baixas de sensibilização são diferentes para UTP e UDP gerando EC<sub>50</sub> diferentes também.

A apoptose induzida por ATP pôde ser associada diretamente ao receptor P2X<sub>7</sub> com a utilização de inibidores como ATP oxidado (comentado abaixo) além de experimentos

utilizando macrófagos de animais deficientes no receptor  $P2X_7^{-/-}$ . Nestas células a apoptose induzida por ATP foi totalmente inibida tanto nos macrófagos não infectados como infectados. A inibição total da apoptose na presença de ATP em células não-infectadas e infectadas prova que o fenômeno de morte seria exclusivo do receptor  $P2X_7$ . A apoptose induzida por UTP e UDP em células de camundongos  $P2X_7^{-/-}$  mostra a ausência de relação destes nucleotídeos com o receptor  $P2X_7$ . Os experimentos de indução da apoptose por UTP e UDP realizados nos animais C57BL6  $P2X_7^{+/+}$  mostram o mesmo perfil de apoptose observado no  $P2X_7^{-/-}$  aos dois nucleotídeos. Por outro lado, a porcentagem de células apoptóticas em resposta ao ATP, de macrófagos de animais C57BL6  $P2X_7^{+/+}$  foi inferior a média obtida em macrófagos de animais BALB/c. Tal fato pode estar associado com a presença de receptor  $P2X_7$  truncado na cepa de camundongos C57BL6, o que inibe total ou parcialmente o funcionamento do receptor (ADRIOUCH E COLS, 2002). Além de redução da resposta máxima a apoptose com ATP, o mesmo foi observado em relação aos outros nucleotídeos tanto em camundongos C57BL6 selvagens quanto em nocautes  $P2X_7^{-/-}$ .

A utilização de antagonistas como ATP oxidado, PPADS e Suramina auxiliaram na definição de alguns receptores envolvidos nas vias de morte. A inibição da apoptose obtida com o ATP oxidado em macrófagos infectados bem como não infectados confirma que o fenômeno é de fato, devido ao receptor  $P2X_7$ , enquanto células não infectadas não apresentam inibição da apoptose com suramina e inibição parcial com PPADS o que excluiria a possibilidade dos receptores  $P2Y_{2,4,11}$ ,  $P2X_{1,2,3}$  e  $5$  sensíveis a suramina e  $P2X_{1,2,3,5}$  e  $6$ ,  $P2Y_{1,4}$  e  $6$  sensíveis a PPADS, estarem envolvidos na resposta ativada por ATP (BURNSTOCK, 2006). Nas células infectadas a suramina inibiu a apoptose induzida por UTP e UDP, confirmando que ambos os nucleotídeos estariam induzindo a apoptose através de receptores  $P2Y$ .

Entretanto, a suramina é um antagonista pouco seletivo, sendo inibidor dos receptores P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub> e P2Y<sub>11</sub>, o que dificultaria selecionar o receptor envolvido na resposta, adicionalmente, o PPADS não inibiu a apoptose induzida por UTP em macrófagos infectados, dissociando a atuação dos receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>4</sub> e P2Y<sub>6</sub>.

Alguns trabalhos reportam a morte celular via receptores P2Y<sub>4</sub> induzida por UTP e também via receptor P2Y<sub>1</sub> utilizando ADP como agonista, enquanto os receptores P2Y<sub>12</sub> e P2Y<sub>2</sub> participam da resistência a apoptose em diferentes tipos celulares (CAVALIERE E COLS, 2004; MAMEDOVA E COLS, 2006; ARTHUR E COLS, 2006), apesar do receptor P2Y<sub>2</sub> estar associado a efeitos anti-proliferativos e apoptóticos em células de carcinoma humano, células epiteliais, coloretais e esofageais (HOPFNER E COLS, 1998). Os receptores P2Y possuem vias de sinalização via proteína G e aumento de cálcio intracelular com elevação de PI3K, mas as vias de sinalização envolvidas na morte através da ativação destes receptores ainda não está muito clara.

Os ensaios de liberação de cálcio apontam para uma modulação positiva de receptores além de receptores funcionais adicionais na infecção. Os registros de cálcio apontam receptores responsivos a ATP e UTP em amplitudes e tempos de resposta diferentes nas situações não infectados e infectado. Os receptores para nucleotídeos presentes nos macrófagos não infectados são dessensibilizados após a aplicação de 100µM de ATP, entretanto, apenas uma parte destes receptores é dessensibilizado após a aplicação de 100µM de UTP. Já em macrófagos infectados, os padrões de resposta a liberação do cálcio são alterados, além de receptores responsivos ao ATP, surgem receptores responsivos somente a UTP. Tal visão aponta a modulação positiva de um receptor responsivo somente ao UTP e não ao ATP na concentração de 100µM. Sabe-se que em camundongos, ATP e UTP são agonistas

equipotentes dos receptores P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>4</sub>, (ABBRACHIO E COLS, 2006) e que ambos receptores evocam a liberação de cálcio (COMMUNI E COLS, 1999; LAZAROWSKI E COLS, 2003).

Trabalhos recentes tem reportado a íntima ligação entre receptores P2 e moléculas de citoesqueleto em um sistema de inter-regulação (VERHOEF E COLS, 2003), podendo a fagocitose ser modulada por receptores P2 em macrófagos peritoneais de camundongo (ICHINOISE, 1995). Para descartar a possibilidade do fenômeno de modulação de resposta ao cálcio em células infectadas seja um efeito basicamente da endocitose, ou seja, da captação de partículas, foram realizados experimentos fornecendo esferas de látex para fagocitose. Os resultados mostraram que a alteração da mobilização de cálcio entre macrófagos não infectados e infectados não é resultado da fagocitose. Neste sentido iniciou-se um estudo mais aprofundado do efeito da fagocitose na modulação de receptores P2 com esferas de látex e o efeito do óleo mineral (VER ANEXO 1) na mesma proporção de leishmanias.

Recentemente, del Rey demonstrou em camundongos nocaute para os receptores P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>4</sub>, que a liberação de cálcio na presença de UTP se dá praticamente exclusivamente pela ativação do receptor P2Y<sub>2</sub>. Enquanto o receptor P2Y<sub>6</sub> seria ativado somente por UDP gerado principalmente através da degradação de UTP. A resposta ao ATP somente seria inibida em condições de ausência de cálcio extracelular, mostrando que a 100 µM os receptores responsivos ao cálcio seriam de subtipo P2X (DEL REY E COLS, 2006). As curvas de resposta de cálcio entre células infectadas tratadas com UTP ou ATP apresentam padrões de resposta completamente diferentes, permitindo a dissociação dos dois agonistas e sugere que pelo menos dois receptores diferentes, um para cada nucleotídeo estar atuando. Comparando-se as respostas de cálcio obtidas entre macrófagos infectados ao UTP ou UDP, nota-se que

também apresentam padrões diferentes e  $EC_{50}$  diferentes permitindo também sugerir uma dissociação de receptores para cada nucleotídeo. Portanto, os receptores responsivos a UTP e UDP são dois receptores diferentes com características *P2Y<sub>2</sub> – like* e *P2Y<sub>6</sub> – like*.

A resposta obtida na variação de cálcio intracelular na presença de ATP, a confirmação obtida através da técnica de *western blotting* da presença ampliada do receptor P2X<sub>7</sub> na infecção, os ensaios de perfusão contínua com ATP a 37°C mostram que de fato, o receptor envolvido pelo menos em parte, na resposta ao ATP é o receptor P2X<sub>7</sub>, com ampliação de 20% da resposta em platô mantido na infecção. Estes dados se somam aos dados de Chaves e foram organizados na forma de artigo científico a ser submetido (VER ANEXO 3).

O papel dos receptores P2 em infecções com parasitas intracelulares vem sendo descrito tanto em modelos de infecção bacterianos quanto por protozoários. Ao receptor P2X<sub>7</sub> em especial, vem sendo atribuído um papel muito importante na eliminação dos parasitas intracelulares. Sabe-se que a ativação deste receptor através do ATP promove a inibição da atividade infectiva com conseqüente morte de células infectadas com *Chlamydia psittaci* e *Chlamydia trachomatis* (KUSNER E COLS, 2000; COUTINHO-SILVA E COLS, 2001; COUTINHO-SILVA E COLS, 2003; SAUNDERS E COLS, 2003). Muitos parasitas como *Mycobacterium bovis BCG*, *Vibrio cholerae*, *M. tuberculosis*, *T. cruzi* e *Leishmania* também secretam ou expressam ecto-nucleotídeos que degradam ou sintetizam nucleotídeos (HARB E COLS, 2000; COUTINHO-SILVA E COLS, NO PRELO).

Neste aspecto, o presente trabalho vem a mostrar a modulação positiva do receptor P2X<sub>7</sub> e de pelo menos dois receptores P2Y pirimidinérgicos na infecção com *Leishmania amazonensis*, o que representaria através da ativação destes receptores com nucleotídeos extracelulares a morte da célula hospedeira e conseqüente eliminação parasitária.

## **6. CONCLUSÕES**



1. Os nucleotídeos ATP, UTP e UDP induzem alterações morfológicas em macrófagos
2. O tratamento com os nucleotídeos ATP, UTP e UDP parece induzir diminuição de amastigotas de *Leishmania amazonensis* viáveis em macrófagos.
3. A infecção com *Leishmania amazonensis* promove alterações na mobilização de cálcio intracelular em resposta aos nucleotídeos ATP negativamente, UTP positivamente e UDP negativamente.
4. Macrófagos não-infectados entram em apoptose apenas na presença de ATP, enquanto macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis* entram em apoptose quando tratados com nucleotídeos ATP, UTP e UDP.
5. O receptor P2X<sub>7</sub> se encontra modulado positivamente na infecção com *L. amazonensis*.
6. Receptores com algumas características de receptores P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>6</sub> ainda não completamente identificados também são modulados positivamente na infecção com *Leishmania amazonensis*.
7. Os receptores P2 modulados na infecção induzem apoptose em macrófagos infectados, o que culminaria na morte dos parasitas.

## **7.PERSPECTIVAS FUTURAS**

Este trabalho veio a mostrar a modulação positiva de receptores P2 durante a infecção com *L. amazonensis*. Entretanto, novos experimentos devem ser realizados na identificação dos receptores modulados e a forma de eliminação parasitária induzida pela ativação dos receptores modulados através de :

- Estudos de quantificação da liberação de espécies reativas de oxigênio
- PCR em tempo real para caracterização dos receptores modulados positivamente durante a infecção.
- Preparações de *western blot* para identificação dos receptores P2Y e P2X modulados, identificando também, se fosfolipases A, C e D estariam na sinalização destes receptores.
- Análises ultraestruturais com diferentes tempos de tratamento com nucleotídeos visando melhor definição da seqüência envolvida na eliminação do parasita.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADINOLFI, E.; PIZZIRANI, C.; IDZKO, M.; PANTHER, E.; NORGAUER, J.; DI VIRGILIO, F.; FERRARI, D. (2005). P2X7 receptor: Death or life?. *Purinergic Signaling*, **1**: 219-227.

ABBRACCHIO, M.P., BOEYNAEMS, J.M., BARNARD, E.A., KENNEDY, C., MIRAS-PORTUGAL M.T., KING, B.F., 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(2)**: 52-5

ABBRACCHIO, M.P.; BURNSTOCK, G.; BOEYNAEMS, J.M.; 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. *Pharmacological reviews.* **58**:281-341.

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 P2X(7). *J. Leukoc. Biol.* **72**:222-232.

AKIRA, S. (2003). Mammalian Toll-like receptors. *Cur. Opinion in Immunol.*, **15**: 5-11.

ALVES, C.R.; CORTE-REAL, S.; BOURGUIGNON, S.C.; CHAVES, C.S.; SARAIVA, E.M. (2005). *Leishmania amazonensis*: early proteinase activities during promastigote-amastigote differentiation in vitro. *Exp Parasitol.*, **109(1)**:38-48.

ARTHUR DB, GEORGI S, AKASSOGLU K, INSEL PA.(2006). Inhibition of apoptosis by P2Y2 receptor activation: novel pathways for neuronal survival. *J Neurosci.* **26(14)**:3798-804.

ARULANANDAM, B.; (2004). *Chlamydia trachomatis* pulmonary infection induces greater inflammatory pathology in immunoglobulin A deficient mice. *Cellular Immunology*, **230**: 56-64.

AWASTHI, A.; MATHUR, R.K., SAHA B. (2004). Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res*, **119**: 238-258.

BAETAS-DA-CRUZ, W.; MACEDO-SILVA, R.M.; SANTOS-SILVA, A.; HENRIQUES-PONS, A.; MADEIRA, M.F.; CORTE-REAL, S.; CAVALCANTE, L.A. (2004). Destiny and intracellular survival of *Leishmania amazonensis* in control and dexamethasone-treated glial cultures: protozoa-specific glycoconjugate tagging and TUNEL staining. *J Histochem Cytochem.*, **52(8)**:1047-55.

BANFI C, FERRARIO S, DE VINCENTI O, CERUTI S, FUMAGALLI M, MAZZOLA A, D'AMBROSI N, VOLONTE C, FRATTO P, VITALI E, BURNSTOCK G, BELTRAMI E, PAROLARI A, POLVANI G, BIGLIOLI P, TREMOLI E, ABBRACCHIO MP. (2005). P2 receptors in human heart: upregulation of P2X6 in

patients undergoing heart transplantation, interaction with TNF $\alpha$  and potential role in myocardial cell death.  
*J Mol Cell Cardiol.* **39(6)**:929-39.

BANGA, I.; NOWOTNI, A. (1951). Change of the ATP-ase activity and elastin content of the arterial wall in consequence of arteriosclerosis.  
*Acta Physiol Hung.* **2**: 327-31.

BARICORDI, R. (2001). Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood*, **97**: 587-600.

BAILEY, M.A.; IMBERT-TEBOUL, M.; TURNER, C.; SRAI, S.K.; BURNSTOCK, G.; UNWIN, R.J. (2001). Evidence for basolateral P2Y(6) receptors along the rat proximal tubule: functional and molecular characterization.  
*J Am Soc Nephrol.*, **12(8)**:1640-7.

BERREDO-PINHO, M.; PERES-SAMPAIO, C.E.; CHRISPIM, P.P.; BELMONT-FIRPO, R.; LEMOS, A.P.; MARTINY, A. (2001). A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence.  
*Arch Biochem Biophys*, **391(1)**:16-24.

BERTICS, P. The nucleotide receptor P2X7 mediates actin reorganization and membrane blebbing in RAW 264.7 macrophages via p38 MAP kinase and Rho. *J. of Leukocyte Biology*, **75**: 2-8.

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(4)**:273-282.

BO, X.; JIANG, L.H.; WILSON, H.L.; KIM, M.; BURNSTOCK, G.(2003). Pharmacological and biophysical properties of the human P2X5 receptor. *Mol Pharmacol.* **63(6)**:1407-16

BOCCHINO, M.; GALATI, D.; SANDUZZI, A.; COLIZZI, V.; BRUNETTI, E.; MANCINO, G. (2005). Role of mycobacteria-induced monocyte/macrophage apoptosis in the pathogenesis of human tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **9(4)**: 375-383.

BOURS MJ, SWENNEN EL, DI VIRGILIO F, CRONSTEIN BN, DAGNELIE PC. (2006). Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther.* **112(2)**:358-404.

BRAKE, A.J., WAGENBACH, M.J., JULLUS, D. (1994). New structural motif for ligand gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* **371**, 519-523.

BRUNSCHWEIGER A, MÜLLER CE. P2 receptors activated by uracil nucleotides--an update.(2006). *Curr Med Chem.* **13(3)**:289-312.

- BURLEIGH, B.A.; WOOLSEY, A.M.(2002). Cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cellular Microbiology* **4(11)**: 701-711.
- BULLEN, V.; HANDMAN, E.(2002). Interaction of *Leishmania* with host macrophage. *Trends in parasitology*, **18**:332-334.
- BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G.E. (2004). Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int. Review of cytology*, **240**:31-302.
- BURNSTOCK, G.(2006). Purinergic signalling--an overview. *Novartis Found Symp.* **276**:26-48.
- BURNSTOCK G.(2006) Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci.* **27(3)**:166-76.
- BURNSTOCK G. (2006). Purinergic signalling. *Br J Pharmacol.* **147** Suppl 1:S172-81.
- BURNSTOCK G. (2006). Purinergic P2 receptors as targets for novel analgesics. *Pharmacol Ther.* **110(3)**:433-54.
- CARINI R, ALCHERA E, DE CESARIS MG, SPLENDORE R, PIRANDA D, BALDANZI G, ALBANO E.( 2006). Purinergic P2Y2 receptors promote hepatocyte resistance to hypoxia. *J Hepatol.* **45(2)**:236-45.
- CAVALIERE F, DINKEL K, REYMANN K.(2004). Microglia response and P2 receptor participation in oxygen/glucose deprivation-induced cortical damage. *Neuroscience.* **136(3)**:615-23.
- CHAVES, S.P. Modulação dos Receptores P2 durante a leishmaniose tegumentar murina e sua potencial ação terapêutica. Orientador: Bartira Rossi-Bergman. Rio de Janeiro:UFRJ/CCS, 2005.81p.Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Biofísica)
- CHESSELL, I.P.; HATCHER, J.P.; BOUNTRA, C.; MICHEL, A.D.; HUGHES, J.P.; GREEN, P.(2005). Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain*, **114(3)**:386-396.
- CHIOZZI, P.; SANZ, J.M.; FERRARI, D.; ALEOTTI, A.; HAELL, G.A.; COLLO, G.; DI VIRGILLIO, F. (1997). Spontaneous cell fusion in macrophage cultures expressing high levels of the P2Z/P2X7 receptor. *J. Cell Biol.* **138**: 697-706.
- CHOPRA, P.; SINGH, A.; KOUL, A.; RAMACHANDRAN, S.; DRLICA, K.; TYAGI, A.K.(2003). Cytotoxic activity of nucleoside diphosphate kinase secreted from *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Biochem* , **270(4)**:625-634.

COLLO, G.; NORTH, R.A.; KAWASHIMA, E.; MERLO-PICH, E.; NEIDHART, S.; SURPRENANT, A.; BUELL, G. (1996). Cloning OF P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J Neurosci.* **16(8)**:2495-507.

COMMUNI D, ROBAYE B, BOEYNAEMS JM.(1999). Pharmacological characterization of the human P2Y11 receptor. *Br J Pharmacol.* **128(6)**:1199-206.

COUTINHO-SILVA, R.; PERSECHINI, P.M. (1996). P2Z purinoceptor-associated pores induced by extracellular ATP in macrophages and J774 cells. *Am J Physiol.* **273(6 Pt 1)**:C1793-800.

COUTINHO-SILVA R, ALVES LA, DE CARVALHO AC, SAVINO W, PERSECHINI PM. (1996). Characterization of P2Z purinergic receptors on phagocytic cells of the thymic reticulum in culture. *Biochim Biophys Acta.* **1280(2)**:217-22.

COUTINHO-SILVA, R.; PERSECHINI, P.M. (1997). P2Z purinoceptor-associated pores induced by extracellular ATP in macrophages and J774 cells. *Am Journal of Physiology*, **42**:1973-1800.

COUTINHO-SILVA, R.; PERSECHINI, P.M.; BISAGGIO R.D.; PERFETINI, J.L.; KANELLOPOLOUS, J.M.; NETO, A.C.; MOTTA-LY, I.; DAUTRY -VARSAT, A.; OJCIUS, D. (1999). P2Z/P2X7 receptor –dependent apoptosis of dendritic cells. *Am Journal Physiology*, **276**:1139-1147.

COUTINHO-SILVA R, PERFETTINI JL, PERSECHINI PM, DAUTRY-VARSAT A, OJCIUS DM.(2001). Modulation of P2Z/P2X(7) receptor activity in macrophages infected with Chlamydia psittaci. *Am J Physiol Cell Physiol.* **280(1)**:C81-9.

COUTINHO-SILVA R, PARSONS M, ROBSON T, BURNSTOCK G. (2001). Changes in expression of P2 receptors in rat and mouse pancreas during development and ageing. *Cell Tissue Res* **306(3)**:373-83.

COUTINHO-SILVA R, STAHL L, RAYMOND MN, JUNGAS T, VERBEKE P, BURNSTOCK G, DARVILLE T, OJCIUS DM. (2003). Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X7R-dependent phospholipase D activation. *Immunity.*; **19(3)**:403-12.

COUTINHO-SILVA, R.; PARSONS, M; ROBSON, T.; LINCOLN J.; BURNSTOCK, G. (2003) P2X and P2Y purinoceptor expression in pancreas from streptozotocin-diabetic rats. *Molecular and cellular endocrinology*, **204**: 141-154.

COUTINHO-SILVA, R.; OJCIUS, D.M.; GÓRECKI, D.C.; PERSECHINI, P.M.; BISAGGIO, R.; MENDES, A.N.; MARKS, J.; BURNSTOCK, G.; DUNN, P.N. (2005).



Multiple P2X and P2Y receptor subtypes in mouse J774, spleen and peritoneal macrophages. *Biochemical Pharmacology*. **69**: 641-655.

COUTINHO-SILVA R, STAHL L, CHEUNG KK, DE CAMPOS NE, DE OLIVEIRA SOUZA C, OJCIUS DM, BURNSTOCK G.(2005). P2X and P2Y purinergic receptors on human intestinal epithelial carcinoma cells: effects of extracellular nucleotides on apoptosis and cell proliferation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **288**(5):G1024-35

COUTINHO-SILVA R, OJCIUS DM, GORECKI DC, PERSECHINI PM, BISAGGIO RC, MENDES AN, MARKS J, BURNSTOCK G, DUNN PM. (2005). Multiple P2X and P2Y receptor subtypes in mouse J774, spleen and peritoneal macrophages. *Biochem Pharmacol*.**69**(4):641-55

DA CRUZ, C. M.; VENTURA A. L. M.; SCHACHTER, J.; MIRANDA, H. C. J.; SOUZA, H. A. S.; GOMES, F. R.; COUTINHO-SILVA, R.; OJCIUS, D. M.; PERSECHINI, P. M. (2005). Activation of ERK  $\frac{1}{2}$  by extracellular nucleotides in macrophages is mediated by multiple P2 receptors independently of P2X<sub>7</sub> associated pore or channel formation. *British Journal of Pharmacology* **147**(3):324-34.

DA SILVA, R.P.; HALL, B.F.; JOINER, K.A.; SACKS, D.L. (1989). CR1, the C3b receptor, mediates binding of ineffective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. *J Immunology*, **143**:617-622.

DEBRABANT, A.; LEE, N.; BERTHOLET, S.; DUNCAN, R.; NAKHASI, H.L.(2003). Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. *Int J Parasitol*. **33**(3):257-67.

DEL REY, A.; RENIGUNTA, V.; KAVELAARS, A.; HANLEY, P. (2006). Knockout mice reveal the contributions of P2Y and P2X receptors to nucleotide-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in macrophages. (2006). *The journal of Biological Chemistry*. **Paper in press**

DENLINGER, L.C.; FISETTE, P.L.; SOMMER, J.A.; WATTERS, J.J.; PRABHU, U.; DUBYAK, G.R.(2001).Cutting edge: the nucleotide receptor P2X<sub>7</sub> contains multiple protein- and lipidinteractionmotifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*, **167**(4):1871-1876.

DESCOTEAUX, S.; LODGE, R.(2005). Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clinical Immunology*, **114**: 256-265.

DERMINE, J.F.; GOYETTE, G.; HOUDE, M.; TURCO, S.J.; DESJARDINS, M. (2005). *Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages. *Cell Microbiol.*,**7**(9):1263-70.

- DE SOUZA, W. (2005). Microscopy and cytochemistry of the biogenesis of the parasitophorous vacuole. *Histochem Cell Biol*, **123**(1):1-18.
- DICHMANN, S. *ET AL.* (2000). Adenosine triphosphate-induced oxygen radical production and CD11b up-regulation: Ca<sup>++</sup> mobilization and actin reorganization in human eosinophils. *Blood*, **95**(3): 973-978.
- DI VIRGILIO, F.; CHIOZZI, P.; FALZONI, S.; FERRARI, D.; SANZ, J.M.; VENKETARAMAN, V.(1998). Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell Death Diff.* **5**(3):191-199.
- DI VIRGILIO, F.; CHIOZZI, P.; FERRARI, D.; FALZONI, S.; SANZ, J.M.; MORELLI, A.; TORBOLI, M.; BOLOGNESI, G.; BARICORDI, O.R. (2001). Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood*. **97**(3):587-600.
- DI VIRGILIO, F.; FERRARI, D.; FALZONI, S.; CHIOZZI, P.; MUNERATI, M.; STEINBERG, T.H.; BARICORDI, O.R. (1996). P2 purinoceptors in the immune system. *Ciba Found. Symp.* **198**:290-302
- DI VIRGILIO, F. (2005). Purinergic mechanism in the immune system: a signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signaling*, **1**: 205-209.
- DI VIRGILIO, F. (1995). The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol Today*. **16**(11):524-8. Review.
- DRURY, A.N.; SZENT-GYORGYI, A. (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol*. **68**(3): 213-237.
- DUBYAK, G.; *ET AL.*(2003). P2X7 receptor-dependent blebbing and the activation of rho-effector kinases, caspases, and IL-1 $\beta$  release. *The Journal of Immunology*, **170**: 5728-5738.
- ESCALANTE-OCHOA; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F.(1998) The intracellular life of *Chlamydia psittaci*: how do the bacteria interact with the host cell?. *FEMS Microbiology Reviews*, **22**: 65-78.
- EL-MOATASSIM C, DUBYAK GR. (1992). A novel pathway for the activation of phospholipase -D by P(2z) purinergic receptors in BAC1.2F5 macrophages. *J Biol Chem*, **267**:23664-23673.
- ELLIOTT, J.I.; SURPRENANT, A.; MARELLI-BERG, F.M.; COOPER, J.C.; CASSADY-CAIN, R.L.; WOODING, C.; LINTON, K.; ALEXANDER, D.R.;

HIGGINS, C.F. (2005). Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes. *Nat. Cell Biol.* **7**:808-16.

FALZONI, S.; MUNERATI, M.; FERRARI, D.; SPISANI, S.; MORETTI, S.; DI VIRGILIO, F.(1995). The purinergic P2Z receptor of human macrophage cells - Characterization and possible physiological role. *J Clin Invest* , **95**:1207-1216.

FERRARI, D.; CHIOZZI, P.; FALZONI, S.; DAL SUSINO, M.; MELCHIORRI, L.; BARICORDI, O.R.(1997). Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol* , **159(3)**:1451-1458.

FERRARI, D.(2005). P2X7 receptor: death or life?. *Purinergic Signaling*, **1**: 219-227.

FERRARI D, PIZZIRANI C, ADINOLFI E, LEMOLI RM, 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(7)**:3877-83

FERRARI, D.; CHIOZZI, S; FALZONI, M.; DAL SUZINO, S.; DI VIRGILIO F.(1997). Extracellular ATP triggers IL-1b release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J. Immunol.***159**: 1451-1459.

FRANCO-MARTINEZ S, NINO-MORENO P, BERNAL-SILVA S, BARANDA L, ROCHA-MEZA M, PORTALES-CERVANTES L, LAYSECA-ESPINOSA E, GONZALEZ-AMARO R, PORTALES-PEREZ D.(2006). Expression and function of the purinergic receptor P2X7 in patients with pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol.* **146(2)**:253-61.

GENDRON, P.F.; CHALIMONIUK, M.; WEISMAN, G.A. ; SUN, G.Y. (2003). P2X7 nucleotide receptor activation enhances INF- $\gamma$  induced type II nitric oxide synthase activity in BV-2 microglial cells. *J. Neurochemistry* **87**:344-352.

GEVER JR, COCKAYNE DA, DILLON MP, BURNSTOCK G, FORD AP.(2006).Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch.* **452(5)**:513-37.

GERISH, G.; HULSER, D.; MALCHOW, D.; WICK, U.(1975). Cell communication by periodic cyclic ATP pulses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **272**:181-92.

GRIFFITHS, R.J.; STAM, E.J.; DOWS, J. T.; OTTERNESS, I. G. (1995). ATP induces the release of IL-1 from LPS-primed cells in vivo. *J Immunol.* **154**: 2821-8.

GROSCHERL-STEWART,U.; BARDINI,M.; ROBSON,T.; BURNSTOCK,G. (1999). Localization of P2X5 and P2X7 receptors by immunohistochemistry in rat stratified squamous epithelia. *Cell Tissue Res.***293**: 599-605.

GRUENHEID, S.; FINLAY, B.B.(2003). Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature*, **442**: 775-781.

HARB OS, ABU KWAIK Y.(2000). Essential role for the *Legionella pneumophila* replication helicase homologue in intracellular infection of mammalian cells. *Infect Immun.* **68(12)**:6970-8.

HENRIQUES, C.; DE SOUZA, W. (2000). Redistribution of plasma-membrane surface molecules during formation of the *Leishmania amazonensis*-containing parasitophorous vacuole. *Parasitol Res*, **86**:215-225.

HIGGINS, C. (2005). Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signaling mechanism in lymphocytes. *Nature Cell biology*, **7**:807-816.

HOLTON F.A.; HOLTON, P. (1953). The possibility that ATP is a transmitter at sensory nerve endings. *J Physiol.* **119** :50-51.

HOLLOPETER G, JANTZEN HM, VINCENT D, LI G, ENGLAND L, RAMAKRISHNAN V, YANG RB, NURDEN P, NURDEN A, JULIUS D, AND CONLEY PB.(2001) Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* **409**: 202–207.

HOPFNER M, MAASER K, BARTHEL B, VON LAMPE B, HANSKI C, RIECKEN EO, ZEITZ M, AND SCHERUBL H.(1998). Growth inhibition and apoptosis induced by P2Y2 receptors in human colorectal carcinoma cells: involvement of intracellular calcium and cyclic adenosine monophosphate. *Int J Colorectal Dis* **16**: 154–166.

HU, Y.; FISETTE, P.L.; DENLINGER, L.C.; GUADARRAMA, A.G.; SOMMER, J.A.; PROCTOR, R.A.; BERTICS, P.J. (1998). Purinergic receptor modulation of lipopolysaccharide signaling and inducible nitric-oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. *J. Biol. Chem.* **273**: 27170-27175.

HUMPHREYS, B.D.; DUBYAK GR.(1996). Induction of the P2Z/P2X7 nucleotide receptor and associated phospholipase D activity by lipopolysaccharide and IFN-gamma in the human THP-1 monocytic cell line. *J Immunol* , **157(12)**:5627-5637.

HUMPHREYS, B.D.; RICE, J.; KERTESY, S.B.; DUBYAK, G.R. (2000). Stress-activated protein kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor. *J Biol Chem*, **275(35)**:26792-26798.

ICHINOSE M, ASAI M, SAWADA M.(1995). Enhancement of phagocytosis by dynorphin A in mouse peritoneal macrophages. *J Neuroimmunol.* **60(1-2)**:37-43.

INOUE, K. (2005). The function of microglia through purinergic receptors: Neurophatic pain and cytokine release. *Pharmacol. Ther.* **109(1-2)**:210-26.

- INOHARA N AND NUNEZ G.(2003) NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* **3**: 371–382.
- KIM. J.H.; NAM, J.H.; UHM, DT; KIM, S.J. (2004). Purinergic receptors coupled to intracellular Ca<sup>2+</sup> signals and exocytosis in rat prostate neuroendocrine cells. *The journal of Bio. Chem.* **279**: 27345-27356.
- KIM SG, SOLTYSIAK KA, GAO ZG, CHANG TS, CHUNG E, JACOBSON KA. (2003). Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in astrocytes is prevented by the activation of P2Y<sub>6</sub>, but not P2Y<sub>4</sub> nucleotide receptors. *Biochem Pharmacol.* **65(6)**:923-31.
- KNIGHT, G.E.; BURNSTOCK, G.(2004). Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol.* **240**:31-304.
- KLOTZ, K.N. (2000). Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology.* **362**: 382-391.
- KOLEN, K. V.; SLEGGERS, H. (2006). Atypical PKCzeta is involved in RhoA-dependent mitogenic signaling by the P2Y<sub>12</sub> receptor in C6 cells. *FEBS J.* **273(8)**:1843-54.
- KRAWCZYK-BALSKA, A.; BIELECKI, J. (2004). Molecular aspects of *Listeria monocytogenes* infection. *Pol J Microbiol.*, **53**:17-22.
- KÜGELGEN, I. (2006). Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther.* **110(3)**:415-32.
- KÜGELGEN, I.; WETTER, A.(2000). Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **362(4-5)**:310-23.
- KUSNER, D.J.; ADAMS, J.(2000). ATP-induced killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* within human macrophages requires phospholipase D. *J Immunol* **164(1)**:379-388.
- LABASI, J.M.; PETRUSHOVA, N.; DONOVAN, C.; MCCURDY, S.; LIRA, P.; PAYETTE, M.M.(2002). Absence of the P2X<sub>7</sub> Receptor Alters Leukocyte Function and Attenuates an Inflammatory Response. *J Immunol*, **168(12)**:6436-6445.
- LA SALA, A.; FERRARI, D.; DIVIRGILLIO, F.; IDZKO, M.; NORGADER, J.; GIROLONONI, G. (2003). Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J. Leukoc. Biol.* **73**: 339-343.

- LAZAROWSKI ER, BOUCHER RC, HARDEN TK. (2003). Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol.* **64(4)**:785-95. Review.
- LEITE-DE-MORAES, M.C.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; DARDENNE, M.; SAVINO, W.(1992). Modulation of thymocyte subsets during acute and chronic phases of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*, **77(1)**:95-98.
- LEONG, W.S.; RUSSEL, R.G.; CASWELL, A.M.(1994). Stimulation of cartilage resorption by extracellular ATP acting at P2-purinoceptors. *Biochim Biophys Acta.* **1201**:298-304.
- LE FEUVRE,R.A.; BROUGH,D.; IWAKURA,Y.; TAKEDA,K.; ROTHWELL,N.J.(2003). Priming of macrophages with lipopolysaccharide potentiates P2X7-mediated cell death via a caspase-1-dependent mechanism, independently of cytokine production. *J.Biol.Chem.***277**: 3210-3218.
- LIN, W.W.; CHEN, B.C. (1997). Involvement of protein kinase C in the UTP-mediated potentiation of cyclic AMP accumulation in mouse J774 macrophages. *Brit. Journal of Pharmacol.* **121**:1749-1757.
- LISI, S.; SISTO, M.; ACQUAFREDDA, A.; SPINELLI, R.; SCHIAVONE, M.; MITOLO, V.; BRANDONISIO, O.; PANARO, M.(2005). Infection with *Leishmania infantum* Inhibits actinomycin D-induced apoptosis of human monocytic cell line U-937. *J Eukaryot Microbiol.* **52(3)**:211-7.
- LUDER, C.G.K; GROSS, U.; LOPES, M.F. (2001). Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. *Trends in parasitology*, **17 (10)**: 480-486.
- MACKENZIE, A.; SURPRENANT, A.M.; YOUNG, M.; ADINOLFI, E. (2005). Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X7 receptors. *J Biol Chem.* **280**: 33968-76.
- MACKENZIE A, WILSON HL, KISS-TOTH E, DOWER SK, NORTH RA, SURPRENANT A.(2001). Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding.*Immunity.* **15(5)**:825-35.
- MACKENZIE, A.B.; SURPRENANT, A.; NORTH, R.A. (1999). Functional and molecular diversity of purinergic ion channel receptors. *Ann N Y Acad Sci.* , **868**:716-29.
- MAIOLLI, T. U., ET AL.(2004).Immune response induced by New World Leishmania species in C57Bl/6 mice. *Parasitology Research*, **94**: 207-212.

MAMEDOVA LK, GAO ZG, JACOBSON KA. (2006). Regulation of death and survival in astrocytes by ADP activating P2Y1 and P2Y12 receptors. *Biochem Pharmacol.* **72(8)**:1031-41.

MANTUANO-BARRADAS M, HENRIQUES-PONS A, ARAUJO-JORGE TC, DI VIRGILIO F, COUTINHO-SILVA R, PERSECHINI PM. (2005). Extracellular ATP induces cell death in CD4+/CD8+ double-positive thymocytes in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect.* **5(15)**:1363-71.

MELO AC, MOELLER PD, GLASGOW H, BURKHOLDER JM, RAMSDELL JS. (2001). Microfluorimetric analysis of a purinergic receptor P2X7 in GH4C1 rat pituitary cells: effects of a bioactive substance produced by *Pfiesteria piscicida*. *Environ. Health Perspect.* **109**:731-7

MESHKI, J.; GARCIA, A.; KUNNAPULI, S.(2006). Signaling pathways downstream of P2 receptors in human neutrophils. *Purinergic signalling.* **2**:537-544.

MEYER-FERNANDES JRSAAD-NEHME J, PERES-SAMPAIO CE, LOPES AH, SOUTO-PADRON T. (2004). A Mg-dependent ecto-ATPase is increased in the infective stages of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res.* **93(1)**:41-50.

MOORE KJ, TURCO SJ, MATLASHEWSKI G.(1994). *Leishmania donovani* infection enhances macrophage viability in the absence of exogenous growth factor. *J Leukoc Biol.*, **55(1)**:91-8.

MORELLI, A.; FERRARI, D.; BOLOGNESI, G.; RIZZUTO, L.; DIVIRGILLIO, F. (2001). Proapoptotic plasma membrane pore: P2X7 receptor. *Drug dev Res*, **52**: 571-578.

MORELLI, A, CHIOZZI P, CHIESA A, FERRARI D, SANZ JM, FALZONI S, PINTON P, RIZZUTO R, OLSON MF, DI VIRGILIO F .(2003). Extracellular ATP causes ROCK I-dependent bleb formation in P2X7-transfected HEK293 cells. *Mol Biol Cell.* **14(7)**:2655-64.

MURGIA M, PIZZO P, STEINBERG TH, DI VIRGILIO F.(1992). Characterization of the cytotoxic effect of extracellular ATP in J774 mouse macrophages. *Biochem J.* **288 (Pt 3)**:897-901.

NASH, P.B. ET AL. (1998). *Toxoplasma gondii* infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J. Immunol.* **160**, 1824–1830.

NIHEI, O.K.; DE CARVALHO, A.C.; SAVINO, W.; ALVES, L.A. (2000). Pharmacologic properties of P(2Z)/P2X(7) receptor characterized in murine dendritic cells: role on the induction of apoptosis. *Blood.* **96(3)**:996-1005.

NGUEWA, P.A.; FUERTES, M.A.; VALLADARES, B.; ALONSO, C.; PEREZ, J.M.(2004). Programmed cell death in trypanosomatids: a way to maximize their biological fitness? *Trends Parasitol*, **20(8)**:375-80.

NORTH,R.A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol.Rev.***82**: 1013-1067

NOVAK, I. (2003). ATP as a signaling molecule: the exocrine focus. *News Physiol Sci*. **18**:12-7.

OKUDA, A.; FURUYA, K.; KIYOHARA, T.(2003). ATP-induced calcium oscillations and change of P2Y subtypes with culture conditions in HeLa cells. *Cell Biochemistry and function*, **21**: 61-68.

OMS (WHO) – Site da Organização Mundial de Saúde. Disponível [www.who.int/tdr/disease/leish/lifecycle.htm](http://www.who.int/tdr/disease/leish/lifecycle.htm) no dia 12/12/2005.

OOIJ, C.; APODACA, G.; ENGEL, J.(1997). Characterization of the *Chlamydia trachomatis* vacuole and its interaction with the host endocytic pathway in HeLa cells. *Infection and immunity* , **65(2)**: 758-766.

OSHIMI, Y.; MIYAZAKI, S.; ODA, S. (1999). ATP-induced Ca<sup>2+</sup> response mediated by P2U and P2Y purinoceptors in human macrophages: signalling from dying cells to macrophages. *Immunology*, **98(2)**:220-7.

OUAISSI, A.(2003). Apoptosis-like death in trypanosomatids: search for putative pathways and genes involved. *Kinetoplastid Biol Dis.*, **2(1)**:1-5.

PERREGAUX, D.G.; GABEL, C.A.(1998). Human monocyte stimulus-coupled IL-1beta posttranslational processing: modulation via monovalent cations. *Am J Physiol*, **275(6 Pt 1)**:C1538-C1547.

PINHEIRO CM, MARTINS-DUARTE ES, FERRARO RB, FONSECA DE SOUZA AL, GOMES MT, LOPES AH, VANNIER-SANTOS MA, SANTOS AL, MEYER-FERNANDES JR.(2006). *Leishmania amazonensis*: Biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. *Exp Parasitol*. **114(1)**:16-25.

PFEIFFER, A.A.; AGA, M.; HALL, D.J.; BERTICS, P.J. (2004). The nucleotide receptor P2X7 mediates actin reorganization and membrane blebbing in RAW 264.7 macrophages via p38 MAP Kinase and Rho. *Leukocyte Biology*. **75(6)**:1173-82.

PUNJ, V.; ZABORINA, O.; DHIMAN, N.; FALZARI, K.; BAGDASARIAN, M.; CHAKRABARTY, A.M. (2000). Phagocytic cell killing mediated by secreted cytotoxic factors of *Vibrio Cholerae*. *Infect Immun*. **68**: 4930-4937.



- RABINOVITCH, M. (1992). Transfer of Zymosan (Yeast Cell Walls) to the parasitophorous vacuoles of macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J. Exp. Med.*, **176**:639-646.
- RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **50**: 413-492.
- RASMUSSEN, B.; DESCOTEAUX, A. (2004). Contribution of electron and confocal microscopy in the study of *Leishmania*-macrophage interactions. *Microsc Microanal.*, **10(5)**:656-61.
- RITCHIE, A.; KOCHUKOV, M.(2005). P2X7 receptor stimulation of membrane internalization in a thyrocyte cell line. *J. Membrane Biol.*, **204**:11-21.
- ROY, S.; SAHA, B.; TONKAL, A.; CROFT, S.(2004). Mast cells at the host-pathogen interface: host-protection versus immune evasion in leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* **137(1)**:19-23
- RUBIO, M.E., SOTO, F. (2001).Distinct localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J. Neurosci* **21(2)**: 641-53.
- RUHLAND, A.;LEAL, N.; KIMA,P.E. (2006). *Leishmania* promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. *Cellular Microbiology. Article in press Aug 2*
- RUDEL, T.(2001). Epithelial cells infected with *Chlamydomypha pneumoniae* are resistant to apoptosis. *Infection and Immunity*, **69**: 7880-7888.
- RUSSEL, D.G. & TALAMAS-ROHANA, P.(1991). *Leishmania* and the macrophage: a marriage of inconvenience. *Immunol. Today*, **10**:328-333.
- SANTIAGO-PEREZ LI, FLORES RV, SANTOS-BERRIOS C, CHORNA NE, KRUGH B, GARRAD RC, ERB L, WEISMAN GA, GONZALEZ FA. (2001). P2Y(2) nucleotide receptor signaling in human monocytic cells: activation, desensitization and coupling to mitogen-activated protein kinases. *J Cell Physiol.* ,**187(2)**:196-208.
- SACKS D, NOBEN-TRAUTH N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.* **2(11)**:845-58.
- SABIROV, R.Z.; ZAMARAEVA, M.V.; OKADA, Y. (2005). Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase. *Cell Death Differ.* **12(11)**:1390-7.

SAUNDERS L. (2003). Molecular aggregation in aqueous dispersions of phosphatidyl and lysophosphatidyl cholines. *Biochim Biophys Acta*. **125(1)**:70-4.

SELLERS,L.A.; SIMON,J.; LUNDAHL,T.S.; COUSENS,D.J.; HUMPHREY,P.P.; BARNARD,E.A. (2001). Adenosine nucleotides acting at the human P2Y1 receptor stimulate mitogen-activated protein kinases and induce apoptosis. *J.Biol.Chem.* **276**: 16379-16390.

SCOTT C.C.; BOTELHO, R.J.; GRINSTEIN, S. (2003). Phagosome Maturation: A few bugs in the system. *J membrane Biol.* **193**:137-152.

SHER, A.; SACKS, D. (2002). Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature*, **3**:1038-1047.

SIKORA, A.; LIU, J.; BROSNAN, C.; BUELL, G.; CHESSEL, I.; BLOOM, BR. (1999). Purinergic signaling regulates radical-mediated bacterial killing mechanisms in macrophages through a P2X7-independent mechanism. *J Immunol*, **163(2)**:558-561.

SLUYTER,R.; SHEMON,A.N.; BARDEN,J.A.; WILEY,J.S.(2004). Extracellular ATP Increases Cation Fluxes in Human Erythrocytes by Activation of the P2X7 Receptor. *J.Biol.Chem.* **279**: 44749-44755.

SMALL, N. V.; EUROPE-FINNER, G.M.; NEWELL, P.C. (1987). Adaptation to chemotactic cyclic AMP signals in Dictyostelium involves the G-protein. *J Cell Sci.* **88** : 537-45.

SMITH, R.A.; ALVAREZ, A.J.; ESTES, D.M.(2001). The P2X7 purinergic receptor on bovine macrophages mediates mycobacterial death. *Vet Immunol Immunopathol* **78(3-4)**:249-262.

SOARES, R.M.A.; SANTOS, A.L.S.; BONALDO, M.C.; ANDRADE, A. F.B.; ALVIANO; C. S.; ANGLUSTER, J.; GOLDENBERG,S. (2003). *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: diferencial expression of proteinases and cell-surface polypeptides in avirulent and virulent promastigotes. *Experimental Parasitology* ,**104**: 104–112.

STEINBERG TH, NEWMAN AS, SWANSON JA, SILVERSTEIN SC.(1987). ATP4-permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. *J Biol Chem.* **262(18)**:8884-8.

SOTO. F., GARCIA-GUZMAN, M., GOMEZ-HERNANDEZ J.M., HOLLMANN, M., KARSCHIN, C., STUHMER, W. (1996). P2X4: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93(8)**: 3684-8

STAFFORD, J.L.; NEUMANN, N.F.; BOLOSEVIC, M. (2002). Macrophage-Mediated Innate Host Defense Against Protozoan Parasites. Macrophage interactions with protozoa. *Crit Rev Microbiol.*, **28(3)**:187-248. Review.

STOBER, C.B.; LAMMAS, D.A.; LI, C.M.; KUMARARATNE, D.S.; LIGHTMAN, S.L.; MCARDLE, C.A. (2001). ATP-Mediated Killing of *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin Within Human Macrophages Is Calcium Dependent and Associated with the Acidification of Mycobacteria-Containing Phagosomes. *J Immunol*, **166(10)**:6276-6286.

SUPRENANT, A.; HASSENDREN, F.; KAWASHINA E.; NORTH, B.A.; BUELL, G. (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as P2X receptor (P2X7). *Science*. **272**: 735-738.

SUGIYAMA,T.; KAWAMURA,H.; YAMANISHI,S.; KOBAYASHI,M.; KATSUMURA,K.; PURO,D.G. (2005). Regulation of P2X7-induced pore formation and cell death in pericyte-containing retinal microvessels. *Am.J.Physiol.Cell Physiol*. **288**, C568-C576.

TANG, H.; CYSTER, J.C. (1999). Chemokine up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science*, **284**: 819-822.

THARDIN, J. F.; M'RINI, C.; BERAUD, M.; VANDAELE, J.; FRISACH,F.; BESSIERES, M.H.; SEGUELA.(1993). Eicosanoid Production by Mouse Peritoneal Macrophages during *Toxoplasma gondii* Penetration: Role of Parasite and Host Cell Phospholipases. *Infection and Immunity*, **61(4)**: 1432-1441.

TORRES-SANTOS, E.C.; MANTUANO, M.B.; PERSECHINI, P.M.; COUTINHO-SILVA, R.; ROSSI-BERGMAN, B. (2000). Enhanced macrophage permeabilization induced by ATP upon *Leishmania* Infection. *Drug Development Research. Purines*. **(1)**:31-36

TORRES-SANTOS, E.C. (2002). A 2-6-diidroxi-4-metoxichalcona (DMC) como um novo inibidor da síntese de ergosterol e a utilização de ATP extracelular e nanopartículas como ferramentas para o tratamento da leishmaniose.Orientador: Bartira Rossi-Bergman. Rio de Janeiro, UFRJ/CCS, 112p. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas-Biofísica).

TOURE-BALDE, A. *ET AL.* (1995). Acute *Plasmodium falciparum* infection is associated with increased percentages of apoptotic cells. *Immunol. Lett.*, **46**: 59-62.

TOURE-BALDE, A. *ET AL.* (1996). *Plasmodium falciparum* induces apoptosis in human mononuclear cells. *Infect. Immun.* **64**, 744-750.

TWOMEY C, MCCARTHY JV. (2005). Pathways of apoptosis and importance in development.*J Cell Mol Med*. **9(2)**:345-59.

VACCA, F.; AMADIO, S.; VOLONTÉ, C. (2004). P2X3 Receptor localizes into lipid rafts in neuronal cells. *J. Neurosc. Research*. **76**:653-661.

VERHOEF, P.A.; ESTACION, M.; SCHILLING, W.; DUBYAK, G.R. (2003). P2X7 receptor-dependent blebbing and the activation of Rho-effector kinases, caspases, and IL-1 beta release. *J. Immunol*. **170**: 5728-5738.

VIRGINIO, C.; MACKENZIE, A.; NORTH, R.A.; SURPRENANT, A. (1999). Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor. *J. Physiol. (London)*. **519**: 335-346.

VOLONTÉ, C.; AMADIO, S.; D'AMBROSI, N.; COLPI, M.; BURNSTOCK, G. (2006). P2 receptor web: complexity and fine-tuning. *Pharmacol Ther*. **112(1)**:264-80.

ZIMMERMANN, H. (2001). Ectonucleotidases : Some Recent Developments and a Note on Nomenclature. *Drug Dev. Res*. **52**: 44-56.

ZIMMERMANN, H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*. **362**: 299-309.

WEBB, T.E.; SIMON, J.; KRISHEK, B.J. (1993). Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett*. **324**: 219-225.

WANG, Q.; WANG, L.; FENG, Y.H.; LI, X.; ZENG, R.; GORODESKI, G.I. (1999). P2X7 receptor-mediated apoptosis of human cervical epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. **287(5)**:C1349-58.

WANG Q, LI X, WANG L, FENG YH, ZENG R, GORODESKI G. (2004). Anti-apoptotic effects of estrogen in normal and in cancer human cervical epithelial cells. *Endocrinol*. **145(12)**:5568-79.

WATTERS, J.; SOMMER, J.; FISETTE, P.; PFEIFFER, Z.; AGA, M.; PRAHBU, L.; GUERRA, A.; DENLINGER, L. BERTICS, P. (2001). P2X7 nucleotide receptor: modulation of LPS-induced macrophage signaling and mediator production. *Drug Dev. Res*. **53**: 91-104.

WORTHINGTON, R.A.; SMART, M.L.; GU, B.J. (2002). Point mutations confer loss of ATP-induced human P2X7 receptor function. *FEBS Lett*. **512**: 43-46.

WORTHINGTON, R.A.; HANSEN, M.A.; BENNETT, M.R.; BARDEN, J.A.; BALCAR, V.J. (1998). Ligand recognition sites on P2X receptors studied by quantitative autoradiography of [<sup>3</sup>H]alpha,beta-methylene-ATP binding in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*. **249(1)**:166-71.

# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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