Luana Cristina Faria Carvalho

Efeito de ectonucleotidases de *Leishmania* sobre a produção de IL-1β em células dendríticas

Ouro Preto

2018

Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Efeito de ectonucleotidases de *Leishmania* sobre a produção de IL-1β em células dendríticas

Aluna: Luana Cristina Faria Carvalho

Orientador: Luís Carlos Crocco Afonso

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título em Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Imunobiologia de Protozoários

Ouro Preto
2018

C253e Carvalho, Luana Cristina Faria.
Efeito de Ectonucleotidase de Leishmania sobre a produção de IL- beta em células dendríticas [manuscrito] / Luana Cristina Faria Carvalho. - 2018.
62f.: il.: grafs.

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. Leucócitos. 2. Ectonucleotidase. 3. Leishmania. I. Afonso, Luís Carlos Crocco. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Titulo.

CDU: 611.018.53

Catalogação: www.sisbin.ufop.br

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

UFOP

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 02 dias do mês de fevereiro do ano de 2018, às 09:00 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação da mestranda Luana Cristina Faria Carvalho, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Luis Carlos Crocco Afonso (Presidente - UFOP), pelo Prof. Andre Talvani Pedrosa da Silva (Membro - UFOP), pela Profa. Fabiana Simao Machado (Membro - Externo). Dando início aos trabalhos, o presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de dissertação, concedeu à mestranda Luana Cristina Faria Carvalho 30 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Efeito de Ectonucleotidases de Leishmania Sobre a Produção de Il-1 em Células Dendríticas", na área de concentração: Imunobiologia de Protozoários. Terminada a exposição, o presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo máximo de 45 minutos, para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da dissertação, na seguinte ordem: Primeiro, Profa. Fabiana Simao Machado; segundo, Prof. Andre Talvani Pedrosa da Silva; terceiro, Prof. Luis Carlos Crocco Afonso. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, o presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a mestranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da dissertação deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela mestranda. Ouro Preto, 02 de fevereiro de 2018.

Presidente: _____

Membro: _____

Membro: _____

Mestrando: Luana Cristina Faria Carvalho

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

“A persistência é o caminho do êxito”
Charles Chaplin

Agradeço a Deus pela dádiva da vida, e por ter ajudado não apenas a manter a fé e a esperança nos momentos mais difíceis, mas também a conquistar mais uma etapa da minha vida.

À minha Mãe, por ter me apoiado e por diversas vezes ter me compreendido. Agradeço ao meu Pai (em memória) pela proteção. Aos meus Irmãos pelo incentivo. Ao Matheus pelo incentivo, apoio e companheirismo de todos os dias. Aos demais familiares que me apoiaram em todos os momentos durante minha formação.

Agradeço ao Professor Luís Carlos Crocco Afonso pela orientação, pela confiança depositada, pela paciência e pelos anos de convivência. Obrigada pelas motivações, compreensões, direcionamentos e carinho. Tenho a certeza que hoje sou mais madura para seguir na carreira acadêmica.

Aos meus colegas do LIP, meus sinceros agradecimentos por todos os momentos vividos juntos, pelas pausas para o "café", pelos lanches e gordices rsrs. Agradeço em especial à Míriam, Ive, Flávia e Amanda pelas sugestões, incentivo e amizade. Não poderia deixar de agradecer a todos os alunos de iniciação científica, em especial ao Flávio pela amizade e conversas.

Aos técnicos Leandro e Marcorélio por manterem o laboratório em andamento.

Agradeço aos Professores e demais funcionários do NUPEB e à UFOP.

Aos amigos e companheiros que me apoiaram durante essa jornada e a tornaram mais prazerosa.

Células dendríticas (DC) são essenciais para a montagem da resposta imune inata e para a conexão das respostas inata e adquirida, inclusive durante a infecção por *Leishmania*. Vários estudos têm apresentado a importância da sinalização purinérgica, como o papel das E-NTPDases do parasito, no processo de infecção. O objetivo deste trabalho foi avaliar se *Leishmania* com variações na atividade ENTPDase são capazes de modular a produção de IL-1β por células dendríticas. A atividade ectonucleotidásica foi avaliada pela hidrólise de fosfato inorgânico por incubação de formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* e *L. major* com ATP, ADP ou AMP. Observamos que ambas apresentam semelhante atividade enzimática. Avaliamos a correlação entre liberação de IL-1β por DC infectadas por *Leishmania* e tratadas com LPS e ATP e atividade enzimática de *Leishmania* e verificamos que houve forte correlação, sobretudo sobre ATP e ADP. Além disso, uma vez reduzida a atividade enzimática, houve uma redução do percentual de células infectadas. Como adenosina poderia estar envolvida no processo de indução da liberação de IL-1β verificamos que o tratamento de DC com análogo de adenosina aumentou a liberação de IL-1β. Verificamos, ainda, que o tratamento com inibidores dos receptores de adenosina, SCH 58261 (receptor A2a) e MRS 1454 (receptor A2b) foi capaz de reduzir significativamente a liberação de IL-1β por DC infectadas. Não obstante, verificamos o envolvimento do receptor P2X7 no processo de geração de IL-1β e analisamos que o bloqueio do receptor por P2X7 suficiente para reduzir a liberação de IL-1β pelas DC infectadas tanto por *L. amazonensis* como por *L. major*. Concluímos que a ENTPDase de *Leishmania* é um importante fator de virulência, capaz de induzir a hidrólise de ATP para geração de adenosina e estimular o possível curso da infecção em favor do parasito pela produção de IL-1β.

Palavras-Chave: Célula Dendrítica; *Leishmania*; Ectonucleotidases; IL-1β.

Dendritic cells (DC) are essential for the assembly of the innate immune response and for the connection of innate and acquired responses, including during *Leishmania* infection. Several studies have presented the importance of purinergic signaling, such as the role of E-NTPDases, in the process of infection by parasites of the genus *Leishmania*. The objective of this work was to evaluate whether *Leishmania* with variations in ENTPDase activity are able to modulate the production of IL-1β by dendritic cells. The ectonucleotidase activity was evaluated by hydrolysis of inorganic phosphate by incubation of metacyclic promastigote forms of L. *amazonensis* and *L. major* with ATP, ADP or AMP. We observed that both presented similar enzymatic activity. We evaluated the correlation between IL-1β release by *Leishmania*-infected DC and treated with LPS and ATP and *Leishmania* enzymatic activity and we observed a strong correlation, especially when ATP and ADP were used as substrates. Furthermore, once the enzymatic activity was concomitant decrease, there was a reduction in the percentage of infected cells. As adenosine could be involved in the induction process of IL-1β release we found that treatment of DC with NECA, an adenosine analogue, was able to increase the release of IL-1β. In addition, we found that treatment with adenosine receptor inhibitors, SCH 58261 (A2a receptor) and MRS 1754 (A2b receptor) was able to significantly reduce the release of IL-1β by infected DCs. Nevertheless, we evaluated the involvement of the P2X7 receptor in the generation of IL-1β and analyzed that the receptor blockade by A730004 was sufficient to promote the reduction of IL-1β release by DC infected by both *L. amazonensis* and *L. major*. We conclude that *Leishmania* ENTPDaseis an important virulence factor capable of inducing ATP hydrolysis to generate adenosine and to stimulate the possible course of infection in favor of the parasite by the production of IL-1β.

Keywords: Dendritic Cell; *Leishmania*; Ectonucleotidases; IL-1β.

Lista de figuras..... IX

Siglas..... X

1. Introdução..... 13
2. Revisão bibliográfica..... 14
2.1 Sinalização purinérgica: molécula de ATP e receptores purinérgicos..... 14
2.2 Ectonucleotidases..... 15
2.3 Características do receptor P2X7: importância do reconhecimento da molécula de ATP..... 16
2.4 Inflamassoma e citocina IL-1β..... 17
2.5 *Leishmania*s e fatores de virulência..... 19
2.6 Resposta imune frente a infecção por *Leishmania*..... 21
2.7 *Leishmania*, células dendríticas e sinalização purinérgica..... 22
3. Justificativa..... 25
4. Objetivos..... 26
4.1 Objetivo Geral..... 26
4.2 Objetivos Específicos..... 26
5. Materiais e Métodos..... 27
5.1 Cultivo celular..... 27
5.2 Parasitos..... 27
5.3 Avaliação da atividade enzimática por de hidrólise de nucleotídeos..... 28
5.4 Infecção de células dendríticas *in vitro* e ativação da via de IL-1β..... 28
5.5 Determinação da produção de IL-1β..... 29
5.6 Análise estatística..... 29
6. Apresentação de Resultados e Discussão.....
6.1 Atividade ectonucleotidásica de diferentes espécies de *Leishmania: Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) major*..... 30
6.2 Parasitos do gênero *Leishmania* são capazes de induzir a liberação de IL-1β por células dendríticas tratadas com LPS e ATP..... 31
6.3 A modulação da atividade enzimática de parasitos do gênero *Leishmania* reduz a liberação de IL-1β..... 37
6.4 A adenosina é importante para promover a liberação de IL-1β por células dendríticas infectadas..... 40
6.5 A liberação de IL-1β por células dendríticas infectadas é dependente do receptor P2X7..... 43
7. Conclusão...... 48
8. Referências bibliogràficas..... 49

Figura 1: Atividade ectonucleotidásica de diferentes espécies do gênero *Leishmania*..... 28

Figura 2: Via de liberação de IL-1β por células dendríticas infectadas..... 30

Figura 3: Correlação de atividade ectonucleotidásica e liberação de IL-1β após tratamento com LPS+ATP..... 32

Figura 4: Infecção de células dendríticas por *L. amazonensis* e *L. major*..... 33

Figura 5: Liberação de IL-1β por células dendríticas infectadas por *L. amazonensis* e *L. major* na presença de inibidores de ENTPDase..... 36

Figura 6: Infecção de células dendríticas por *L. amazonensis* e *L. major* na presença de inibidores de E-NTPDase..... 37

Figura 7: Células dendríticas tratadas com NECA são capazes de liberarem IL-1β..... 39

Figura 8: A adenosina é importante para promover a liberação de IL-1β por células dendríticas infectadas..... 40

Figura 9: O receptor P2X7 possui papel na liberação de IL-1β por células dendríticas infectadas..... 42

Figura 10: Infecção de células dendríticas por *L. amazonensis* e *L. major* na presença de inibidores de P2X..... 43

Figura 11: Viabilidade de células dendríticas..... 44

ACR: *apyrase conserved regions*- "regiões conservadas da apirase"

ADO: adenosina

ADP: difosfato de adenosina

AMP: monofosfato de adenosina

ATP: trifosfato de adenosina

ATPe: trifosfato de adenosina extracelular

ATPi: trifosfato de adenosina intracelular

E-NTPDase: ectonucleosídeo 5'-trifosfato difosfohidrolase

GP63- Glicoproteína de *Leishmania* com 63 kDa de massa molecular

IFN-y: interferon gama

IL: interleucina

iNOS: enzima óxido nítrico sintase induzível

IP3: inositol trifosfato

LPG: lipofosfoglicano

LPS: lipossacarídeo

MAC: complexo de ataque à membrana

NK: natural killer

NLR: receptores to tipo NOD

NTPDase: nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

PBS: salina tamponada com fosfato

Pi: fosfato inorgânico

ROS: espécies reativas de oxigênio

SFB: soro fetal bovino

SNC: sistema nervoso central

TGF: fator de transformação do crescimento

TLR: Receptor do tipo Toll

TNF: fator de necrose tumoral

1. Introdução

Os nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP) e o seu nucleosídeo derivado, a adenosina, atuam no meio extracelular como moléculas sinalizadoras (Zimmermann, 2001) envolvidas em diversas funções celulares e alterações fisiológicas da sinalização purinérgica, que podem resultar em modulação da resposta imune (Burstock, 2003; Bours e cols., 2006). Estas moléculas sinalizadoras, juntamente com os seus receptores de membrana, compõem o chamado sistema purinérgico (Burstock, 2003).

Os receptores purinérgicos para nucleotídeos estão envolvidos em processos de modulação da inflamação e resposta imune (Di Virgilio e cols., 2001) e podem ser divididos em duas subclasses: acoplados a proteína G, chamados de P2Y, e os ligados a canais iônicos, designados P2X (Ralevic e Burnstock, 1998). Os receptores para adenosina em mamíferos podem ser classificados em A1, A2A, A2B e A3 e são amplamente expressos em várias células imunes (macrófagos, células dendríticas, neutrófilos), funcionando como reguladores imunológicos (Antonioli e cols., 2014).

Dentre as enzimas do sistema purinérgico, as ectonucleotidases atuam na regulação dos níveis extracelulares dos nucleotídeos. Dentre elas destacam-se as famílias ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase), responsáveis pela hidrólise de ATP à sua forma monofosfatada, e a ecto-5'- nucleotidase (E-5'NT) que hidrolisa AMP à adenosina (Zimmermann, 2001). Estas enzimas são amplamente distribuídas na natureza e já foram estudadas em diversos micro-organismos (*Tripanosoma cruzi, Toxoplasma gondii)*, dentre eles em protozoários do gênero *Leishmania* (Meyer-Fernandes e cols., 1997; Berrêdo-Pinho e cols., 2001).

Estudos de nosso laboratório sugerem que as ENTPDases de *Leishmania* possuem papel importante sobre a sinalização purinérgica do hospedeiro, funcionando como fator de virulência e exercendo um papel modulador sobre a resposta imune mediada pela geração de adenosina extracelular a partir da hidrólise de ATP (Marques-da-Silva e cols; 2008; Leite e cols., 2010; Gomes e cols., 2015).

Na literatura alguns trabalhos já demonstraram que diferentes espécies de *Leishmania* são capazes de induzirem a liberação de IL-1β (Lima-Júnior e cols., 2013; Young e cols., 2010), mas os mecanismos envolvidos neste processo ainda são pouco conhecidos. Assim, objetivamos verificar se a atividade enzimática de *Leishmania* possa contribuir para a modulação da liberação de IL-1β por células dendríticas infectadas, uma vez que a liberação de IL-1β é dependente do ATP extracelular (Young e cols., 2010).

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Sinalização purinérgica: molécula de ATP e receptores purinérgicos

A sinalização purinérgica consiste em um conjunto de componentes que possuem papel importante no processo de modulação da resposta inflamatória e imunológica (Burstock, 2003).

O ATP e outros nucleotídeos e nucleosídeos de adenina são moléculas encontradas no organismo de mamíferos e são responsáveis por modularem a resposta celular (Burnstock e cols., 1972; Burnstock e cols., 2006). Sabe-se que o ATP intracelular é primariamente direcionado para processos energéticos (transporte ativo, biossíntese celular, etc) (Yegutkin, 2008), porém, em situações de injúria, dano celular, apoptose, entre outros, a molécula de ATP é direcionada para o meio extracelular e, portanto, passa a ser considerada uma importante e crítica molécula sinalizadora de perigo do sistema purinérgico (Zimmermmen, 2000; Yegutkin, 2008).

Os sinais gerados são capazes de alertar a resposta imune em relação ao dano tecidual (La Sala, 2003). Estudos já demonstraram que este nucleotídeo está envolvido na adesão de neutrófilos ao endotélio vascular e consequentemente migração para locais danificados, além de estimular a fagocitose e ativar os mecanismos microbicidas destas células (Freyer e cols., 1988; Oryu e cols., 1996; Rounds e cols., 1999). Além disso, tem demonstrado papel importante no recrutamento de monócitos e na produção de imunomediadores por macrófagos, como IL-1α, IL-6 (Lemaire e Leduc, 2003), IL-18 (Mehta e cols., 2001), TNF-α (Guerra e cols., 2003), IL-1β (Mehta e cols., 2001; Ferrari e cols., 2004), ROS (Suh e cols., 2001) e óxido nítrico (Sperlagh e cols., 1998).

Em células dendríticas, o ATP extracelular induz sua diferenciação para um perfil pró-inflamatório (La Sala e cols., 2001) e em linfócitos tem sido apontado como uma molécula indutora de proliferação, ativação de linfócitos T citolíticos e migração de linfócitos ativados para os locais de inflamação (DosReis e cols., 1986).

Assim, considerando altas concentrações do ATP no meio extracelular durante injúria celular ou infecção, este irá atuar em receptores específicos na membrana celular, denominados receptores purinérgicos (Trautmann, 2009). Os receptores purinérgicos podem ser divididos em receptores P1 e P2. Os receptores P2 podem ser subdivididos em receptores P2X e P2Y. Os receptores P2X (P2X1-7R) são receptores ionotrópicos, ligados à canais iônicos, que quando ativados resultam na abertura de um poro na membrana celular, tornando-a permeável a

passagem de cátions, como ocorre o efluxo de K^+ e influxo de Na^+, Ca^+ (Browne e cols., 2010; Young, 2010). Estes receptores são encontrados na superfície de diversas células do sistema imune e são caracterizados por se ligarem ao ATP extracelular (eATP), com variações em sua sensibilidade. Neste sentido, os receptores P2X1-6 são mais sensíveis ao ATP (1 a 5μM) e os receptores P2X7 são responsivos a faixas acima de 100μM (Cekic e Linden, 2016).

Os receptores P2Y (P2Y1-14R) são receptores acoplados à proteína G (Di Virgilio e cols., 2001) e apresentam ampla especificidade. Os receptores P2Y1 e P2Y11 são específicos para purinas, enquanto P2Y4 e P2Y6 são específicos de pirimidinas. P2Y2 apresenta seletividade mista e P2Y12 e P2Y13 respondem apenas a ADP e P2Y14 a UDP (Bours e cols., 2006). Além disso, os receptores P2Y1, P2Y2, P2Y4 e P2Y6 são capazes de aumentar inositol trifosfato (IP3) e cálcio citosólico (Burnstock, 2007). Recentemente, Martinez e cols (2016) demonstraram que o receptor P2Y2, um importante modulador de respostas glióticas após lesão do sistema nervoso central (SNC) é capaz de ser regulado por microdomíneos de membrana, como as caveolinas (Martinez e cols., 2016).

A adenosina, produto da hidrólise de ATP, é uma importante molécula anti-inflamatória, e tem sido amplamente investigada devido à sua capacidade de regular a homeostase imunológica através da ativação de receptores do tipo P1 que são subdivididos em quatro receptores específicos acoplados à proteína G, classificados como: A1, A2A, A2B e A3, os quais são amplamente expressos em várias células do sistema imunológico, dentre elas as células dendríticas (Antonioli e cols., 2014).

Os receptores A2, acoplados à proteína GαS, apresentam alta afinidade pela molécula de adenosina e são conhecidos por estimularem a enzima adenilato ciclase e consequentemente favorecerem a produção de AMPc e a ativação de vias de fosforilação de fatores de transcrição e quinases (Abbracchio e Ceruti, 2007; Cekic e Linden, 2016). Os receptores A1 (acoplado à proteína Gα1) e A3 (acoplado à proteína GαQ) possuem função inversa aos receptores A2A e A2B, apresentando baixa afinidade pela molécula de adenosina e sendo capazes de ativarem a fosfolipase e induzirem aumento de cálcio intracelular (Abbracchio e Ceruti, 2007; Cekic e Linden, 2016).

2.2 Ectonucleotidases

Como já mencionado, em situações de injúria, as altas concentrações de ATPe são capazes de estimular uma cascata inflamatória e consequentemente modular a resposta imune (La Sala e cols., 2003). Estas funções são realizadas por meio de importantes enzimas que estão

presentes em diversas populações celulares, como macrófagos e células dendríticas (Kumar e Sharma, 2009). Destacam-se a ectonucleotidase trifosfato difosfohidrolase (ENTPDase), que hidrolisa o ATP (molécula inflamatória) em ADP e AMP, e também a ecto-5'-nucleotidase que produz adenosina (anti-inflamatória) mediante a hidrólise de AMP (Zimmermann, 2001).

As enzimas das famílias ENTPDases são enzimas capazes de hidrolisar nucleosídeos tri ou difosfatos à sua forma monofosfatada (AMP). Esta molécula, por sua vez, pode sofrer hidrólise pela ecto-5'-nucleotidase e também pelas fosfatases alcalinas (Zimmermann e cols. 2000), favorecendo a produção e consequentemente a via de sinalização mediada pela adenosina. São enzimas que compartilham cinco regiões altamente conservadas, denominadas "regiões conservadas da apirase", ACR (ACR 1- 5 *apyrase conserved regions*), que apresentam grande importância na estimulação da atividade (Zimmermann, 2000).

A família de NTPDases compreende um grupo de 8 enzimas, que foram até então descritas, das quais as NTPDase 1,2,3 e 8 são ancoradas na membrana celular e possuem o sítio catalítico voltado para a porção extracelular. As NTPDases 5 e 6 são conhecidas por serem secretadas e as NTPDases 4 e 7 são caracterizadas por serem intracelulares e com sítios catalíticos voltados para o lúmen de organelas (Robson e cols., 2006).

Estas enzimas são, também, encontradas em alguns protozoários, como *Toxoplasma gondii* (Asai e cols.,1995), *Leishmania amazonensis* (Pinheiro e cols., 2006), *Trichomonas vaginalis* (Tasca e cols., 2003) e *Trypanosoma cruzi* (Meyer-Fernandes e cols., 2004) e a ação sequencial das E-NTPDases e ecto-5'- nucleotidase tem sido caracterizada por modular a resposta imunológica. Esta cascata enzimática pode ser utilizada por alguns patógenos (Sansom e cols., 2008), sobretudo por tripanosomatídeos como parasitos do gênero *Leishmania*, que não fazem a síntese *de novo* de purinas (Marr e cols., 1978). Assim, necessitam destas enzimas para alimentar a via de salvação de purinas, através da recaptação de purinas pré-formadas do ambiente do hospedeiro e satisfazer suas exigências de nucleotídeos e garantir seu desenvolvimento (Carter e cols., 2008).

2.3 Características do receptor P2x7: importância do reconhecimento da molécula de ATP

O receptor P2X7 é um receptor de membrana (Dubyak e Moatassim, 1993; North, 2002) que apresenta como ligante natural o ATP (Ralevic e Burnstock, 1998; Volonté e cols, 2011). É importante destacar suas características, pois este é um receptor que apresenta baixa afinidade pelo ATP e, portanto, somente é ativado em tecidos intensamente inflamados que apresentam

concentrações de ATP acima de 100μM (Khakh e North, 2012). Atualmente, os estudos disponíveis na literatura avaliam seus efeitos *in vitro* utilizando elevadas concentrações de ATP, que se estendem de 1mM ou valores superiores (La Sala e cols., 2003; Donnelly –Roberts e Jarvis, 2007; Coddou e cols., 2011). Além disso, estes receptores podem formar poros maiores que os receptores de sua classe e assim permitir a passagem e secreção de grandes moléculas, incluindo o próprio ATP (Pellegatti e cols, 2005; Cekic e Linden, 2016).

A ativação do receptor P2X7 está associada com o efluxo de K^+ e influxo de Na^+ e Ca^+, que tem sido apontado como um cofator para ativação do inflamassoma e secreção de citocinas inflamatórias por células. A ativação prolongada tem sido associada com a morte celular por apoptose (Wiley e cols., 2011), sendo que, na ausência do seu ligante, ele pode favorecer a fagocitose de partículas estranhas ou bactérias como *Chlamydia* (Darville e cols., 2007) e possivelmente aumentar a liberação de ATP extracelular para promover uma importante regulação da resposta imune inata (Wiley e cols., 2011; Morandini e cols., 2014).

A ativação do receptor P2X7 pode induzir várias cascatas de sinalização específicas de células, incluindo as cascatas de IL-1β (Ferrari e cols., 1997) e NF- κB (Ferrari e cols., 1997), sendo, portanto, um membro chave no processamento e liberação de citocinas da família IL-1 em células inflamatórias (Chiao e cols., 2008) e, a partir de estudos com camundongos *knock-out* para o receptor, foi identificado que sua ausência é responsável por dificultar a liberação de IL-1β após desafio com LPS e subsequente tratamento com ATP (Labasi e cols., 2002; Ferrari e cols., 2006).

2.4 Inflamassoma e citocina IL-1β

Hoje, entende-se que para ocorrer apropriada resposta inflamatória é necessária a ação conjunta de sinais de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) e Danos Moleculares Associados a Patógenos (DAMPs), na qual se enquadram o ATP. A utilização da molécula de ATP como forma de alerta de perigo é de grande valia, dadas as suas baixas concentrações extracelulares em condições fisiológicas e altas concentrações extracelulares, citoplasmáticas e/ou vesiculares em estado de injúria (Di Virgilio, 2007; Junger, 2011; Lamkafi e Dixit, 2014).

O receptor P2X7 tem demonstrado importância na montagem da resposta inflamatória, como na liberação de ATP e NO (Sperlàgh e cols., 1998) e também na capacidade de ativar a translocação de NF- κB para o núcleo (Ferrari e cols., 1997) por uma sinalização dependente de Myd88 (Liu e cols., 2011), fato de grande importância, visto que a ativação do receptor P2X7

e a ativação de NF- κB são descritas como necessárias para a produção, maturação e liberação de IL-18 e IL-1β, citocinas da família IL-1 (Ferrari e cols., 2006).

Mediante aos fatores acima citados deparamos com elementos que participam da cascata de sinalização subsequente à ativação do receptor P2X7, que também inclui a ativação do inflamassoma, um complexo proteico composto por um sensor intracelular que tipicamente é um receptor do tipo NOD (NLR), pró-caspase-1 e molécula adaptadora ASC (Martinon e cols., 2009; Wen e cols., 2012). O NLRP3, um dos tipos de inflamassomas, vem sendo amplamente estudado devido à sua associação com doenças inflamatórias crônicas, como gota, doença de Alzheimer e diabetes tipo II, além de aterosclerose (Wen e cols., 2012).

Dado às suas características, sugere-se que o NLRP3 seja um sensor de dano (Mariathasan e cols., 2007) responsável pelo reconhecimento de micro-organismos e perturbações nas membranas de células da resposta imune inata (Mariathasan e cols., 2007; Chen e cols., 2009). Pouco se sabe sobre os mecanismos que levam a geração do inflamassoma. O que a literatura nos demonstra é que sua montagem é dependente não somente o efluxo de potássio (K+) (Franchi e cols., 2007; Hornung, e cols., 2008), mas também da ativação de pró-caspase 1 em caspase-1 (Piccini e cols., 2008). Uma vez ativada, a caspase-1 é capaz de clivar a pró-IL-1β (14-KDa) em sua forma biologicamente ativa/madura, IL-1β (17-KDa) (Fettelschoss e cols., 2011).

Além disso, o mecanismo necessário para levar à ativação do NLRP3 ainda não está claro, e por se tratar de uma molécula com estrutura complexa, pouco se espera que a via para ativação do inflamassoma dependa de apenas um estímulo e que ocorra de forma direta (Netea e cols., 2010). Petrilli e cols. (2007) acreditam que atividades intracelulares, como indução de hipocalemia e espécies reativas de oxigênio (Zhou e cols., 2011) possam ativar indiretamente o inflamassoma (Petrilli e cols., 2007). Muñoz-Planillo e cols. (2013) avaliam que sua ativação possa ocorrer por efluxo de K^+. No entanto, tratando-se da via de ativação para formação e liberação de IL-1β, células tratadas exclusivamente com ATP, são descritas como sendo incapazes de ativar a caspase-1, sendo necessária a adição prévia de lipopolissacarídeo (LPS) para indução da ativação do inflamassoma e liberação da citocina (Netea e cols., 2010). Nesta linha, a indução de NF-kB dependente de transcrição de NLRP3 por ligantes de receptores Toll-like (TLR) ou citocinas pró-inflamatórias demonstram ser de grande valia para que a célula inicie a ativação do inflamassoma, antes da presença de ATP (Bauernfeind e cols., 2009). Não obstante, a participação de canais de panexina-1 para formação de poros é um

mecanismo que propicia mecanismos indutores da ativação do inflamassoma no citoplasma, como por exemplo produtos microbianos (Kanneganti e cols., 2007).

As citocinas da família IL-1, à qual a citocina IL-1β pertence, inclui ainda mais 6 ligantes com atividade agonista (IL-1α, IL-18, IL-33, IL-36a, β, γ), três antagonistas dos receptores (IL-1Ra, IL-36Ra, IL-38) e uma citocina anti-inflamatória (IL-37). Elas estão entre os mais potentes iniciadores de inflamação e estão amplamente envolvidas em respostas protetoras contra infecções virais, fúngicas, bacterianas e parasitárias (Dinarello e cols., 2012). Além disso, alguns estudos demonstram que contribuem para o desenvolvimento de processos inflamatórios prejudiciais em doenças inflamatórias autoimunes, tais como artrite reumatoide e diabetes tipo II (Van de Veerdonk e Netea, 2013). De modo geral, todas as células do sistema imune inato expressam e/ ou são afetadas pelos membros da família IL-1, cuja atuação é fundamental na diferenciação e função de células linfoides inatas e adaptativas polarizadas (Garlanda e cols., 2013).

A IL-1β está entre os mais importantes marcadores de indução da resposta inflamatória (Ferrero-Miliani e cols., 2006). Seus mecanismos de liberação incluem a exocitose de vesículas, secreção por lisossomas, secreção por autofagia, e modelos não convencionais (não-vesiculares) que incluem a secreção de proteínas através da membrana plasmática por translocação direta ou por transportadores de membrana, além da liberação passiva durante a lise celular (Dinarello e Wolff, 1993; Monteleone e cols., 2015).

IL-1β é produzida por células hematopoiéticas, como monócitos, macrófagos teciduais, células dendríticas e micróglia cerebral em resposta a diversos estímulos, como infecções (Petrilli e cols., 2007; Benko e cols., 2008), ativação de receptores do tipo *Toll Like* (TLR) e de outras citocinas, tais como o TNF-α e a própria IL-1(Dinarello, 2006; Dinarello, 2011). É uma citocina envolvida em diversos processos imunológicos, como na indução de mediadores inatos, como proteínas de fase aguda (IL-6) e quimiocinas (CXCL8-IL-8) (Teixeira e cols., 2006). Além disso, também tem sido apontada como um fator auxiliar na progressão de doenças (Wen e cols., 2012).

2.5 *Leishmania*s e fatores de virulência

Parasitos do gênero *Leishmania* são intracelulares obrigatórios em hospedeiro vertebrados, e são responsáveis pelo desenvolvimento da leishmaniose. Esta doença caracteriza-se pela sua diversidade e complexidade, tanto em termos de distribuição geográfica,

quanto em na sua variedade de síndromes clínicas, que vão desde lesões cutâneas localizadas até formas viscerais graves (Sharma e Singh, 2009).

Estes parasitos dimórficos possuem um ciclo de vida heteroxênico, cuja forma de transmissão ao hospedeiro vertebrado faz-se através da hematofagia de fêmeas de flebotomíneos infectados e subsequente ação fagocítica por células do Sistema Mononuclear Fagocitário (Silveira, 2008). Ao picar um hospedeiro vertebrado infectado, no momento do repasto sanguíneo, a fêmea do vetor ingere células parasitadas com formas amastigotas do hospedeiro vertebrado (Neves, 2004). No intestino do vetor, as células se rompem e as formas amastigotas liberadas se diferenciam em formas promastigotas, as quais serão transmitidas para um hospedeiro mamífero não infectado. Durante um novo repasto sanguíneo, a fêmea infectada irá regurgitar, dentro da pele do hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas e sua saliva (Schlein e cols., 1992), que apresenta anticoagulantes, vasodilatadores (maxidilan) (Kamhawi, 2000), nucleotídeos e adenosina (Ribeiro e cols., 1999; Figueiredo e cols., 2016) que atuam efetivamente no favorecimento da progressão da infecção (Charlab e cols., 1999). Isto pode ser verificado emem camundongos que foram infectados com *L. braziliensis*, que dificilmente infectam estes animais, mas na presença de saliva foi capaz de aumentar/progredir significativamente a infecção (Lima e Titus, 1996). No hospedeiro vertebrado, essas formas infectarão as células do sistema fagocítico, diferenciando-se em as amastigotas, forma desprovida de flagelo aparente (Chang e cols., 1990). Essas formas amastigotas sobrevivem e se replicam por divisão binária no ambiente ácido do fagolisossomo,e, assim os parasitos liberados parasitarão novas células (Brittingham e Mosser, 1996).

Dentre as várias espécies conhecidas, destacamos a *Leishmania amazonensis*, prevalente em inúmeras regiões do Brasil, cuja síndrome clínica comum são lesões cutâneas, caracterizadas por serem limitadas, ulcerosas ou não, e lesões cutâneas difusa, caracterizadas pela não ulceração e larga distribuição pelo corpo, em geral em indivíduos anérgicos e *Leishmania major,* cuja infecção cutânea é caracterizada por ser limitada e controlada pelo sistema imune (Grimaldi e Tesh, 1993).

De acordo com a literatura, muitos estudos indicam a importância de moléculas de superfície do parasito *Leishmania* para a garantia da sua internalização e sobrevivência. Dentre estas moléculas podemos destacar a GP63 e o lipofosfoglicano (LPG) (Brittingham e cols.,1995). Além disso, nosso grupo tem demonstrado a importância da ENTPDase no estabelecimento da infecção por *Leishmania* (Maoli e cols., 2004; Marques-da-Silva e cols.,2008; De Souza e cols., 2010; Gomes e cols., 2015).

A infecção por *Leishmania* é capaz de liberar ATPe, principalmente pelo rompimento de macrófagos parasitados, rompimento de barreiras físicas, etc. Assim como as células, protozoários também são passíveis de possuir ENTPDases em sua superfície. Estas enzimas, como já mencionado, auxiliam na redução da concentração do ATP extracelular (pró-inflamatório), fato que nos chama atenção, uma vez que, a ENTPDase de *Leishmania* pode, deste modo, alterar a resposta imune (Langston e cols., 2003). Recentes estudos demonstram um papel especial das ENTPDases como fatores de virulência de agentes patogênicos, incluindo parasitos. Essa correlação foi bem evidenciada por trabalhos com *Toxoplasma gondii (*Silverman e cols., 1998), *Legionela pneumophila* (Sansom e cols., 2007), *Trypanosoma cruzi* (Bisaggio e cols, 2003; Fietto e cols., 2004; Meyer-Fernandes e cols., 2004; Santos e cols., 2008) e *Leishmania* (Maioli e cols., 2004; Marques-da-Silva e cols., 2008; Gomes e cols., 2015) e de outros protozoários (Meyer-Fernandes, 2002).

2.6 Resposta imune frente à infecção por *Leishmania*

Levando em consideração a ação inicial do sistema imunológico, temos que o primeiro infiltrado inflamatório é caracterizado pela presença de neutrófilos (Mócsai, 2013), que são responsáveis por destruírem os parasitos após sua fagocitose e promover o recrutamento de novos neutrófilos, mediante a produção de IL-8 e de macrófagos e monócitos através da produção de MIP-1α e MIP-1β (Awasthi e cols., 2004). Estudos relatam ação contraditória de defesa por neutrófilos frente à infecção, uma vez que, ele pode atuar tanto no combate como na permanência do parasito (Aga e cols., 2002; Afonso e cols., 2008; Ribeiro-Gomes e cols., 2012).

Sabe-se que a interação inicial de formas promastigotas dos parasitos do gênero *Leishmania* com macrófagos, sua principal célula hospedeira, é crucial para o estabelecimento da infecção no hospedeiro, assim como a ligação de amastigotas com outros macrófagos é necessária para a sobrevivência do parasito e consequente desenvolvimento da patogênese (Alexander e Russel, 1992). Assim temos que, os macrófagos podem controlar a infecção através de mecanismos que envolvem a produção de IL-12, que por sua vez estimula linfócitos e células NK a produzirem IFN-γ, que em sinergismo com TNF agem na estimulação dos próprios macrófagos favorecendo a produção de intermediários reativos de oxigênio, que são substâncias alvos para a eliminação do parasito (Kane e Mosser, 2000). Além disso, os macrófagos quando ativados podem produzir óxido nítrico (NO), através da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), e também intermediários reativos de oxigênio (ROS) pela

oxidase fagocitária, que são substâncias tóxicas para o parasito (Liew e cols., 1990; Murray, 1982; Abbas, 2008).

No entanto, a interação *Leishmania*-macrófagos promove a ausência de uma resposta pró-inflamatória e consequente inibição do processo de produção dos componentes tóxicos necessários para a eliminação dos parasitos, que acabam por entrar de forma silenciosa nos macrófagos (Lodge e Descoteaux, 2005; Mosser e cols., 1996). Este fato pode se relacionar à presença de moléculas de superfície da *Leishmania*, como gp63, que é capaz de se ligar a vários receptores de macrófagos, como MAC-1 e CR3 (Brittingham e cols., 1999) e LPG, que podem interagir não somente com receptores p150/95 e CR3, mas também promover a inibição da fusão do fagossomo ao lisossomo e favorecer a sobrevivência do parasito (Desjardins e cols., 1997).

Outras células importantes são os linfócitos. A resposta de linfócitos específicos para *Leishmania*s é dependente da espécie e das características do hospedeiro. Assim, mediante a infecção, linfócitos T $CD4^+$ são ativados e podem se diferenciar em células do tipo T_h1, caracterizadas pela produção de citocinas inflamatórias, como IFN-γ e TNF-α, que contribuem para controle do parasito. Células T_h2 são caracterizadas por produzirem e liberarem citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13. A classe de linfócitos T $CD8^+$ também está envolvida no controle da infecção, que ocorre através da produção de IFN-γ, que também pode ser produzida por células NK (Mougneau e cols., 2011).

2.7 *Leishmania*, células dendríticas e sinalização purinérgica

A montagem de uma resposta imune efetiva nos vertebrados é também dependente das células dendríticas (DC), uma classe de células derivadas da medula óssea encontradas no sangue, epitélios e tecidos linfoides. De modo geral, as DCs trabalham como sentinelas, apresentando sensores moleculares e uma maquinaria de processamento de antígenos de suma importância para reconhecer patógenos, integrar informações químicas e orientar a especificidade, a magnitude e a polaridade das respostas imunes subsequentes (Steinman, e cols., 2003; Collin e cols., 2013)

Nos tecidos linfoides, as DC promovem o processamento de antígenos e a apresentação dos peptídeos extracelulares, via MHC II, e intracelulares através de MHCI, que são fundamentais para a atividade de linfócitos (Coquerelle e Moser, 2010). Estas células são capazes, ainda, de secretar citocinascomo IL-12 que podem contribuir para a polarização dos

linfócitos de fenótipo T_h1 e, assim, promover a montagem de uma resposta pró-inflamatória (Maldonado-López e Moser, 2001).

Durante a infecção por *Leishmania* células dendríticas podem apresentar alteração na expressão de importantes marcadores de superfície, como é o caso da infecção por *Leishmania amazonensis* que é capaz de modular a expressão de MHCII, CD80, CD86, CD40, a produção de IL-10 e de IL-12 (Qi e cols., 2001; Prina e cols., 2004; Favali e cols., 2007; Figueiredo e cols., 2012). Além disso, Hermida e cols. (2014) demonstraram que esta espécie pode prejudicar a migração de células dendríticas do sítio inflamatório para o linfonodo drenante e assim impedir as respostas imunes subsequentes.

Embora muitos estudos sejam realizados, pouco se conhece sobre os mecanismos pelos quais estão envolvidos na modulação da resposta imune frente a interação *Leishmania* e célula dendríticas.

Nosso laboratório tem trabalhado e demonstrado a evidência de que *Leishmania* com diferentes expressões e atividades de ectonucleotidases são capazes de subverter a resposta imune celular mediante à hidrólise de ATP para geração de adenosina. Nesse sentido, demonstramos que *Leishmania amazonensis* apresenta maior atividade ectonucleotidásica que a *Leishmania braziliensis* e a *Leishmania major* (Marques-da-Silva e cols.,2008). Em camundongos C57BL/6, a infecção por *L. amazonensis* leva ao desenvolvimento de lesões crônicas que não se curam espontaneamente. Ao contrário, a infecção por *L. braziliensis* ou *L. major*, neste modelo, leva ao desenvolvimento de lesões menores e com cura espontânea (Maioli e cols., 2004; Marques-da-Silva e cols.,2008).

Além disso, demonstramos que a diminuição da atividade ectonucleotidásica acarreta diminuição da capacidade infectante desses parasitos (Gomes e cols., 2015). A relação entre o nível de atividade ectonucleotidásica e a capacidade infectante desses parasitos parece ser determinada pela produção de adenosina no meio extracelular, já que a adição desta substância no momento da infecção por *L. amazonensis* promove uma redução na sua capacidade de hidrolisar nucleotídeos, tornando-os menos virulentos *in vivo* (Souza e cols., 2010). Ainda, demonstramos que a infecção por *L. amazonensis* prejudica ativação de DC (diminuição da expressão de MHCII, CD86 e CD40) e posterior desencadeamento de uma resposta celular específica, cujo efeito foi dependente de ectonucleotidases e da ativação do receptor A2b, fato que não foi encontrado para as espécies *L. braziliensis* e *L. major* (Figueiredo e cols., 2012).

A partir destes trabalhos, surgiu a hipótese de avaliar se *Leishmanias* com diferentes atividades de ectonucleotidases são capazes de modular a resposta de células dendríticas frente

a produção e liberação de IL-1β, uma importante citocina inflamatória resultante do processo de formação e ativação de inflamassomas e que vem sendo amplamente estudada, como já explicado anteriormente.

3. Justificativa

Sabe-se da importância do conhecimento dos marcadores de virulência no entendimento dos mecanismos imunoparasitológicos da infecção por parasitos do gênero *Leishmania* e no consequente desenvolvimento de vacinas e estratégias diagnósticas. Trabalhos do nosso grupo já demostraram a importância das E-NTPDases de promastigotas de *Leishmania* na modulação da resposta imune celular pela ação dessas enzimas na degradação de ATP e o acúmulo de AMP, que pode ser degradado pela 5'-nucleotidase, levando à geração de adenosina. Assim, torna-se necessário o conhecimento de novos mecanismos envolvidos na modulação da resposta imune perante a relevância das E-NTPDases de parasitos do gênero *Leishmania* neste processo.

4.2 Objetivo Geral:

Avaliar se *Leishmania* com variações na atividade ENTPDase são capazes de modular a produção de IL-1β por células dendríticas.

4.3 Objetivos Específicos:

4.3.1 Verificar se a liberação de IL-1β é dependente da atividade de ENTPDase de *Leishmania*s;

4.3.2 Analisar se *Leishmania*s tratadas com DIDS ou adenina são capazes de induzir a liberação de IL-1β*;*

4.3.3 Analisar a participação do receptor P2X7 na liberação de IL-1β por células dendríticas infectadas ou não;

4.3.4 Avaliar participação de receptores de adenosina A2A e A2B durante o processo de produção de IL-1β em células dendríticas infectadas por *Leishmania*.

5.1 Cultivo celular

Células dendríticas foram diferenciadas a partir de células da medula óssea (BOLTZ – NITULESCU e cols 1987; LUTZ e cols.,1999). Fêmures e tíbias foram obtidos de camundongo C57BL/6, por lavagem com seringa e agulha 30G, sendo imersos em álcool 70°GL por 2 minutos, seguidos por imersão em PBS/5% SFB, pH7,2. A suspensão de células foi centrifugada a 210xg/4°C/10minutos e as células foram ressuspensas em meio RPMI (Sigma-Aldritch) suplementado com 10% de SFB (SFB – Cultilab, Campinas, SP, Brasil), L-glutamina 2mM (Sigma –Aldritch), penicilina G 100U/ml (Sigma –Aldritch), bicarbonato de sódio e mercaptoetanol (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suécia) 50μM, pH 7,2. As células foram plaqueadas em placas de Petri a uma concentração de $3x10^6$células/ml e incubadas a 37°C/5% CO_2. O fator de diferenciação celular, GM-CSF (ImmunoTools), foi adicionado nos dias 0, 3, 6 e 8, a uma concentração de 4ng/ml. No 9º dia células não aderentes foram coletadas para fins experimentais. Os procedimentos adotados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) pelos números de protocolos 2012/02 e 2013/51.

5.2 Parasitos

Formas promastigotas da cepa MHOM/IL/80/Friedlin *Leishmania (Leishmania) major* e formas promastigotas da cepa IFLA/BR/67/PH8 *Leishmania (Leishmania) amazonensis* foram cultivadas à 25ºC, em meio de Grace (Sigma Aldrich, Inc, St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB – Cultilab, Campinas, SP, Brasil), L-glutamina 2mM (Sigma Aldritch) e penicilina G 100 U/ml (Sigma Aldritch), em pH 6,5. Promastigotas metacíclicas foram enriquecidas a partir de parasitos em fase estacionária (5º dia de crescimento) por centrifugação em gradiente de Ficoll. Assim, os parasitos foram lavados duas vezes com salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,2, a 1540 x g/ 4°C/ 10 minutos e o precipitado foi ressuspenso em meio DMEM (Sigma-Aldrich), pH 7,2 e posteriormente sobreposto em Ficoll 400 (Sigma Aldrich) 10%. A preparação foi centrifugada a 1070 x g/ 25°C/ 15 minutos. Posteriormente, parte do sobrenadante enriquecido de promastigotas metacíclicos foi retirado e os parasitos novamente lavados para fins experimentais, conforme descrito por Marques-da-Silva e cols. (2008).

5.3 Avaliação da atividade enzimática por hidrólise de nucleotídeos

A avaliação da capacidade de hidrólise de nucleotídeos por *L. amazonensis* e *L. major* foi realizada por método colorimétrico de dosagem de fosfato inorgânico liberado pela incubação dos parasitos com ATP, ADP ou AMP. Este método tem como procedimento a incubação dos parasitos íntegros durante 1 hora a 30ºC em tampão de reação contendo os seguintes reagentes: NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM, 5,5 mM de D-glicose, 5 mM de $MgCl_2$ e com 50 mM de tampão Hepes-Tris, na presença de 5mM de ATP, ADP ou AMP (Sigma Aldrich) (Bisaggio e cols.,2003). O processo reativo se inicia com a adição das formas promastigotas vivas em fase estacionária e tem sua paralisação através da adição de HCl 0,2 M (Fietto e cols., 2004). Para fins de determinação da hidrólise inespecífica, e, portanto, obter um grupo controle, os parasitos foram adicionados depois que a reação foi interrompida. Após interrupção da reação, a suspensão de parasitos foi submetida à centrifugação que possibilitou sua sedimentação, e permitiu a partir de alíquotas do sobrenadante a medição do fosfato inorgânico liberado (Pi) (Ekman e Jager, 1993).

5.4 Infecção de células dendríticas *in vitro* e ativação da via de IL-1β

Células dendríticas viáveis (avaliação por azul de trypan) foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares (tratadas com poli-L-lisina (10µg/ml) em **tampão borato (0,1 M)** para aderência celular) a uma concentração de 10^6células/ml e foram previamente tratadas com lipopolissacarídeo (Sigma- aldrich) para sua ativação, a uma concentração de 50ng/ml por um período de 5h. Após este estágio as células foram lavadas 2 vezes no próprio meio, pH 7,2. Em seguida, formas promastigotas metacíclicas foram co-incubadas com células dendríticas na proporção de 3 parasitos por célula, a 33ºC/5% CO_2, por 3h e 3h à 37ºC/5%CO_2 na presença de 1mM de ATP (Sigma.Aldrich). Após 6h finais de tratamento e infecção o sobrenadante da cultura foi coletado.

Em alguns experimentos, células dendríticas foram previamente incubadas com inibidor do receptor de P2X7 (A740003) a uma concentração 50nM por 30 minutos antecedentes à infecção. Em outros experimentos antagonistas de receptores de adenosina A2A e A2B, SCH58261 e MRS1754, respectivamente, foram adicionados 30 minutos antes da infecção por *Leishmania* a uma concentração de 5µM. Ambos, SCH58261 e MRS1754, foram diluídos em dimetilsufóxido, que também foi adicionado aos grupos controle.

5.5 Determinação da produção de IL-1β

Os sobrenadantes das culturas de células dendríticas foram coletados após 6 horas de tratamento e infecção e os níveis de IL-1β foram dosados por ELISA utilizando um kit para ensaio em sanduíche conforme as instruções do fabricante (BD Biosciences).

5.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística por test *t* de Student ou ANOVA One-Way seguida de pós-teste de Tukey com o auxílio do programa Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

6.1 Atividade ectonucleotidásicade*: Leishmania amazonensis* e *Leishmania major*

Nosso grupo tem trabalhado e demonstrado a evidência de que parasitos com diferentes expressões e atividades de ectonucleotidases são capazes de modular diferentemente a resposta imune celular em função da hidrólise de ATP (Marques-da-Silva e cols., 2008; Gomes e cols.; 2015). A fim de verificar se promastigotas metacíclicas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania major* apresentam diferentes atividades enzimáticas, submetemos estas espécies a um ensaio de atividade ectonucleotidásica, e os seus resultados estão apresentados na **Figura 1**.

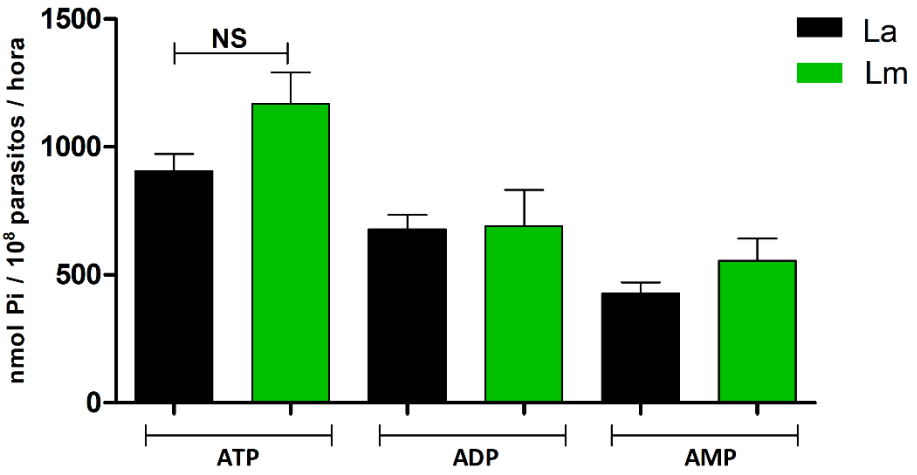

Figura 1: Atividade ectonucleotidásica de diferentes espécies do gênero *Leishmania*. Promastigotas metacíclicas da cepa de *Leishmania amazonensis* (PH8) e *Leishmania major (*Friedlin) foram cultivados por 5 dias em meio suplementado, centrifugados e incubados com ATP, ADP ou AMP por 1 hora a 30ºC. A atividade ectonucleotidásica foi avaliada pela quantidade de fosfato inorgânico liberado. Os dados apresentados referem-se a média e desvio-padrão de três repetições independentes. Análise estatística realizada por One-Way ANOVA, seguido de teste Tukey em comparação ao grupo controle. NS: não significativo.

Nossos dados demonstram que *L. amazonensis* e *L. major* apresentam atividade enzimática semelhante para todos os nucleotídeos avaliados **(Figura 1)**. Diferente do que Marques-da-Silva e cols. (2008) demonstraram, a atividade ectonucleotidásica de *L. amazonensis* não foi maior do que a de *L. major*, para nenhum dos nucleotídeos avaliados.

As informações contidas na literatura sugerem que as ectonucleotidases sejam importantes fatores de virulência, uma vez que podem favorecer o estabelecimento de infecções através da inativação de possíveis respostas protetoras do hospedeiro, por meio da utilização de

nucleotídeos (Fietto e cols., 2004). No entanto, a manutenção dos parasitos em meio de cultura pode interferir na atividade ectonucleotidásica e consequente virulência. Meyer-Fernandes e cols. (2002) relataram que a atividade ecto-ATPásica de um isolado primário de *Trichomonas vaginalis* foi cerca de 3 vezes mais elevada que a verificada em um isolado mantido *in vitro* por muitos anos. De Souza e cols. (2010) avaliaram que cepas de *L. amazonensis* cultivadas por longos períodos são passíveis de alterar sua atividade enzimática.

Entretanto, nosso resultado não interfere na condução deste trabalho, uma vez que, foi avaliada a influência da atividade enzimática de *Leishmania* e não a resposta espécie-dependente.

6.2 Parasitos do gênero *Leishmania* são capazes de induzir a liberação de IL-1β por células dendríticas tratadas com LPS e ATP.

A liberação de IL-1β *in vitro* é classicamente avaliada através da estimulação de células com ligantes dos receptores do tipo Toll (TLR), como o LPS, que favorece a tradução da proteína pró-IL-1β e, também, a ativação do receptor P2X7 pela molécula de ATP, que leva a clivagem da pró-IL-1β e a liberação da sua forma madura (Perregaux e cols., 1992; Netea e cols., 2010). Considerando que alguns trabalhos já conseguiram ativar a via de secreção de IL-1β apenas pelo pré-tratamento das células com LPS (Lima –Júnior e cols., 2013; Charmoy e cols., 2016) e posteriormente infectando-as, decidimos criar um modelo que fosse coerente com os dados da literatura **(Figura 2).**

Podemos observar, conforme a **Figura 2A**, que o prévio tratamento de células dendríticas por 5 horas com LPS (50ng/ml), e posterior infecção com *L. amazonensis* e *L. major* não foi suficiente para induzir a liberação de IL-1β. Acreditamos, que a necessidade de altas concentrações de ATP para ativar o receptor P2X7, conforme a literatura nos informa (La Sala e cols., 2003; Coddou e cols., 2011) possa ter influenciado na não indução da via de secreção de IL-1β, conforme dados da **Figura 2A**. Não podemos deixar de citar, que no momento do repasto sanguíneo o flebotomíneo além de inocular parasitos *Leishmania* sobre a pele do hospedeiro, é capaz de regurgitar a sua microbiota intestinal, e ,assim favorecer não somente a ativação do inflamassoma e a liberação de IL-1β, mas também a infiltração de neutrófilos no local da infecção (Dey e cols., 2018). Em contrapartida, a figura 2B nos mostra que o tratamento com ATPe (1mM) no momento da infecção induz uma liberação da citocina de forma significante. Neste contexto, estudos sobre células dendríticas humanas revelaram que a IL-1β pode ser liberada a partir destas células tanto por exocitose de lisossomas secretoras (Gardella

e cols., 2001), quanto por extravasamento de microvesículas da membrana plasmática (Pizzirani e cols., 2007) após tratamento com ATP. Não sabemos ao certo o motivo para esta liberação de IL-1β, mas alguns trabalhos com outras células, como neutrófilos (Joosten e cols., 2009) e mastócitos (Mizutani e cols., 1991) já demonstraram que algumas proteases podem ter papel fundamental na regulação da atividade de IL-1β, porém a proteólise nesses locais que levam a ativação da IL-1β geram uma atividade muito mais fraca em comparação com a ativação por caspase-1 (Black e cols., 1988; Hazuda e cols., 1990).

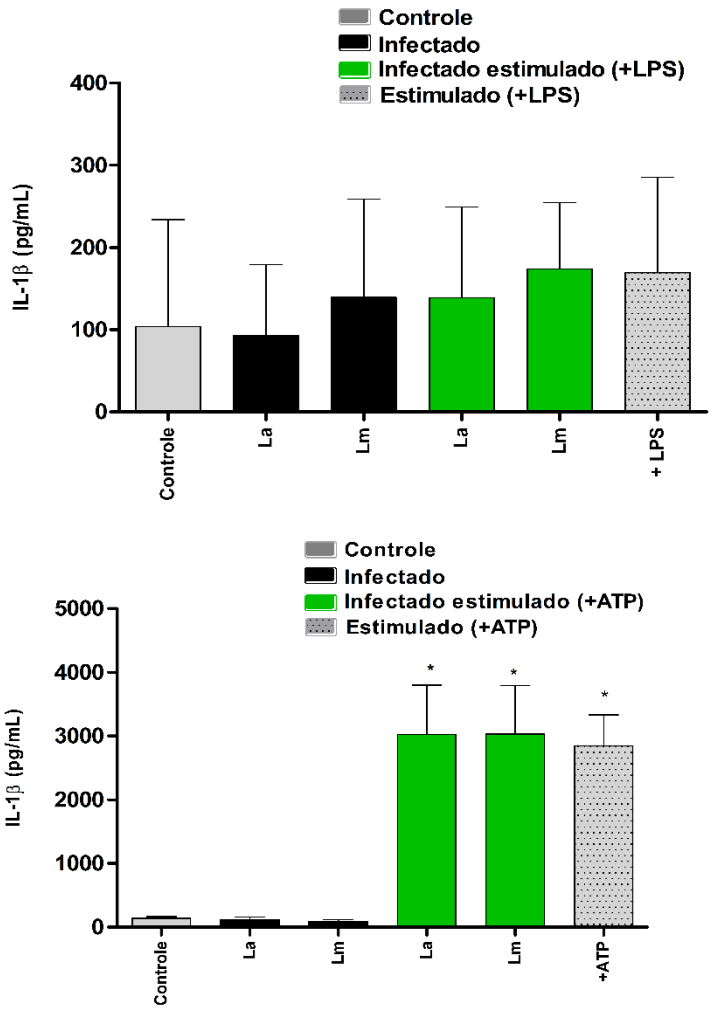

Figura 2: Liberação de IL-1β por células dendríticas infectadas. (A) Células dendríticas foram cultivas em meio suplementado e estimuladas por 5h com LPS (50ng/ml), lavadas e infectadas por promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* e *L. major* na proporção de 3 parasitos para 1 célula por 6 horas. (B) Células dendríticas foram cultivas em meio suplementado por 5h, lavadas e infectadas por *L. amazonensis* e *L. major* na proporção de 3 parasitos para 1 célula na presença de 1mM de ATP por 6 horas. Após este período o sobrenadante foi coletado para dosagem de IL-1β por método de ELISA. Os dados apresentados referem-se a média e desvio-padrão de três repetições independentes. Foi utilizado teste estatístico One-Way ANOVA, seguido de teste Tukey em comparação ao grupo controle, *$p<0,05$.

A partir destes resultados e considerando a via clássica de liberação de IL-1β, decidimos para os ensaios subsequentes estimular as células dendríticas tanto com LPS quanto com ATP.

Temos o conhecimento de que o processo de infecção celular por *Leishmania* pode promover o enriquecimento do meio extracelular com moléculas do interior das células, como o extravasamento ATP. Esta molécula de ATP, uma vez no meio extracelular, pode ser hidrolisada pelas ENTPDase de parasitos do gênero *Leishmania* e, consequentemente, gerar adenosina, uma molécula anti-inflamatória e que poderia funcionar como uma molécula reguladora da resposta imune em favor da infecção. A partir destas informações, decidimos verificar se a atividade ectonucleotidásica de *Leishmania* estaria correlacionada com um aumento na liberação de IL-1β pelas células dendríticas infectadas. Para isto, as promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* e *L. major* foram direcionadas tanto para infecção em células dendríticas, previamente tratadas com LPS e posteriormente com ATPe, como também para o ensaio de atividade ectonucleotidásica.

Nossos resultados, conforme apresentado na **Figura 3**, demonstram que *L. amazonensis* e *L. major* são capazes de induzir a liberação de IL-1β através da hidrólise de nucleotídeos. Assim, verifica-se que houve correlação entre a hidrólise de ATP e ADP com a liberação de IL-1β por DC infectadas, tanto por *L. amazonensis*, como por *L. major*, uma vez que foram encontrados valores de r^2=0,8581 e valor de p 0,0079; r^2=0,6483 e valor de p=0,0532, respectivamente. Não foram encontradas correlações significativas para a hidrólise de AMP e produção da citocina IL-1β. Perfil semelhante foi encontrado para células dendríticas infectadas e tratadas apenas com ATP (dados não mostrados).

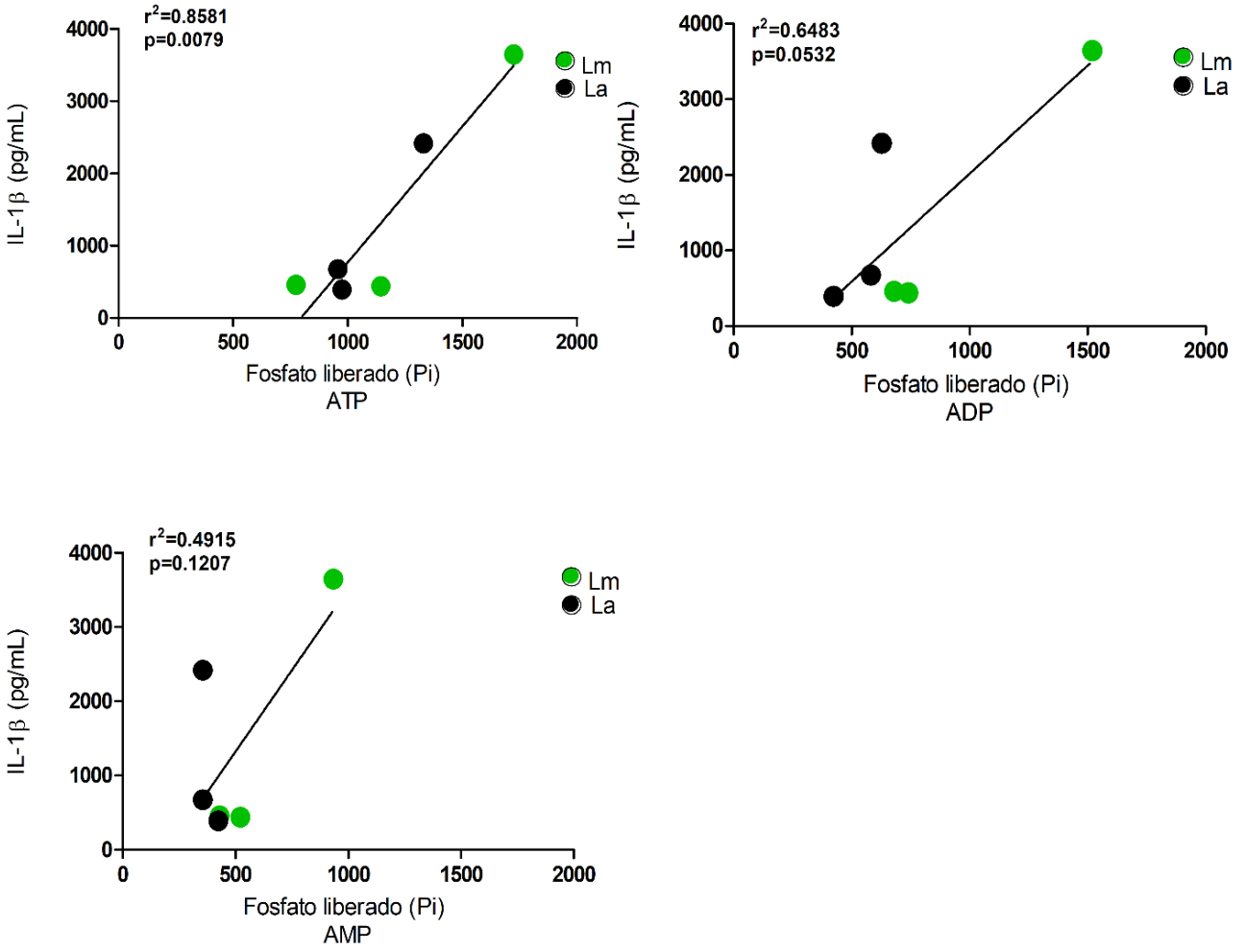

Figura 3: Correlação de atividade ectonucleotidásica e liberação de IL-1β após tratamento com LPS+ATP. Células dendríticas foram cultivas em meio suplementado e estimuladas por 5h com LPS (50ng/ml), lavadas e infectadas por promastigotas metacíclicas *L. amazonensis* e *L. major* na proporção de 3 parasitos para 1 célula na presença de 1mM de ATP por 3 horas à 33°C e 3 horas à 37°C. Após este período o sobrenadante foi coletado para dosagem de IL-1β por método de ELISA. A atividade enzimática foi analisada por liberação de fosfato após incubação dos parasitos por 1h na presença de ATP, ADP e AMP. Os dados apresentados são referentes a três repetições independentes. Valores de r^2 e *p* foram obtidos por análise por regressão linear considerando valores estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Considerando que tanto *L. amazonensis* quanto *L. major* foram capazes de induzir a liberação de IL-1β por células dendríticas infectadas, decidimos avaliar se a IL-1β liberada poderia auxiliar no controle da infecção por estes parasitos, uma vez que é considerada uma citocina pró-inflamatória. Observamos, como apresentado na **Figura 4** que mesmo diante da produção desta citocina não houve redução da infecção celular. O número de amastigotas por células infectadas também não se alterou (dados não mostrados).

Assim temos que, apesar da IL-1β ser considerada uma citocina pró-inflamatória, apenas sua presença não é suficiente para promover a redução da infecção em DC infectadas por *Leishmania*. Este fato não nos surpreende, visto que uma de suas atribuições estaria relacionada com o recrutamento celular, como de macrófagos (Rider e cols., 2011).

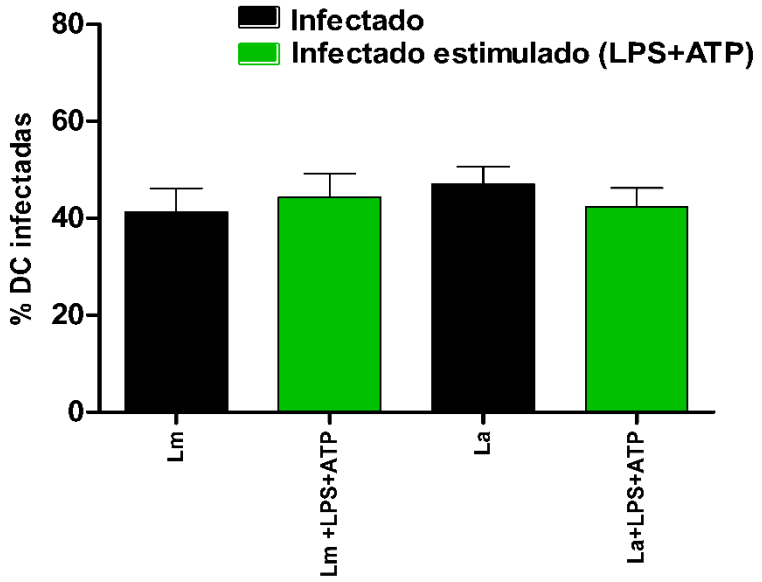

Figura 4: Infecção de células dendríticas por *L. amazonensis* e *L. major*. Células dendríticas foram pré-tratadas com LPS 50ng/ml por 5 horas, lavadas e infectadas com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* e *L. major* na presença de 1mM ATP durante 3 horas à 33° e posteriormente por 3h à 37°C. A porcentagem de células infectadas foi avaliada por contagem em microscópio óptico. Os dados apresentados referem-se a média e desvio-padrão de três repetições independentes. Foi utilizado teste estatístico One-Way ANOVA, seguido de teste Tukey.

Dado que a molécula de ATP é de grande importância para a liberação de IL-1β, acreditávamos que a infecção poderia reduzir a liberação desta citocina, visto que, parasitos *Leishmania* possuem em sua superfície ectonucleotidases que são capazes de hidrolisar o ATP extracelular e, consequentemente gerar adenosina, que poderia influenciar na modulação negativa da liberação da IL-1β. Entretanto, nossos resultados, de forma interessante, nos revelam uma correlação positiva entre a hidrólise de nucleotídeos de ATP e ADP com a liberação de IL-1β.

À princípio, não esperávamos encontrar relação entre a 5'-nucleotidase, através da hidrólise de AMP e a liberação de IL-1β, uma vez que o mais importante seria justamente a hidrólise da molécula de ATP para modular negativamente a liberação da IL-1β. Mas este fato nos intriga, visto que um possível papel da molécula de adenosina, produto final da hidrólise de ATP por ectonucleotidases de *Leishmania*, tem sido levantado como importante para

sustentar a liberação de IL-1β (Ouyang e cols., 2013). Isto nos levou a verificar o papel da adenosina em ensaios experimentais subsequentes.

Assim, a partir destes resultados conseguimos verificar que a infecção de células dendríticas por *Leishmania* é capaz de induzir a produção de IL-1β. Na literatura, alguns trabalhos também demonstraram que a infecção por estes parasitos é capaz de induzir a liberação desta citocina, mas o papel desta citocina ainda é controverso. Charmoy e cols. (2016) demonstraram que a liberação de IL-1β por macrófagos derivados de medula óssea infectados por 6 horas e tratados com LPS (50ng/ml) é diretamente proporcional a quantidade de parasitos de *L. major* isolado de pacientes com lesões crônicas. Além disso, revelam que em ensaios de infecção *in vivo* em camundongos C57BL/6, a IL-1β esteja influenciando no recrutamento de neutrófilos para o local da infecção, fato que desempenha um papel crucial no desenvolvimento de uma forma não cicatrizante de leishmaniose cutânea em camundongos convencionalmente resistentes. Neste contexto, Fernandéz-Figueroa e cols. (2012) demonstraram que um aumento na produção *in vitro* de IL-1β por monócitos e uma expressão sérica aumentada desta citocina, correlacionou-se com a gravidade da doença, por ser significativamente maior em pacientes com leishmaniose cutânea difusa fortemente infectados com *Leishmania mexicana*. Por outro lado, Xiu e cols. (2007), demonstram que células dendríticas tratadas com LPS (100ng/ml) e infectadas por *L. amazonensis* e *L. major* são capazes de aumentar proporcionalmente a liberação de IL-1β e esta liberação estaria induzindo maior expressão de CD40 e CD83, importantes marcadores de ativação de células dendríticas. Não menos importante, demonstraram que o tratamento de IL-1β em doses crescentes também é capaz de aumentar o percentual de células dendríticas produtoras de IL-12p40. Além disso, Lima-Júnior e cols. (2013) demonstraram que a infecção por *L. amazonensis* em macrófagos derivados de medula óssea é capaz de induzir a produção e liberação de IL-1β por estas células. Além disso, relatam a importância da ativação do inflamassoma NLRP3 e consequente ativação de caspase-1 para favorecer liberação de IL-1β, que nesta infecção, é passível de promover a resistência à presença de *L. amazonensis* através da produção de óxido nítrico.

Assim, tendo conhecimento que a ectonucleotidase de parasito possa estar envolvida no processo de liberação de IL-1β, propomos inibir a atividade da enzima e verificar possíveis modulações.

6.3 A modulação da atividade enzimática de parasitos do gênero *Leishmania* reduz a liberação de IL-1β

Considerando que a ectonucleotidase possa estar envolvida na liberação de IL-1β, decidimos modular a atividade desta enzima e verificar possíveis modulações na liberação de IL-1β por células dendríticas infectadas.

Tripanossomatídeos, como parasitos do gênero *Leishmania*, não fazem a síntese *de novo* de nucleotídeo purínicos, e por isso dependem de ectonucleotidases para alimentar a via de salvação de purinas (Carter e cols., 2008). Assim, quando são crescidos em meio contendo adenina exógena são capazes de aumentar o crescimento e satisfazer os requisitos de purinas para o seu desenvolvimento, reduzindo consequentemente sua atividade enzimática (Serafim e cols., 2012; Gomes e cols., 2015). O tratamento com DIDS (4,40-diisothiocyanatostilbene 2,20-disulfonic acid), um inibidor de ectonucleotidase, após a obtenção das formas promastigotas metacíclicas, também é capaz de reduzir a atividade enzimática (Meyer-Fernandes e cols., 1987; Berredo-Pinho e cols., 2001).

Assim, a fim de promover a modulação da atividade enzimática das espécies de *Leishmania*, cultivamos as cepas em meio de cultura suplementado com 5mM de adenina por 5 dias ou inibimos diretamente a atividade da enzima por tratamento com 100μM de DIDS por 1 hora antecedente à infecção para posteriormente avaliar interferência na liberação de IL-1β.

Conforme dados da figura 5, tanto o tratamento com DIDS, como o tratamento com adenina foram capazes de diminuir a liberação de IL-1β por células dendríticas infectadas por e *L. major* e estimuladas com LPS e ATP quando comparadas com o grupo apenas infectado e estimulado. Mas para *L. amazonensis* não foi significativo.

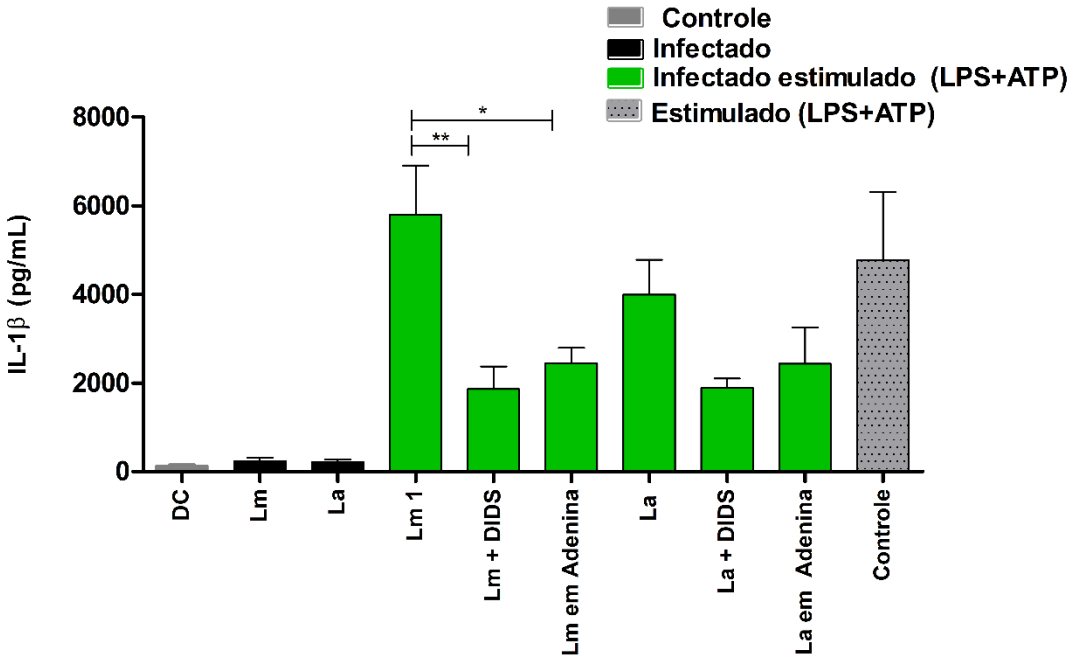

Figura 5: Liberação de IL-1β por células dendríticas infectadas por *L. amazonensis* e *L. major* na presença de inibidores de E-NTPDase. Células dendríticas foram pré-tratadas com LPS 50ng/ml por 5 horas, lavadas e infectadas com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* e *L. major* na presença ou ausência de DIDS 100µM (por 1 hora) ou adenina 5mM (5 dias) e ATP 1mM durante 3 horas à 33°C e posteriormente por 3h à 37°C. A produção de IL-1β foi avaliada por método de ELISA. Os dados apresentados referem-se a média e desvio-padrão de três repetições independentes. Foi utilizado teste estatístico One-Way ANOVA, seguido de teste Tukey em comparação ao grupo controle, *p<0,05 e **p>0,01.

Interessantemente, nossos resultados sugerem que a atividade enzimática do parasito seja importante para garantir a ativação da via de síntese de IL-1β, visto que a modulação da atividade do parasito foi capaz de modular negativamente a liberação desta citocina.

Em seguida, avaliamos se a redução da atividade da enzima seria capaz de diminuir a infecção em células dendríticas **(Figura 6).** Observamos que tanto o tratamento com DIDS, como o com adenina também foram capazes de reduzir a taxa de infecção em células dendríticas.

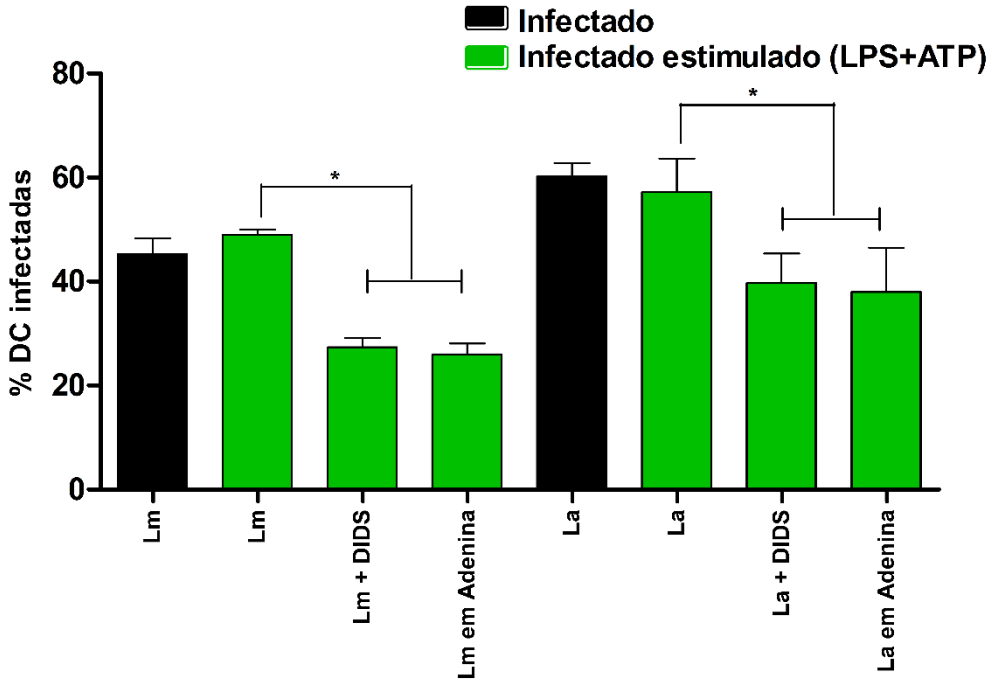

Figura 6: Infecção de células dendríticas por *L. amazonensis* e *L. major* na presença de inibidores de E-NTPDase. Células dendríticas foram pré-tratadas com LPS 50ng/ml por 5 horas, lavadas e infectadas com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* e *L. major* na presença ou ausência de DIDS 100µM (por 1 hora), cultivadas ou não com adenina (5mM) e ATP 1mM durante 3 horas à 33°C e posteriormente por 3h à 37°C. Os dados apresentados referem-se a média e desvio-padrão de três repetições independentes. Foi utilizado teste *t student* em relação ao grupo controle, *p<0,05.

Nossos dados, ainda enfatizam a importância da ectonucleotidase de *Leishmania* na capacidade de interação celular e consequente habilidade infecciosa e de sobrevivência. Em macrófagos infectados houve uma redução da taxa de infecção frente a presença de parasitos que apresentem baixa atividade enzimática ou que tenham sofrido modulação das enzimas (Gomes e cols., 2015). Além disso, Pinheiro e cols. (2006) e Santos e cols. (2009) demonstraram a relevância das ENTPDase de parasitos para processos de adesão e internalização pela célula hospedeira.

Assim, considerando que a *Leishmania* é capaz de hidrolisar o ATP extracelular para ter como produto final a adenosina, e que há uma correlação entre a hidrólise de nucleotídeos e a liberação de IL-1β, conforme apresentado na **Figura 3**, decidimos avaliar a participação da adenosina no processo de secreção de IL-1β, visto que alguns trabalhos já demonstraram sua importância no processo de ativação do inflamassoma e, consequentemente indução da liberação de IL-1β (Chiu e cols., 2014; Ouyang e cols., 2013).

6.4 A adenosina é importante para promover a liberação de IL-1β por células dendríticas infectadas

A produção de IL-1β é um passo central em uma ampla gama de respostas inflamatórias (Ouyang e cols., 2013). Levando em consideração que a ENTPDase de *Leishmania* pode hidrolisar ATP e, pela participação da 5'-nucleotidase, gerar adenosina, decidimos analisar se células dendríticas seriam capazes de aumentar a produção de IL-1β frente a adição de NECA, um análogo de adenosina.

Como esperado, células dendríticas tratadas apenas com NECA não são capazes de induzir a liberação de IL-1β **(Figura 7)**, visto que, como já citado na literatura, são necessários 2 sinais, LPS e ATP para o processamento e liberação desta citocina. Em contrapartida, células dendríticas tradadas com NECA e LPS foram capazes de aumentar a produção de IL-1β em relação ao grupo controle tratado apenas com LPS, o que sugere uma participação da adenosina na indução da via de IL-1β. Diferente do que esperávamos, o tratamento de células dendríticas com LPS+ATP+NECA não foi capaz de aumentar a liberação de IL-1β em relação ao seu grupo controle. Nossos resultados demonstram que a adenosina possa ser importante na indução da liberação de IL-1β.

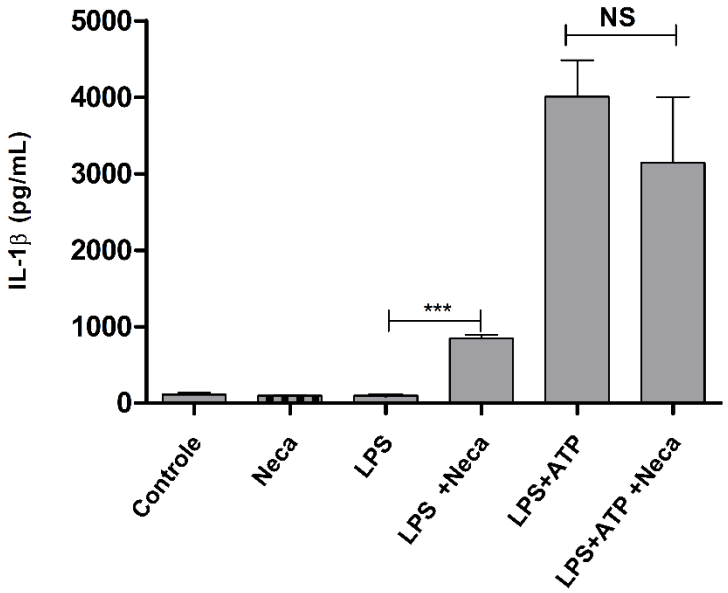

Figura 7: Células dendríticas tratadas com NECA são capazes de liberar IL-1β. Células dendríticas foram pré-tratadas com LPS 50ng/ml por 5 horas, lavadas e/ ou tratadas com NECA 1μM e ATP 1mM por durante 3 horas à 33°C e posteriormente por 3h à 37°C. A produção de IL-1β foi avaliada por método de ELISA. Os dados apresentados referem-se a média e desvio-padrão de três repetições independentes. Foi utilizado teste estatístico *t student*, em comparação ao grupo controle, ***p<0,0001.

Neste contexto, considerando que a infecção em células dendríticas por parasitos do gênero *Leishmania* poderia atuar na modulação da produção de IL-1β pela produção de adenosina, resolvemos avaliar por qual receptor a molécula de adenosina estaria atuando. Para isto, cultivamos as células em meio contento inibidores dos receptores de adenosina, SCH 58261 (receptor A2A) e MRS 1754 (receptor A2B) (Figura 8).

Curiosamente, ambos tratamentos com inibidores de do receptor de adenosina foram suficientes para reduzir significativamente a produção de IL-1β, tanto por grupos de células dendríticas estimuladas não-infectadas, como por grupos estimulados- infectadas.

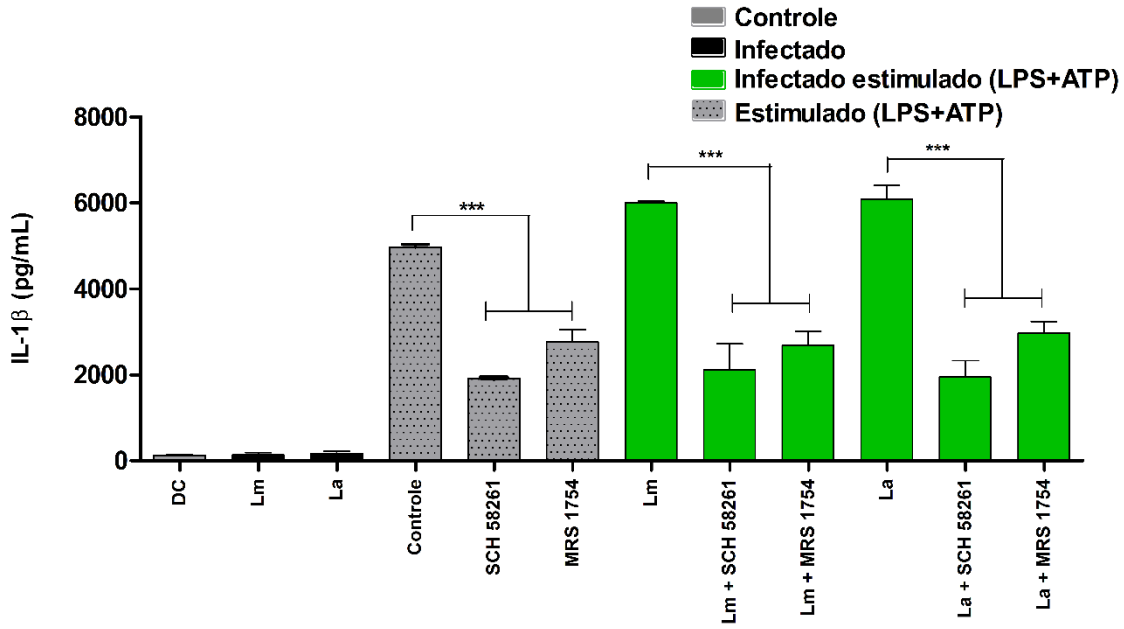

Figura 8: A adenosina é importante para promover a liberação de IL-1β por células dendríticas infectadas. Células dendríticas foram pré-tratadas com LPS 50ng/ml por 5 horas. Posteriormente foram lavadas e tratadas 30 min antes da infecção com SCH 58261 (5μM) e MRS1754 (5μM). Foram infectadas com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* e *L. major* na presença de ATP 1mM durante 3 horas à 33°C e posteriormente por 3h à 37°C. A produção de IL-1β foi avaliada por método de ELISA. Os dados apresentados referem-se a média e desvio-padrão de três repetições independentes. Foi utilizado teste estatístico One-Way ANOVA, seguido de teste Tukey, ***p< 0,0001.

Curiosamente, nossos dados revelam uma nova função da molécula de adenosina no processo de infecção por *Leishmania* e liberação de IL-1β por células dendríticas infectadas. Ao contrário do que imaginávamos, a adenosina, conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias, tem participação no aumento dos níveis da citocina pró-inflamatória IL-1β. Apesar de não termos dados que confirmem esta hipótese, acreditamos que a adenosina esteja sustentando a formação de um ambiente altamente inflamatório que favoreça o recrutamento celular e replicação do parasito.

Nossos dados demonstram pela primeira vez que a infecção por *L. amazonensis* e *L. major* são capazes de induzir a secreção de IL-1β através da influência da adenosina. Na literatura, temos que Chiu e cols. (2014) avaliaram o papel da adenosina como uma possível molécula indutora de comportamentos semelhantes a ansiedade, e demonstraram que a adenosina ao se ligar no seu receptor é capaz de induzir a liberação de IL-1β por duplicar a atividade de caspase-1 no cérebro de camundongos machos, através de uma via dependente de canais de potássio sensível a ATP, proteína quinase A (PKA) e via receptor A2A de adenosina. Ouyang e cols. (2013) demonstraram que a adenosina, apesar de não substituir os sinais fornecidos por estímulos, tais como LPS ou ATP, possui capacidade de sustentar a atividade do

inflamassoma através de uma via dependente de AMPc / PKA / CREB / HIF-1α, em macrófagos peritoneais murinos.

Neste contexto, comparando com outros trabalhos que avaliam a participação da adenosina, podemos verificar o envolvimento do receptor de adenosina A2B na modulação da resposta imunológica em favor da instalação de um ambiente anti-inflamatório, que é capaz de interferir negativamente na produção de óxido nítrico por macrófagos infectados por *L. amazonensis* e reduzir a produção de IL-12, de forma a favorecer a permanência do parasito (Gomes e cols., 2015). Além disso, em células dendríticas, a infecção por *L. amazonensis* inibe a ativação destas células através do receptor de adenosina A2B, seguindo a cascata de sinalização por AMPc, PI3K eERK1 /2 e impedindo, portanto, etapas subsequentes da resposta imune para eliminação do parasito (Figueiredo e cols., 2017).

Assim, nos deparamos com situações diferentes, mas que demonstram um possível papel da adenosina em favor do estabelecimento da infecção por parasitos do gênero *Leishmania.*

6.5 A liberação de IL-1β por células dendríticas infectadas é dependente do receptor P2X7

O receptor P2X7 tem um papel importante na resposta inflamatória, uma vez que sua ativação nas células do sistema imune (macrófagos, monócitos, células NK, linfócitos T e B e também em células dendríticas (Mutini e cols., 1999; Gu e cols., 2001; Gu e cols., 2004) funciona como um segundo sinal para a secreção da citocina IL-1β madura (Perregaux, 1994; Ferrari, 1996; Sanz e Di Virgilio, 2000; Ferrari e cols., 2006).

Assim, considerando que a infecção por parasitos do gênero *Leishmania* é capaz de induzir a liberação de ATP e também promover a hidrólise de ATP decidimos avaliar a participação do receptor P2X7 **(Figura 9).**

Conforme apresentado na **Figura 9**, o tratamento de células dendríticas com o inibidor do receptor P2X7 (A730004 a 50nM) foi capaz de modular negativamente a liberação da citocina IL-1β por células tratadas e infectadas por *L. amazonensis* e *L. major*. Este resultado sugere que é necessária a ativação do receptor P2X7, na presença de altas concentrações de ATP, para a liberação de IL-1β por células dendríticas infectadas por *Leishmania*. Além disso, este resultado associado aos dados da **Figura 7**, nos permite levantar a hipótese de que o a baixa indução da liberação de IL-1β por DC tratadas com LPS e NECA seja proveniente da não ativação de P2X7, visto que não houve adição de ATP neste grupo.

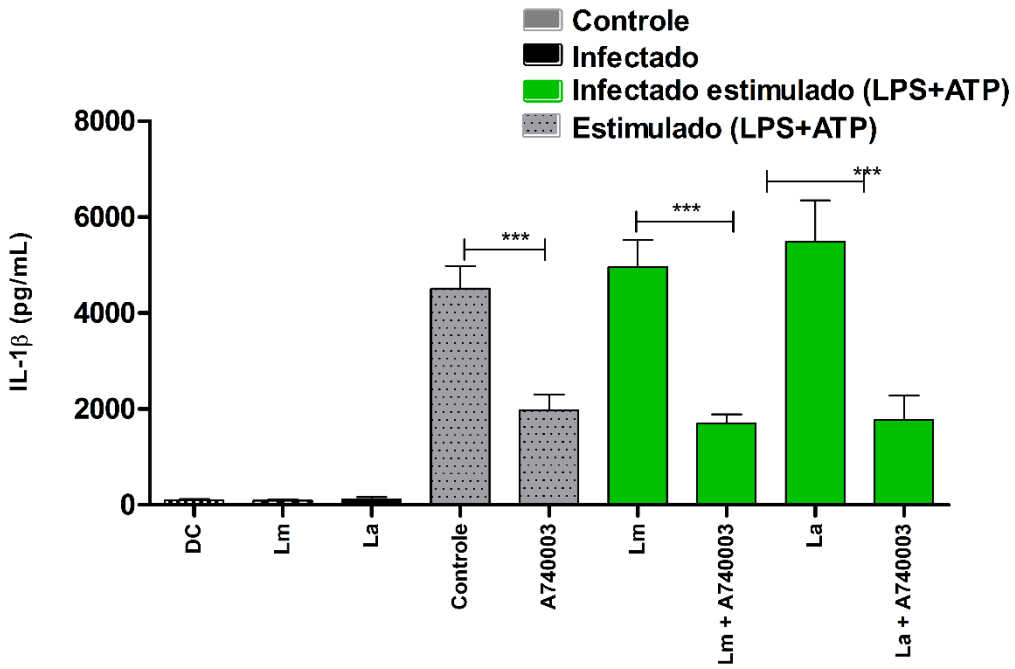

Figura 9: O receptor P2x7 possui papel na liberação de IL-1β por células dendríticas infectadas. Células dendríticas foram pré-tratadas com LPS 50ng/ml por 5 horas, lavadas e tratadas com 50nM de A730004 por 30 minutos antes da infecção e mantidos por 6h. Posteriormente infectadas com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* e *L. major* na presença de ATP 1mM durante 3 horas à 33°C e posteriormente por 3h à 37°C. A produção de IL-1β foi avaliada por método de ELISA. Os dados apresentados referem-se a média e desvio-padrão de três repetições independentes. Foi utilizado teste estatístico One-Way ANOVA, seguido de teste Tukey em comparação ao grupo controle, ***p<0,0001.

Considerando a participação do receptor P2X7 no processo de liberação de IL-1β, verificamos sua possível capacidade de favorecer a fagocitose, visto que ele tem sido descrito como sendo importante para induzir a eliminação de alguns micro-organismos (Coutinho-Silva e cols., 2003). Assim, avaliamos o percentual de células infectadas por contagem ao microscópio óptico e verificamos que sua ativação não está envolvida com o aumento da fagocitose em células dendríticas infectadas **(Figura 10).**

Em seguida decidimos avaliar se a ativação do receptor P2X7, em virtude da alta concentração de ATPe, seria responsável por induzir a apoptose celular por aumentar a permeabilização e formação de poros nas membranas celulares permitindo a passagem de grandes moléculas e, subsequentemente favorecendo processos subsequentes de apoptose celular (La Sala e cols., 2003; Donnelly –Roberts e Jarvis, 2007; Coddou e cols., 2011). Para isto, uma contagem de células viáveis foi realizada por exclusão em azul de tripan (0,4% Sigma). De acordo com a **Figura 11** o tratamento com uma alta concentração de ATP não interferiu no percentual de células viáveis nos grupos tratados com ATP ou LPS+ATP e/ou infectados.

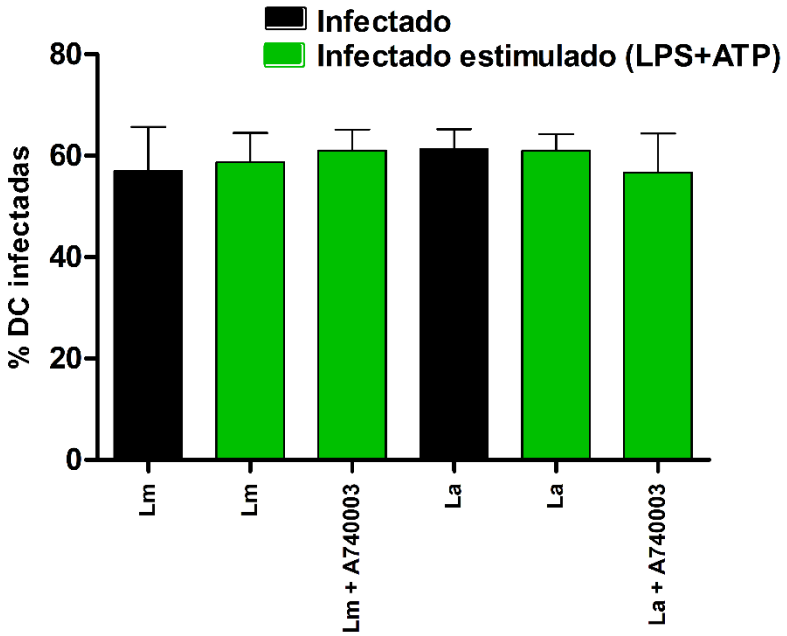

Figura 10: Infecção de células dendríticas por *L. amazonensis* e *L. major* na presença de inibidores de P2X7. Células dendríticas foram pré-tratadas com LPS 50ng/ml por 5 horas, lavadas e pré-tratadas com 50nM de A730004. Posteriormente infectadas com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* e *L. major* na presença ou ausência de A730004 e ATP 1mM durante 3 horas à 33° e posteriormente por 3h à 37°C. Os dados apresentados referem-se a média e desvio-padrão de três repetições independentes. Foi utilizado teste estatístico One-Way ANOVA, seguido de teste Tukey.

Esta informação condiz com as análises realizadas por Coutinho-Silva e cols (1999) que demonstraram que a incubação de células dendríticas com ATPe somente é capaz de mediar a apoptose a partir de doses superiores a 2mM. Não menos importante, Moore e Gmatlashewski, (1994) observaram que a infecção intracelular por *Leishmania donovani* em macrófagos derivados de medula óssea é capaz de inibir a apoptose celular, fato que também poderia justificar a manutenção da viabilidade celular.

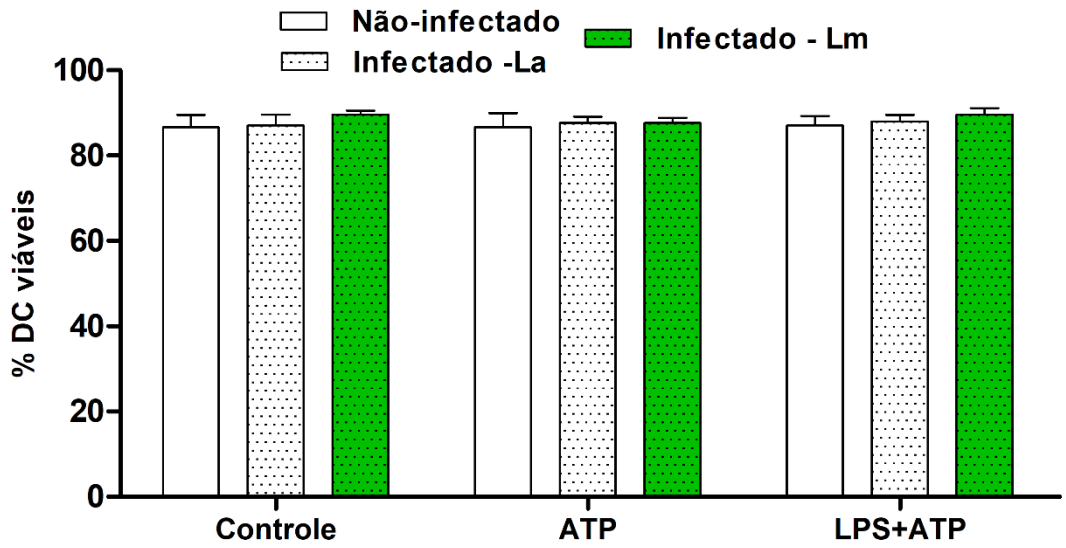

Figura 11: **Viabilidade de células dendríticas.** Células dendríticas foram pré-tratadas com LPS 50ng/ml por 5 horas, lavadas. Posteriormente infectadas com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* e *L. major* na presença de ATP 1mM durante 3 horas à 33° e por 3h à 37°C. A viabilidade celular foi avaliada por azul de tripan. Os dados apresentados referem-se a média e desvio-padrão de três repetições independentes. Foi utilizado teste estatístico One-Way ANOVA, seguido de teste Tukey.

De fato, nossos resultados enfatizam a importância do receptor P2X7 na secreção de IL-β por células dendríticas infectadas por *Leishmania* A ativação do receptor P2X7 tem sido relacionada com a eliminação de micro-organismos, como *Mycobacterium tuberculosis* em macrófagos humanos (Kusner e Adams, 2000) e também de *Chlamydia trachomatis* em macrófagos peritoneais murinos (Coutinho-Silva e cols., 2003) de forma dependente da molécula de ATP. Além disso, Lees e cols. (2010) verificaram que a infecção por *Toxoplasma gondii* em macrófagos derivados de camundongos *knock-out* para o receptor P2X7 ($P2X7R^{-/-}$) são incapazes de eliminar o parasito tão efetivamente quanto os macrófagos de camundongos do tipo selvagem. Fato que não foi encontrado em nossos resultados através da análise da taxa de infecção de células dendríticas **(Figura 10)** e que pode ser esclarecido pelo fato das células dendríticas não terem função direta em promover a morte de micro-organismos.

O conjunto de dados obtidos nos permite propor, que o ATP extracelular seja importante para inicializar a ativação da via de secreção de IL-1β, a partir da ativação do receptor P2X7, e que a adenosina gerada a partir da hidrólise de ATP por ectonucleotidase de *Leishmania* seja importante para sustentar a liberação desta citocina. Neste contexto, nossos dados demonstram que a ENTPDase de *Leishmania* é uma enzima importante para favorecer a indução da liberação de IL-1β, visto que, o bloqueio da atividade da ectonucleotidase e a tentativa de modulação da

expressão da mesma são capazes não somente de reduzir a liberação de IL-1β por células dendríticas infectadas, mas também interferir na capacidade destas células em internalizar estes parasitos. Além disso, mostramos que a infecção por *L. amazonensis* e por *L. major* em células dendríticas, previamente tratadas com LPS e ATP, é capaz de criar um ambiente inflamatório a partir da produção de adenosina, que diferente do que esperávamos, contribui para a liberação de IL-1β, uma citocina conhecida por suas propriedades pró-inflamatórias. Nossas perspectivas são descobrir se a liberação de IL-1β está favorecendo o processo de recrutamento celular, como de neutrófilos (Dey e cols., 2015) e assim influenciando na multiplicação dos parasitos em novas células hospedeiras, visto que, naturalmente os parasitos replicam por divisão binária dentro das células que se encontram, podendo promover o rompimento da membrana plasmática destas e reinfectar a novas células.

Por fim enfatizamos a importância do conhecimento dos mecanismos moduladores da resposta imune frente à instalação da Leishmaniose, que está fortemente correlacionada com uma efetiva atuação da resposta imunológica montada pelo hospedeiro acometido.

7. Conclusão

Os dados obtidos nos permitem demonstrar que tanto a infecção por *L. amazonensis* como por *L. major* em células dendríticas são capazes de promover a liberação de IL-1βde forma dependente da atividade ectonucleotidásica de *Leishmania* que auxilia na produção de adenosina que atua via receptores A2A e A2B e também pelo receptor P2x7.

ABBAS, Abul K; LICHTMAN Andrew H; PILLAI, Shiv. (2008) **Imunologia Celular e Molecular -** *Editora Elsevier* - 6ª edição.

ABBRACCHIO M.P. & CERUTI S. (2007) **P1 receptors and cytokine secretion.** *Purinergic Signalling* 3, 13-25.

AFONSO L et al CI. (**2008) Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*.** *J Leukoc Biol.* Aug;84(2):389-96.

AGA E et al. (2002). **Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania* major**. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md: 1950);169:898–905.

ALEXANDER, J.; RUSSELL, D. G. (1992) **The interaction of *Leishmania* species with macrophages**. *Advan. Parasitol.* 31, 175-254.

ANTONIOLI L, et al. (2014) Adenosine and inflammation: what's new on the horizon***? Drug Discov Today.* Aug;19(8):1051-68.** *Epub 2014* **Mar 6.**

APTE, R. N. AND VORONOV, E. (2008). **Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy?** *Immunol. Rev*. 222:222.

AWASTHI A, MATHUR RK, SAHA B. (2004). **Immune response to *Leishmania* infection.** *The Indian Journal of Medical Research.* ;119:238–258

BAUERNFEIND FG, HORVATH G, STUTZ A, ALNEMRI ES, MACDONALD K, et al (2009) **NF-kB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression**. *J Immunol*. 183: 787-79.

BENKO S, PHILPOTT D, GIRARDIN S. (2008). **The microbial and danger signals that activate Nod like receptors.** *Cytokine* 43: 368–373.

BEN-SASSON, S. Z. *et al* (2009**). IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106, 7119–7124.

BISAGGIO D.F., PERES-SAMPAIO C.E., MEYER-FERNANDES J.R. & SOUTO-PADRON T. **Ecto-ATPase activity on the surface of *Trypanosoma cruzi* and its possible role in the parasite-host cell interaction**. *Parasitol.Res.* 91, 273-282. (2003)

BISWAS SK, LOPEZ-COLLAZO E. (2009) **Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significanc**e. *Trends Immuno*l. 2009 Oct;30(10):475-87.

BLACK, R.A., KRONHEIM, S.R., CANTRELL, M., DEELEY, M.C., MARCH, C.J., PRICKETT, K.S., WIGNALL, J., CONLON, P.J., COSMAN, D., HOPP, T.P., ET AL. (1988). **Generation of biologically active interleukin-1 beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor**. *J. Biol. Chem*. 263, 9437–9442.

BOURS MJ, DAGNELIE PC, GIULIANI AL, WESSELIUS A, DI VIRGILIO F (2011) **P2 receptors and extracellular ATP: a novel homeostatic pathway in inflammation**. *Front Biosci (Schol Ed)* 3: 1443–1456. 235

BOURS, M.J.L. E.L.R. SWENNEN, F. DI VIRGILIO, B.N. CRONSTEIN, P.C. (2006), **DagnelieAdenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation** *Pharmacol. Ther*. 112 pp. 358-404.

BRITTINGHAM A & MOSSER D.M. (1996) **Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotas**. *Parasitol Today* 12. 444-447.

BRITTINGHAM A, MORRISON CJ, MCMASTER WR, MCGWIRE BS, CHANG KP, MOSSER DM. (1995) **Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis**. *J Immunol. Sep 15; 155(6):3102-11*.

BRITTINGHAM A., CHEN G., MCGWIRE B.S., CHANG K.P. e MOSSER D.M. (1999) **Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin**. *Infect.Immun***.** 67, 4477-4484.

BROWNE LE, JIANG LH, NORTH RA (2010) **New structure enlivens interest in P2X receptors.** *Trends Pharmacol Sci*. ;31:229–237.

BURNSTOCK G, CAMPBELL G, SATCHELL D, SMYTHE A.(1970) **Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut**. *Br J Pharmacol; 40*:668–688.

BURNSTOCK G, KNIGHT GE.(2004) **Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems**. *Int Rev Cytol*240:31–304.

BURNSTOCK G, SATCHELL DG, SMYTHE A. A (1972) **Comparison of the excitatory and inhibitory effects of nonadrenergic, non-cholinergic nerve stimulation and exogenously applied ATP on a variety of smooth muscle preparations from different vertebrate species**. *Br J Pharmacol*; 46:234–242.

BURNSTOCK G. (2003). **Purinergic receptors in the nervous system Curr. Top. in Membranes.** Vol. 54. *Purinergic Receptors and Signallinged. Schwiebert*, E.M. pp. 307–368.San Diego: Academic Press.

BURNSTOCK G. (2007) **Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission.** *Physiol Rev*. 87:659–797.

BURNSTOCK, G (2002) **Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:364–373.

BURNSTOCK, G. (2006). **Purinergic signalling**. *British Journal of Pharmacology*, *147*(Suppl 1).

CEKIC C, LINDEN J. (2016) **Purinergic regulation of the immune system**. *Nat Ver Immunol*. 16(3):177–92.10.1038/nri.2016.4.

CHANG, KP; CHAUDHURI, G; FONG, D. (1990).**Molecular determinants of *Leishmania* virulence.** *Ann Rev Microbiol.* 44, 499-529.

CHARLAB R, VALENZUELA JG, ROWTON ED, RIBEIRO JMC.(1999) **Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*.** *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA. ;96:15155–15160

CHARLAB, R; J.G. VALENZUELA, E.D. ROWTON, J.M.RIBEIRO. (1999)**Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis.*** *Proc Natl Acad Sci* USA, 96 , pp. 15155-15160.

CHARLES A. DINARELLO, AND SHELDON M. WOLFF (1993) **The Role of Interleukin-1 in Disease** *N Engl J Med* 328:106-113.

CHARMOY M, HURRELL BP, ROMANO A, LEE SH, RIBEIRO-GOMES F, RITEAU N, MAYER-BARBER K, TACCHINI-COTTIER F, SACKS DL (2016) **The Nlrp3 inflammasome, IL-1β, and neutrophil recruitment are required for susceptibility to a nonhealing strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice**. *Eur J Immunol.* Apr;46(4):897-911.

CHEN, G., SHAW, M.H., KIM, Y.G. & NUNEZ, G. (2009) **NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease.** *Annu. Rev. Pathol.* 4, 365–398.

CHIAO CW, TOSTES RC, WEBB RC. (2008) **P2X7 receptor activation amplifies lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity via interleukin-1 beta release.** *J Pharmacol Exp Ther*. Sep;326(3):864-70.

CHIU GS, DARMODY PT, WALSH JP, MOON ML, KWAKWA KA, BRAY JK, MCCUSKER RH, FREUND GG. (2014**) Adenosine through the A2A adenosine receptor increases IL-1β in the brain contributing to anxiety.** Brain Behav Immun. 2014 Oct;41:218-31.

CODDOU C., YAN Z., OBSIL T., HUIDOBRO-TORO J. P. AND STOJILKOVIC S. S. (2011). **Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels.** *Pharmacol. Rev*. 63, 641-683.

COLLIN, M., MCGOVERN, N., & HANIFFA, M. (2013). **Human dendritic cell subsets.** *Immunology*, *140*(1), 22–30.

COQUERELLE C, MOSER M.. DC. (2010) **DC subsets in positive and negative regulation of immunity**. *Immunol Rev.* Mar;234(1):317-34.

COUTINHO-SILVA R, et al. (2003). **Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X$_7$ receptor-dependent phospholipase D activation**. *Immunity* 19:403–412.

COUTINHO-SILVA R, PERSECHINI PM, BISAGGIO RD, PERFETTINI JL, NETO AC, KANELLOPOULOS JM, MOTTALY I, DAUTRY-VARSAT A, OJCIUS DM **(1999) P2Z/P2X7 receptor-dependent apoptosis of dendritic cells**. *Am J Physiol* 276: C1139-47.

COUTINHO-SILVA R, PERSECHINI PM. (1997) **P2Z purinoceptor-associated pores induced by extracellular ATP in macrophages and J774 cells** *Am J Physiol.* 1997 Dec;273(6 Pt 1):C1793-800.

CUMBERBATCH,R.J. DEARMAN, R.W. GROVES, C. ANTONOPOULOS, I. KIMBER. (2002) **Differential regulation of epidermal Langerhans cell migration by interleukins (IL)-1alpha and IL-1beta during irritant- and allergen-induced cutaneous immune responses** *Toxicol Appl Pharmacol, 182* , pp. 126-135.

D.R. FREYER, L.A. BOXER, R.A. AXTELL, R.F. TODD **Stimulation of human neutrophil adhesive properties by adenine nucleotides** *J Immunol,* 141 (2) (1988), pp. 580-586

DA SILVA R, SACKS DL. (1987) **Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation**. *Infection & Immunity*;55:2802–2806.

DE SOUZA, E.A. DE ASSIS, R.S. GOMES, E.A. DE MARQUES DA SILVA, M.N. MELO, J.L. FIETTO, L.C. AFONSO. (2010) **The influence of ectonucleotidases on *Leishmania amazonensis* infection and immune response in C57B/6 mice.** *Acta Tropica*, 115, pp. 262-269.

DESJARDINS M. & DESCOTEAUX A. (1997) **Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan**. *J.Exp.Med.* 185, 2061-2068.

DEY R, JOSHI AB, OLIVEIRA F, PEREIRA L, GUIMARÃES-COSTA AB, SERAFIM TD, DE CASTRO W, COUTINHO-ABREU IV, BHATTACHARYA P, TOWNSEND S, ASLAN H, PERKINS A, KARMAKAR S, ISMAIL N, KARETNICK M, MENESES C, DUNCAN R, NAKHASI HL, VALENZUELA JG, KAMHAWI S (2018). **Gut Microbes Egested during Bites of Infected Sand Flies Augment Severity of Leishmaniasis via Inflammasome-Derived IL-1β**. *Cell Host Microbe*. Jan 10;23(1):134-143.e6.

DI VIRGILIO F. (2007). **Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome**. *Trends Pharmacol. Sci.*28 465–472.

DINARELLO CA, WOLFF SM (1993). **The role of interleukin-1 in disease**. *N Engl J Med*;328:106–113.

DINARELLO CA. (2006) **Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process**. *Am J Clin Nutr.*Feb;83(2):447S-455S.

DINARELLO CA. (2011) **Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory** *Diseases. Blood.*117:3720–3732.

DINARELLO, C. A (1996). **Biologic basis for interleukin-1 in disease.** Blood 87, 2095–2147.

DIVIRGILIO F., CHIOZZI P., FERRARI D., FALZONI S., SANZ J.M., MORELLI A., TORBOLI M., BOLOGNESI G., BARICORDI O.R. **Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells**. *Blood.* 2001;97:587–600.

DONNELLY-ROBERTS DL, JARVIS MF. (2007) **Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states**. *Br J Pharmacol.* ;151:571–579**.**

DOSREIS, G.A. A.F. NOBREGA, R.P. (1986) **Purinegic modulation of T-lymphocyte activation: differential susceptibility of distinct activation steps and correlation with intracellular 3′,5′-cyclic adenosine monophosphate accumulation.** *Cell Immunol.* Aug;101(1):213-31.

FALKOFF RJ, MURAGUCHI A, HONG JX, BUTLER JL, DINARELLO CA, FAUCI AS. (1983) **The effects of interleukin 1 on human B cell activation and proliferation** *J Immunol*. Aug;131(2):801-5.

FAVALI C, TAVARES N, CLARENCIO J, BARRAL A, BARRAL-NETTO M, BRODSKYN C. (2007) ***Leishmania amazonensis* infection impairs differentiation and function of human dendritic cells**. *J Leukoc Biol*.82:1401–1406.

FERNÀNDEZ-FIGUEROA EA, RANGEL-ESCAREÑO C, ESPINOSA-MATEOS V, CARRILLO-SÀNCHEZ K, SALAIZA-SUAZO N, CARRADA-FIGUEROA G, MARCH-MIFSUT S, BECKER I. (2012) **Disease severity in patients infected with *Leishmania* mexicanarelates to IL-1β.** *PLoS Negl Trop Di*s.

FERRARI D, CHIOZZI P, FALZONI S, DAL SM, MELCHIORRI L, BARICORDI OR, DI VF.(1997) **Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages**. *J Immunol*159:1451–1458 .

FERRARI D, PIZZIRANI C, ADINOLFI E, LEMOLI RM, CURTI A, IDZKO M, PANTHER E, DI VF.(2006) **The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release.** J *Immunol* 2006;176:3877–3883.

FERRARI, D., M. VILLALBA, P. CHIOZZI, S. FALZONI, P. RICCIARDI-CASTAGNOLI, F. DI VIRGILIO. (1996) **Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP**. *J. Immunol.* **156**:1531.

FERRERO-MILIANI L, NIELSEN OH, ANDERSEN PS, GIRARDIN SE. (2007) **Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1β generation. *Clinical and* *Experimental Immunology*.**;147(2):227-235.

FETTELSCHOSS, A., KISTOWSKA, M., LEIBUNDGUT-LANDMANN, S., BEER, H.-D., JOHANSEN, P., SENTI, G., … KÜNDIG, T. M. (2011). **Inflammasome activation and IL-1β target IL-1α for secretion as opposed to surface expression**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(44), 18055–18060.

FIETTO J.L., DEMARCO R., NASCIMENTO I.P., CASTRO I.M., CARVALHOT.M., DE S.W., Bahia M.T., Alves M.J. & Verjovski-Almeida S.(2004) **Characterization and immune localization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi***. Biochem. Biophys.Res.Commun. 316, 454-460.

FIGUEIREDO AB, SOUZA-TESTASICCA MC, AFONSO LC. (2016) P**urinergic signaling and infection by *Leishmania*: A new approach to evasion of the immune response**. *Biomed J*. 2016 Aug;39(4):244-250Epub 2016 Sep 21. Review.

FIGUEIREDO AB, SERAFIM TD, MARQUES-DA-SILVA EA, MEYER-FERNANDES JR, AFONSO LC.(2012**) *Leishmania amazonensis* impairs DC function by inhibiting CD40 expression via A2B adenosine receptor activation** *Eur J Immunol.* 2012 May;42(5):1203-15.

FRANCHI, L., KANNEGANTI, T.D., DUBYAK, G.R. & NUNEZ, G. (2007) **Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K+ for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria.** *J. Biol. Chem.* 282, 18810–18818

FREDHOLM BB, IJZERMAN AP, JACOBSON KA, LINDEN J, MULLER CE.(2011) I**nternational union of basic and clinical pharmacology**. **Nomenclature and classification of adenosine receptors—**an update. *Pharmacol* Rev;63:1e34.

G. BURNSTOCK, (1972) **Purinergic nerves**, *Pharmacol. Rev*. 24. 509–581.

GARDELLA,S.C; ANDREI, L.V. LOTTI, A. POGGI, M.R. TORRISI, M.R. ZOCCHI, A. R UBARTELLI (2001) **CD8$^+$ T lymphocytes induce polarized exocytosis of secretory lysosomes by dendritic cells with release of interleukin-1β and cathepsin D**. *Blood*, 98, pp. 2152-2159

GARLANDA, C., DINARELLO, C. A., & MANTOVANI, A. (2013). T**he interleukin-1 family: back to the future**. *Immunity*, *39*(6), 1003–1018.

GOMES RS, DE CARVALHO LC, DE SOUZA VASCONCELLOS R, FIETTO JL, AFONSO LC. (2015) **ENTPDase(ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) of *Leishmania amazonensis* inhibits macrophage activation**. *Microbes Infect*. Apr;17(4):295-303.

GRIMALDI G., JR. & TESH R.B. (1993) ***Leishmania*ses of the New World: current concepts and implications for future research**. *Clin.Microbiol.Rev.* 6, 230-250.

GU BJ, SLUYTER R, SKARRATT KK, SHEMON AN, DAO-UNG LP, FULLER SJ, BARDEN JA, CLARKE AL, PETROU S, WILEY JS. (2004) A**n Arg307 to Gln polymorphism within the ATP-binding site causes loss of function of the human P2X7 receptor.** *J Biol Chem.* Jul 23;279(30).

GU BJ, ZHANG W, WORTHINGTON RA, SLUYTER R, DAO-UNG P, PETROU S, BARDEN JA, WILEY JS. (2001**) A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor.** *J Biol Chem. Apr 6;276(14).*

GUERRA, A.N; FISETTE, L; PFEIFFER, Z.A.; QUINCHIA-RIOS, B.H ; PRABHU, U ; AGA, M *et al.* (2003) **Purinergic receptor regulation of LPS-induced signaling and pathophysiology**J *Endotoxin Res*, 9 (4) (2003), pp. 256-263

HASKÓ, GYÖRGY, AND PÀL PACHER. (2008) "**A_{2A} Receptors in Inflammation and Injury: Lessons Learned from Transgenic Animals**." Journal of leukocyte biology 83.3 **447–**455. *PMC*. Web. 23 Oct. 2017.

HAZUDA, D.J., STRICKLER, J., KUEPPERS, F., SIMON, P.L., AND YOUNG, P.R. (1990). **Processing of precursor interleukin 1 beta and inflammatory disease**. *J. Biol. Chem*. 265, 6318–6322.

HERMIDA, M. D.; DORIA, P. G.; TAGUCHI, A. M.; MENGEL, J. O.; DOS-SANTOS, W.(2014). ***Leishmania amazonensis*** **infection impairs dendritic cell migration from the inflammatory site to the draining lymph node**. *BMC.Infect.Dis.*, v. 14, n. 450.

HORNUNG, V. *et al.* (2008) **Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization**. *Nat. Immunol.* 9, 847–856.

J Leukoc Biol, 60 (1) (1996), pp. 77-80

JOOSTEN, L.A., NETEA, M.G., FANTUZZI, G., KOENDERS, M.I., HELSEN, M.M., SPARRER, H., PHAM, C.T., VAN DER MEER, J.W., DINARELLO, C.A., AND VAN DEN BERG, W.B. (2009). **Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin- 1beta**. *Arthritis Rheum*. 60, 3651–3662.

JUNGER, W. G.(2011) **Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling.** Nature *Reviews Immunology*, v.11, n.3, Mar.

KAMHAWI, S. (2000) **The biological and immunomodulatory properties of sandfly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections**. *Microbes and Infection*, 2, 1765–1773.

KANE M.M. & MOSSER D.M. (2000) ***Leishmania*** **parasites and their ploys to disrupt macrophage activation.** *Curr.Opin.Hematol.* 7, 26-31.

KANNEGANTI TD, LAMKANFI M, KIM YG, CHEN G, PARK JH, FRANCHI L, VANDENABEELE P, NÚÑEZ G. (2007) **Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling.** *Immunity*. *Apr;*26(4):433-43.

KANNEGANTI TD[1], LAMKANFI M, NÚÑEZ G. (2007) **Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease**. *Immunity*. Oct;27(4):549-59.

KHAKH B. S., NORTH R. A. (2012). **Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS**. *Neuron* 76, 51–69.

KHAKH BS, NORTH RA. (2006) **P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease.** *Nature*;442:527–532.

KIRLEY T.L., YANG F. & IVANENKOV V.V. (2001) **Site-directed mutagenesis of human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3: the importance of conserved glycine residues and the identification of additional conserved protein motifs in eNTPDases**. *Arch Biochem Biophys.* 395, 94-102.

KUMAR V, SHARMA A (2009) **Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential.** *Eur J Pharmacol. Aug* 15;616(1-3):7-15.

KUSNER, D. J., AND J. ADAMS. (2000**). ATP-induced killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* within human macrophages requires phospholipase** *D. J. Immunol*. 164**:**379-388.

LA SALA A., FERRARI D., DI VIRGILIO F., IDZKO M., NORGAUER J., GIROLOMONI G (2003). **Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides.** *J. Leukoc. Biol.* 2003;73:339–343.

LA SALA, A., FERRARI, D., CORINTI, S., CAVANI, A., DI VIRGILIO, F., GIROLOMONI, G. (2001) **Extracellular ATP induces a distorted maturation of dendritic cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses**. *J. Immunol.* 166, 1611–1617

LABASI JM, PETRUSHOVA N, DONOVAN C, MCCURDY S, LIRA P, PAYETTE MM, ET AL.(2002) **Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response**. *J Immunol.* ;168:6436–6445.

LALIBERTE, R. E., J. EGGLER, AND C. A. GABEL (1999) **ATP treatment of human monocytes promotes caspase-1 maturation and externalization**. *J. Biol. Chem. 274:36944*

LANGSTON H.P., KE Y., GEWIRTZ A.T., DOMBROWSKI K.E. & KAPP J.A. (2003) **Secretion of IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4, by antigens pecific T cells requires extracellular ATP**. *J.Immunol.* 170, 2962-2970.

LEMAIRE,I; LEDUC,N. (2003) **Purinergic P2X7 receptor function in lung alveolar macrophages: pharmacologic characterization and bidirectional regulation by Th1 and Th2 cytokines**. *Drug Dev Res*, 59 (2003), pp. 118-127

LICHTMAN AH, CHIN J, SCHMIDT JA, ABBAS AK. (1988) **Role of interleukin 1 in the activation of T lymphocytes.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec;85(24):9699-703.

LIEW F.Y., MILLOTT S., PARKINSON C., PALMER R.M. & MONCADA S. (1990) **Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine**. *J.Immunol.* 144, 4794-4797.

LIMA HC, TITUS RG (1996). **Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice**. *Infect Immun 64*: 5442-5445.

LIMA-JUNIOR DS, COSTA DL, CARREGARO V, CUNHA LD, SILVA AL, MINEO TW, GUTIERREZ FR, BELLIO M, BORTOLUCI KR, FLAVELL RA, BOZZA MT, SILVA JS, ZAMBONI DS (2013) **Inflammasome-derived IL-1β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania***. *Nat Med. Jul;19(7):909-15.*

LIU J, YANG AR, KELLY T, PUCHE A, ESOGA C, JUNE HL, JR, et al. (2011) **Binge alcohol drinking is associated with $GABA_A\alpha2$-regulated Toll-like receptor 4 (TLR4) expression in the central amygdala.** *Proc Natl Acad Sci* USA.;108:4465–4470.

LODGE, Robert; DESCOTEAUX, Albert (2005) **Modulation of phagolyso some biogenesis by the lipophosphogly can of *Leishmania*** - *Clinical Immunology* 114, 256– 265.

MAIOLI T.U., TAKANE E., ARANTES R.M., FIETTO J.L. & AFONSO L.C. (2004) **Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice**. *Parasitol.Res.* 94, 207-212.

MALDONADO-LÓPEZ R, MOSER M. (2013) **Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses.** *Immunology.* Sep;140(1).

MALDONADO-LOPEZ, R. & MOSER, M. (2001). **Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses.** *Semin Immunol* 13, 275–282.

MARIATHASAN, S., MONACK, D.M. (2007) **Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation**. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 7, p. 31-40.

MARQUES-DA-SILVA E.A., OLIVEIRA J.C., FIGUEIREDO A.B., LIMA JUNIOR D.S., CARNEIRO C.M., FIETTO J.L.R. & AFONSO L.C.C. (2008) **Extracellular nucleotide**

metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. *Microbes Infect*. 10, 850-857.

MARTINEZ, N. A., AYALA, A. M., MARTINEZ, M., MARTINEZ-RIVERA, F. J., MIRANDA, J. D., & SILVA, W. I. (2016). **Caveolin-1 Regulates the $P2Y_2$ Receptor Signaling in Human 1321N1 Astrocytoma Cells**. *The Journal of Biological Chemistry*, *291*(23), 12208–12222. http://doi.org/10.1074/jbc.M116.730226.

MARTINON F, MAYOR A, TSCHOPP J. (2009)**The inflammasomes: Guardians of the body**. *Annu Rev Immunol*;27:229–265.

MEHTA, V. B., J. HART, AND M. D. WEWERS (2001) **ATP-stimulated release of interleukin (IL)-1β and IL-18 requires priming by lipopolysaccharide and is independent of caspase-1 cleavage**. *J. Biol. Chem. 276:3820*.

MEYER- FERNANDES J. R. (2002) **Ecto-ATPases in protozoa parasites: looking for a funciotion.** *Parasitol, Int* 51,299-303.

MEYER-FERNANDES JR, SAAD-NEHME J, PERES-SAMPAIO CE, BELMONT-FIRPO R, BISAGGIO DF, DO COUTO LC, FONSECA DE SOUZA AL, LOPES AH, SOUTO-PADRÓN T.(2004) **A Mg-dependent ecto-ATPase is increased in the infective stages of Trypanosoma cruzi.** *Parasitol Res*. May;93(1):41-50.

MIZUTANI, H., SCHECHTER, N., LAZARUS, G., BLACK, R.A., AND KUPPER, T.S. (1991). **Rapid and specific conversion of precursor interleukin 1 beta to an active IL-1 species by human mast cell chymase.** *J. Exp. Med*. 174, 821–825.

MÓCSAI, ATTILA.(2013) **Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond**. *J Exp Med* Jul 1; 210(7): 1283–1299.

MOSSER, DAVID; ROSENTHAL, LOUIS A. 1; SUTTERWALA, FAYYAZ S.; KEHRLI, MARCUS E. (1996*)* ***Leishmania major*-Human Macrophage Interactions: Cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and Complement Receptor Type 1 (CD35) in Promastigote Adhesion.** *Infect Immun.* 64, 2206–2215.

MOUGNEAU E., BIHL F., GLAICHENHAUS N. (2011). **Cell biology and immunology of *Leishmania***. *Immunol.* Rev. 240,

MURRAY H.W. (1982) **Cell-mediated immune response in experimental visceral *Leishmania*sis. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes**. *J.Immunol.* 129, 351-357.

MUTINI C, FALZONI S, FERRARI D, CHIOZZI P, MORELLI A, BARICORDI OR, COLLO G, RICCIARDI-CASTAGNOLI P, DI VIRGILIO F. (1999) **Mouse dendritic**

cells express the P2X7 purinergic receptor: characterization and possible participation in antigen presentation. *J Immunol.* Aug 15;163(4):1958-65.

NETEA MG, SIMON A, VAN DE VEERDONK F, KULLBERG BJ, VAN DER MEER JW, JOOSTEN LA. (2010) **IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes**. *PLoS Pathog. Feb* 26;6(2):e1000661.

NEVES DP (2004**). Parasitologia Humana**. 11ª edição. *Editora Atheneu*. São Paulo.

ORYU, M, SAKAMOTO, H; OGAWA, Y; TANAKA, S; SAKAMOTO, N (1996) **Effects of released products from platelets on neutrophilic adhesion to endothelial cells and nylon fibers.** *J Leukoc Biol*.jul;60(1):77-80

OUYANG X, GHANI A, MALIK A, WILDER T, COLEGIO OR, FLAVELL RA, CRONSTEIN BN, MEHAL WZ. (2013)**. Adenosine is required for sustained inflammasome activation via the A_2A receptor and the HIF-1α pathway**. *Nat Commun. ;4:2909.*

PALETTA-SILVA R, VIEIRA DP, VIEIRA-BERNARDO R, MAJEROWICZ D, GONDIM KC, VANNIER-SANTOS MA, LOPES AH, MEYER-FERNANDES JR. (2011) ***Leishmania amazonensis*: characterization of an ecto-3'-nucleotidase activity and its possible role in virulence.** *Exp Parasitol*. Nov;129(3):277-83.

PELEGRIN P, SURPRENANT A. (2006) **Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor.** *EMBO J. Nov 1; 25(21):5071-82.*

PELLEGATTI P, FALZONI S, PINTON P, RIZZUTO R, DI VIRGILIO F (2005) **A Novel Recombinant Plasma Membrane-targeted Luciferase Reveals a New Pathway for ATP Secretion.** *Mol Biol Cell* 16: 3659–3665.

PERREGAUX, D., C. A. GABEL. (1994). **Interleukin-1β maturation and release in response to ATP and nigericin.** *J. Biol. Chem.* **269**:15195

PERREGAUX, D., J. BARBERIA, A. J. LANZETTI, K. F. GEOGHEGAN, T. J. CARTY, AND C. A. GABEL (1992) **IL-1β maturation: evidence that mature cytokine formation can be induced specifically by nigericin**. *J. Immunol. 149:1294.*

PÉTRILLI V, PAPIN S, DOSTERT C, MAYOR A, MARTINON F, TSCHOPP J. (2007) **Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration.** *Cell Death Diffe*r. Sep;14(9):1583-9.

PICCINI, S.A. CARTA, S. TASSI, D. LASIGLIÉ, G.FOSSATI, A. RUBARTELLIA**T. (**2008). **ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1β and IL-18 secretion in an autocrine way.** *Proc Natl Acad Sc*i U S A. Jun 10;105(23):8067-72.

Pizzirani, C.; Ferrari, D; Chiozzi, P; Adinolfi, E; Sandonà, D; Savaglio, E; Di Virgilio, F (2007) **Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1β-loaded microvesicles from human dendritic cells.** *Blood*, 109, pp. 3856-3864

PRINA, E.; ABDI, S. Z.; LEBASTARD, M.; PERRET, E.; WINTER, N.; ANTOINE, J. C. (2004) **Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation**. *J.Cell Sci.*, v. 117, n. Pt 2, p. 315-325,

PULTE ED, BROEKMAN MJ, OLSON KE, DROSOPOULOS JH, KIZER JR, ISLAM N, MARCUS AJ (2007) **CD39/NTPDase-1 activity and expression in normal leukocytes**. *Thromb Res*.;121(3):309-17.

QI H, POPOV V, SOONG L. (2001) ***Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions in vitro and the priming of parasite-specific CD4(+) T cells in vivo**. J Immunol.167:4534–4542.

RALEVIC V, BURNSTOCK G (1998) **Receptors for purines and pyrimidines**. *Pharmacol Rev* 50:413–492.

RIBEIRO J.A (1999). **Adenosine A_{2A} receptor interactions with receptors for other neurotransmitters and neuromodulators**. *Eur. J. Pharmacol*.375:101–113.

RIBEIRO, J.M.C., P.A . ROSSIGNOL, AND A . SPIEHNAN. (1986). **Bloodfinding strategy of a capillary-feeding sandfly, Lutzomyia longipalpis .** *Comp. Biochem* . Physiol. 83 :683ª.

RIBEIRO-GOMES F., PETERS N. C., DEBRABANT A., SACKS D. A. (2012**). Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-*Leishmania* response.** *PloS Pathog.* 8:e1002536 10.1371

RIDER P, CARMI Y, GUTTMAN O, BRAIMAN A, COHEN I, VORONOV E, WHITE MR, DINARELLO CA, APTE RN. ((2011**) IL-1α and IL-1β recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation.** *J Immunol. 2011 Nov* 1;187(9):4835-43. doi: 10.4049/jimmunol.1102048. Epub 2011 Sep 19.

ROBSON SC, SÉVIGNY J, ZIMMERMANN H. (2006) **The ENTPDasefamily of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance.** *Purinergic Signal.* Jun;2(2):409-30.

ROUNDS, L.L. LIKAR, E.O. HARRINGTON, K.C. KIM, A. SMEGLIN, K. HEINS, E COLS. (1999), **Nucleotide-induced PMN adhesion to cultured epithelial cells: possible role of MUC1 mucin**.*Am J Physiol*, 277 (5 Pt 1)

SANSOM FM, NEWTON HJ, CRIKIS S, CIANCIOTTO NP, COWAN PJ, D'APICE AJ, HARTLAND EL.(2007) **A bacterial ecto-triphosphate diphosphohydrolase similar to human CD39 is essential for intracellular multiplication of Legionella pneumophila.** *Cell Microbiol*. Aug;9(8):1922-35.

SANTOS RF, POSSA MA, BASTOS MS, GUEDES PM, ALMEIDA MR, DEMARCO R, et al. (2009) **Influence of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence.** PLoS Negl Trop Dis ;3:e387.

SANZ JM, DI VIRGILIO F. (2000) **Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 beta release from microglial cells**. *J Immunol.*164:4893–4898.

SCHLEIN, Y; JACOBSON, RL; MESSER, G. (1992*).**Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sand fly vector and implement parasite transmission by bite.** *ProcNatlAcadSci* U S A. 89, 9944-9948.

SCHULTE G. E FREDHOLM B.B. (2003**) Sinalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases.** Cell Signal. 15:813-27.

SHARMA, UMAKANT; SINGH, SARMAN. (2009) **Imunobiology of *Leishmania*sis**. Indian Journal of Experimental Biology.47, 412-423.

SILVEIRA, FERNANDO T;. MÜLLER, SILVIA R; SOUZA, ADELSON A.A. DE; LAINSON, RALPH; GOMES; D. LAURENTI, CLAUDIA M.C., MARCIA; CORBETT, CARLOS E.P. (2008**) Revisão sobre a patogenia da leishmaniose tegumentar americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis E Leishmania* (L.) *amazonensis.*22, 9-19**

SMITH TM, CARL SAL, KIRLEY TL (1999) **Mutagenesis of two conserved tryptophan residues of the E-type ATPases: inactivation and conversion of an ecto-apyrase to an Ecto-NTPase.** *Biochemistry* 38:5849–5857.

SPERLAGH B, HASKO G, NEMETH Z, VIZI ES. (1998) **ATP released by LPS increases nitric oxide production in raw 264.7 macrophage cell line via P2Z/ P2X7 receptors**. *Neurochem Int.* 1998;33:209–21.

SPERLÀGH B, MAGLÓCZKY E S, VIZI E S, FREUND T F. (1998) **The triangular septal nucleus as the major source of ATP release in the rat habenula: a combined neurochemical and morphological study**. *Neuroscience*.;86:1195–1207.

SPERLAGH, B; HASKO, G; NEMETH, Z; VIZI, E.S. (1993) **ATP released by LPS increases nitric oxide production in raw 264.7 macrophage cell line via P2Z/P2X7 receptors** *Neurochem Int*, 33 (3), pp. 209-215.

STEINMAN RM, HAWIGER D, NUSSENZWEIG MC. (2003). **Tolerogenic dendritic cells.** *Annu Rev Immunol* 21: 685 –711.

STEINMAN, R. M. (2003) T**he control of immunity and tolerance by dendritic cells**. *Pathol. Biol.* 51, 59–60.

STYLIANOU, E. AND SAKLATVALA, J. (1998). **Interleukin-1.** *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 30:1075.

SUH, B.C. ; KIM, J.S.; NAMGUNG, U.; KIM, H. HA, K.T. (2001) **P2X7 nucleotide receptor mediation of membrane pore formation and superoxide generation in human promyelocytes and neutrophils.** *J Immunol*. Jun 1;166(11):6754-63

T. JAKOB, M.C. Udey. (1998) **Regulation of E-cadherin-mediated adhesion in Langerhans cell-like dendritic cells by inflammatory mediators that mobilize Langerhans cells *in* vivo** J Immunol, 160 , pp. 4067-4073.

TAKENOUCHI T, SEKIYAMA K, SEKIGAWA A, FUJITA M, WARAGAI M, SUGAMA S, IWAMARU Y, KITANI H, HASHIMOTO M (2010) **P2X7 receptor signaling pathway as a therapeutic target for neurodegenerative diseases**. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. Apr;58(2):91-6

TEIXEIRA MJ, TEIXEIRA CR, ANDRADE BB, BARRAL NETTO M, BARRAL A (2006) **Chemokines in host-parasite interactions in *Leishmania*sis**. *Trends Parasitol* 22: 32–40.

TRAUTMANN, A. (2009) **Extracellular ATP in the immune system: more than just a "danger signal".** *Sci. Signal.* 2, pe6.

VAN DE VEERDONK, F.L. M.G. NETEA. (2013) **New Insights in the immunobiology of IL-1 family members** *Front Immunol, 4 (167) pp. 1-11*.

WANG TF, GUIDOTTI G. (1996) **CD39 is an ecto-(Ca2+, Mg2+)-apyrase.** J *Biol Chem*.271:9898–901.

WEN H, TING JP, O'NEILL LA. (2012) **A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases – did Warburg miss inflammation**. *Nat Immunol.*13:352–357

WILEY JS, SLUYTER R, GU BJ, STOKES L, AND FULLER SJ (2011) **The human P2X7 receptor and its role in innate immunity**. *Tissue Antigens 78*:321–332.

XIN, LIJUN YONGGUO LI, AND LYNN SOONG1. (2007) **Role of Interleukin-1 in Activating the CD11chigh CD45RB Dendritic Cell Subset and Priming *Leishmania amazonensis*Specific CD4 T Cells In Vitro and In Vivo.** *INFECTION AND IMMUNITY*, p. 5018–5026 Vol.

YAN Z., KHADRA A., LI S., TOMIC M., SHERMAN A., STOJILKOVIC S. S. (2010). **Experimental characterization and mathematical modeling of P2X7 receptor channel gating.** *J. Neurosci*. 30.

YEGUTKIN GG (2008) **Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade**. *Biochim Biophys Acta.*

YOUNG M. T (2010). **P2X receptors: dawn of the post-structure era**. *Trends Biochem. Sci.*

ZHOU,R. A.S. YAZDI, P. MENU, J. TSCHOPP. (2011) **A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation** *Nature,* 469 pp. 221-225.

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

ZIMMERMANN H. (2001) **Ectonucleotidases: Some recente developments and note on nomenclature,** *Drug Dev Res;* 52:44-56.