

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE BIOMEDICINA**

GEOVANNA MEDEIROS DE OLIVEIRA

**EFEITOS DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NAS INFECÇÕES POR
*Leishmania amazonensis***

Goiânia
2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC no 1240/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei no 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG)

Nome(s) completo(s) do(a)(s) autor(a)(es)(as): Geovanna Medeiros de Oliveira,

Título do trabalho: "Efeitos da sinalização purinérgica nas infecções por *Leishmania amazonensis*"

2. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador) Concorda com a liberação total do documento [x] SIM [] NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(à)(s) autor(a)(es)(as) e ao(à) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo do TCCG. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro.

Obs.: Este termo deve ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Saar Gomes**, Coordenador de Pós-Graduação, em 10/12/2024, às 14:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Geovanna Medeiros De Oliveira**, Discente, em 10/12/2024, às 17:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5008623** e o código CRC **02FE985F**.

Geovanna Medeiros de Oliveira

**EFEITOS DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NAS INFECÇÕES POR
*Leishmania amazonensis***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina, da Universidade Federal de Goiás - UFG como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em biomedicina.

Orientador: Rodrigo Saar Gomes.

Goiânia
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Oliveira, Geovanna Medeiros de
EFEITOS DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NAS INFECÇÕES POR
Leishmania amazonensis [manuscrito] / Geovanna Medeiros de
Oliveira. - 2024.
40 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Saar Gomes.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade
Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Biomedicina,
Goiânia, 2024.
Bibliografia.

1. *Leishmania amazonensis*. 2. Sinalização purinérgica. 3.
Adenosina. 4. Macrófago. 5. Resposta imune. I. Gomes, Rodrigo Saar ,
orient. II. Título.

CDU 612.017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos vinte nove dias do mês de novembro de dois mil e vinte e quatro iniciou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado “Efeitos da sinalização purinérgica nas infecções por *Leishmania amazonensis*” de autoria de Geovanna Medeiros de Oliveira, do curso de Biomedicina, do Instituto de Ciências Biológicas da UFG. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Dr. Rodrigo Saar Gomes - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/ UFG com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Me. Murilo Barros Silveira - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/ UFG e Dra. Ludmila de Matos Baltazar - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/ UFG . Após a apresentação, a banca examinadora realizou a arguição do(a) estudante. Posteriormente, de forma reservada, a Banca Examinadora atribuiu a nota final de 10,0 (dez), tendo sido o TCC considerado aprovado.

Proclamados os resultados, os trabalhos foram encerrados e, para constar, lavrou-se a presente ata que segue assinada pelos Membros da Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Saar Gomes, Professor do Magistério Superior**, em 29/11/2024, às 17:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ludmila De Matos Baltazar, Professora do Magistério Superior**, em 29/11/2024, às 17:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Murilo Barros Silveira, Técnico**, em 29/11/2024, às 17:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4998130** e o código CRC **A37C0507**.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho só foi possível graças ao apoio e incentivo de pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para minha trajetória acadêmica e pessoal. Agradeço especialmente ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Saar Gomes, que, com dedicação e sabedoria, me guiou desde a iniciação científica, compartilhando seu conhecimento e orientações essenciais para a conclusão deste estudo.

Meu reconhecimento também à Profa. Dra. Fátima Ribeiro Dias e a todos os colegas de laboratório, cuja colaboração foi fundamental ao longo do processo. Aos professores e colegas de curso, sou grata pelas experiências, conhecimentos e momentos únicos que compartilhamos. Cada um de vocês contribuiu para o meu crescimento, e levarei comigo o que aprendi ao longo desta jornada.

Aos meus amigos, pela amizade, incentivo e por acreditarem em mim, mesmo nos momentos mais desafiadores, agradeço profundamente por tornarem essa caminhada mais leve e repleta de lembranças inesquecíveis. À minha família, pelo amor incondicional, paciência e suporte constante, que sempre me impulsionaram a seguir meus sonhos. A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, deixo aqui minha sincera gratidão e meu muito obrigado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Leishmanioses	10
1.2. <i>Leishmania amazonensis</i>	13
1.3. Resposta imune a <i>L. amazonensis</i>	14
1.4. Sinalização purinérgica	18
1.5. Justificativa	21
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivos gerais	23
2.2. Objetivos específicos	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Aspectos éticos	24
3.2. Infecções in vitro	24
3.3. Expressão de genes	25
3.4. Avaliação da Resposta Imune	25
3.5. Análises Estatísticas	25
4. RESULTADOS	26
4.1. Infecção por <i>L. amazonensis</i> aumenta a expressão dos receptores de adenosina A2A e A2B	26
4.2. Tratamento com antagonista dos receptores A2A e A2B diminui infecção/parasitismo	27
4.3. Tratamento com antagonista dos receptores A2A e A2B aumenta a produção de ROS	28
4.4. Macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i> e tratados com antagonistas dos receptores A2A e A2B apresentam aumento na produção de citocinas inflamatórias	29
5. CONCLUSÃO	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

RESUMO

A *Leishmania* é o protozoário causador das leishmanioses, doenças tropicais ainda negligenciadas. O processo de infecção causa a liberação de ATP (adenosina trifosfato) no meio extracelular. O ATP sinaliza através de receptores purinérgicos do tipo P2, presentes em diferentes células, e essa sinalização resulta no aumento de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 e IL-12. A regulação da resposta inflamatória ocorre pela hidrólise do ATP em AMP (adenosina monofosfato), pela ação da enzima CD39 (nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1), que, por sua vez é convertida em adenosina pela ação da enzima CD73 (5'-ectonucleotidase). A adenosina exerce efeitos anti-inflamatórios ao ligar-se aos receptores da família P1, especialmente os receptores A2A e A2B. O presente trabalho avaliou o papel da sinalização purinérgica na resposta imune de macrófagos humanos infectados com *Leishmania amazonensis* (MOI 5:1) expressando a proteína fluorescente GFP. A infecção de macrófagos humanos, derivados de células THP-1, com *L. amazonensis* aumenta a expressão dos receptores A2A e A2B, avaliadas por PCR quantitativa em tempo real. O tratamento de macrófagos humanos com antagonistas seletivos do receptor A2A (ZM241385) e do receptor A2B (PSB-603) reduzem o parasitismo de macrófagos infectados com *L. amazonensis*, avaliadas por citometria de fluxo. Além disso, a inibição dos receptores de adenosina A2A e A2B aumenta a produção de intermediários reativos de oxigênio (ROS), moléculas altamente tóxicas para o parasito, avaliada pela sonda fluorescente CM-H2DCFDA, e aumenta a produção de TNF, IL-1 β e IL-6, citocinas inflamatórias que apresentam função no controle da infecção, avaliadas por CBA (Cytometric Bead Array), quando comparados aos macrófagos não-tratados, em células infectados com *L. amazonensis*. Esses dados sugerem que os receptores de adenosina A2A e de maneira mais expressiva o A2B, são essenciais para que a *L. amazonensis* evite uma resposta imune com perfil pró-inflamatória, inferindo uma facilidade de replicação durante o processo de infecção.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*; sinalização purinérgica; adenosina; macrófagos; resposta imune.

ABSTRACT

Leishmania is the protozoan that causes leishmaniasis, a tropical disease that is still neglected. The infection process causes the release of ATP (adenosine triphosphate) into the extracellular environment. ATP signals through P2-type purinergic receptors, present in different cells, and this signaling results in an increase in pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-1 and IL-12. The inflammatory response is regulated by the hydrolysis of ATP into AMP (adenosine monophosphate), by the action of the enzyme CD39 (nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1), which in turn is converted into adenosine by the action of the enzyme CD73 (5'-ectonucleotidase). Adenosine has anti-inflammatory effects by binding to P1 family receptors, especially A2A and A2B receptors. This study evaluated the role of purinergic signaling in the immune response of human macrophages infected with *Leishmania amazonensis* (MOI 5:1) expressing the fluorescent protein GFP. Infection of human macrophages, derived from THP-1 cells, with *L. amazonensis* increases the expression of A2A and A2B receptors, assessed by quantitative real-time PCR. Treatment of human macrophages with selective antagonists of the A2A receptor (ZM241385) and the A2B receptor (PSB-603) reduces the parasitism of macrophages infected with *L. amazonensis*, as assessed by flow cytometry. In addition, inhibition of the A2A and A2B adenosine receptors increases the production of reactive oxygen intermediates (ROS), highly toxic molecules for the parasite, as assessed by the CM-H2DCFDA fluorescent probe, and increases the production of TNF, IL-1 β and IL-6, inflammatory cytokines that play a role in controlling the infection, as assessed by CBA (Cytometric Bead Array), when compared to untreated macrophages, in cells infected with *L. amazonensis*. These data suggest that the A2A adenosine receptors, and more significantly the A2B receptors, are essential for *L. amazonensis* to avoid a pro-inflammatory immune response, inferring an ease of replication during the infection process.

Keywords: *Leishmania amazonensis*; purinergic signaling; adenosine; macrophages; immune response.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmanioses

As leishmanioses representam um conjunto de doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que afetam milhões de pessoas em diversas regiões do mundo, principalmente em áreas tropicais e subtropicais. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), dos 200 países e territórios que reportaram à OMS, 90 países e territórios são endêmicos para leishmaniose cutânea em 2023. Essas doenças apresentam uma ampla diversidade clínica, variando desde manifestações cutâneas localizadas até formas viscerais potencialmente fatais, dependendo da espécie de *Leishmania* e da resposta imune do hospedeiro (BOGDAN & ROLLINGHOFF, 1998).

A leishmaniose é transmitida pela picada de flebotomíneos infectados, popularmente conhecidos como "mosquitos-palha". As formas amastigotas de *Leishmania* se multiplicam e sofrem diferenciação em promastigotas flageladas dentro do intestino médio das fêmeas de flebotomíneos. Essas formas infecciosas do parasito deslocam-se pelo esôfago até a probóscida do inseto vetor, onde, junto a saliva, são transmitidas ao hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo (SÉGUIN; DESCOTEAUX, 2016). A saliva do flebotomíneo contém anticoagulante que ajuda na transmissão, evitando que o sangue coagule no local da picada do inseto. Os mamíferos são infectados quando o inseto vetor inocula as formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* no local da picada. Essas promastigotas são então fagocitadas por diferentes tipos de fagócitos recrutados no local, como neutrófilos, células dendríticas, monócitos e, principalmente, macrófagos. Dentro dos macrófagos, as promastigotas se diferenciam em amastigotas, que, após a lise das células hospedeiras, são liberadas no ambiente para infectar novas células. O ciclo se repete quando o flebotomíneo realiza um novo repasto sanguíneo, adquirindo as formas amastigotas liberadas ou células infectadas (MARZOCHI, 1992)(Figura 1).

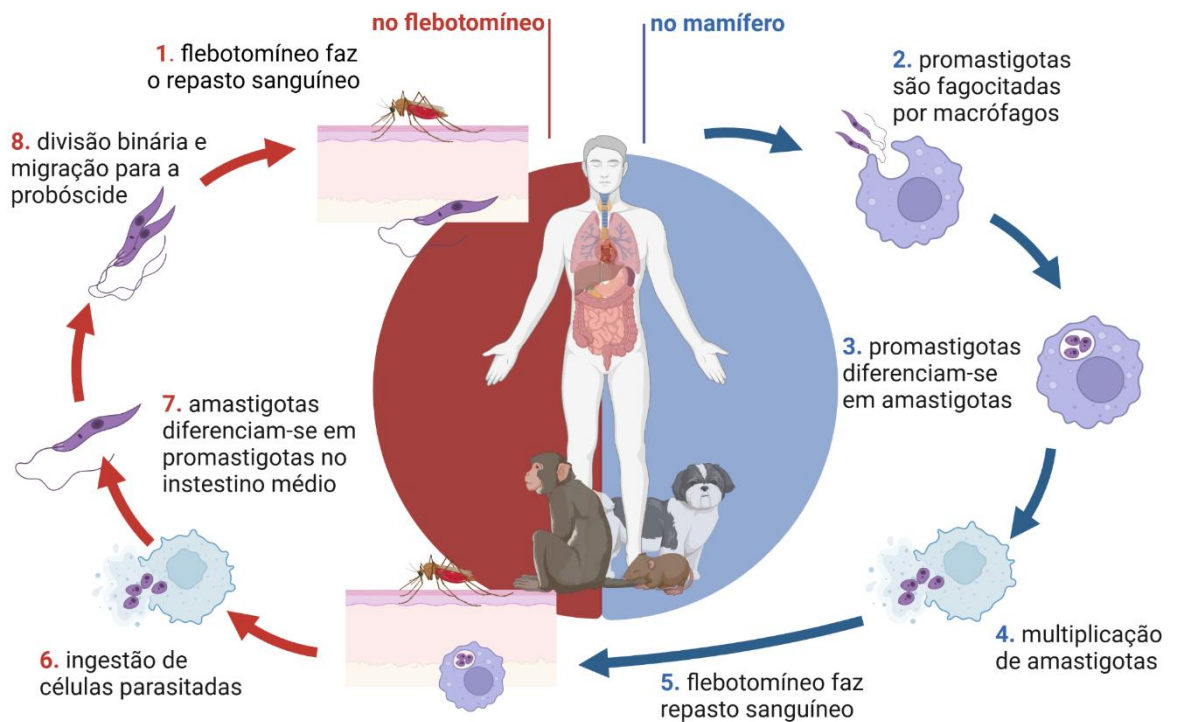


Figura 1. Ciclo de vida da *Leishmania* (mosquito flebotomíneo).

No homem, a leishmaniose se manifesta principalmente em três grandes formas clínicas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV) (WHO, 2024). A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é a forma mais grave da doença e é causada principalmente pelas espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* (anteriormente *Leishmania chagasi* na América Latina) (ALVAR et al., 2012). Essa forma da doença afeta órgãos internos, como o fígado, o baço e a medula óssea, levando à febre, anemia, perda de peso, hepatoesplenomegalia, principalmente devido ao aumento da carga parasitária nesses órgãos viscerais e, se não tratada, pode ser fatal. A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum da doença e é causada por várias espécies, incluindo *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*. A LC é caracterizada por lesão cutânea ulcerada, geralmente encontrada nos locais onde o flebotomíneo pica, que pode ser única ou múltipla. A leishmaniose mucocutânea (LMC), por sua vez, é mais destrutiva e envolve a destruição das mucosas nasais, orais e da faringe. Embora essa forma da doença tenha uma taxa de mortalidade baixa, pode causar

deformidades e cicatrizes permanentes. Essa forma é comumente causada por espécies do subgênero *Viannia*, como *Leishmania braziliensis*. Mais de 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru. (WHO, 2021). De acordo com dados da OMS referentes ao ano de 2023, foram registrados no Brasil 13.091 casos de leishmaniose cutânea e 1.461 casos de leishmaniose visceral. A distribuição geográfica das leishmanioses no Brasil está associada a fatores socioambientais, como desmatamento, urbanização desordenada e precariedade das condições de moradia, que favorecem a proliferação dos vetores e aumentam o contato entre humanos e reservatórios naturais (ORYAN; AKBARI, 2016).

Tradicionalmente, o diagnóstico laboratorial da leishmaniose baseia-se em métodos parasitológicos diretos e indiretos, como a visualização direta de amastigotas em esfregaços de tecidos ou aspirados das úlceras, e em métodos sorológicos, que detectam anticorpos específicos contra *Leishmania*. A intradermorreação de Montenegro (IDRM), um método indireto, fundamenta-se na resposta de hipersensibilidade celular retardada, podendo ser negativa nas primeiras quatro a seis semanas após o surgimento da lesão cutânea (NEVES et al., 2011). No entanto, esses métodos possuem limitações, como a baixa sensibilidade em algumas formas clínicas e a dificuldade de obtenção de amostras em certos estágios da doença. Nos últimos anos, técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e testes sorológicos têm ganhado destaque como ferramentas diagnósticas devido à sua alta sensibilidade e especificidade (NEVES et al., 2011). A oligocromatografia-PCR (OC-PCR) e a amplificação baseada em sequência de ácido nucleico (NASBA) são métodos inovadores que oferecem maior sensibilidade e rapidez em comparação ao PCR tradicional. No entanto, ambos apresentam limitação quanto a diferenciarem as espécies de *Leishmania* (AKHOUNDI et al, 2017).

A droga de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose tegumentar é o antimoniato de N-metilglucamina. Como droga de segunda escolha é utilizado o isotionato de pentamidina e a anfotericina B (GONTIJO; CARVALHO, 2003). O controle das leishmanioses enfrenta diversos desafios, incluindo a diversidade de espécies de *Leishmania*, a complexidade do ciclo biológico do parasito e a resistência de alguns vetores aos inseticidas. Além disso, o tratamento das leishmanioses com antimoniais pentavalentes ou anfotericina B é limitado e envolve medicamentos com

efeitos adversos severos, como toxicidade cardíaca, hepática e renal, além de serem administrados por via intravenosa, o que prejudica a adesão ao tratamento (PASSAES et al, 2023; ORYAN; AKBARI, 2016). Diante disso, é essencial o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e controle, assim como terapias mais eficazes e acessíveis para as populações afetadas.

1.2. *Leishmania amazonensis*

Leishmania (L.) amazonensis é o agente causador de 3 formas diferentes de leishmaniose cutânea encontrada no Brasil, sendo elas: a Leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e a leishmaniose cutânea disseminada borderline (BDCL) (SILVEIRA et al., 2004). Lesões em pacientes com LCL causadas por *L. amazonensis* apresentam grande infiltração na borda da lesão, e juntamente com sua histopatologia, dão uma pista sobre o agente causador. Nessas lesões, há um infiltrado denso de macrófagos vacuolados na derme, que são cheios de amastigotas e dão ao infiltrado a aparência de um granuloma macrofágico. A infecção por *L. amazonensis* gera aumento da expressão de mRNA de IL-4 em lesões. (MORAES & SILVEIRA, 1994; SILVEIRA et al., 2004).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é uma manifestação rara de leishmaniose cutânea sendo caracterizada pela ausência de resposta celular específica (anergia) para antígenos de *Leishmania*. A anergia celular está associada à acentuada proliferação dos parasitos e à disseminação da infecção. A *L. (L.) amazonensis* é considerada a única espécie causadora de LCD no Brasil (BRASIL, 2017). A lesão exibe uma infiltração maciça de macrófagos repletos de amastigotas, resultante da ausência de linfócitos e plasmócitos na área afetada. Esse padrão de infiltração confere à lesão a aparência de um granuloma macrofágico. No entanto, apesar da alta concentração de macrófagos, a resposta imune é ineficaz devido à falta de células T e de citocinas essenciais para o combate à infecção (MORAES, P. & SILVEIRA, F.T., 1994; SILVEIRA et al., 2004). A LCD é clinicamente caracterizada por uma infiltração difusa da pele, na qual aparecem muitos nódulos, pápulas, tubérculos e placas infiltradas que raramente se tornam ulceradas (SILVEIRA et al., 2004). Essa condição é particularmente preocupante, pois a *L. amazonensis* está associada a uma resposta imune alterada no hospedeiro, com produção desregulada de citocinas inflamatórias

e supressoras, o que dificulta o controle da infecção e contribui para a cronicidade da doença (PEREIRA & ALVES, 2008; JI et al., 2003). A LCD apresenta uma resposta imune CD4+ Th2 predominante, com expressão mais fraca de mRNA para IFN- γ e expressão mais forte de mRNA para IL-4 (SILVEIRA et al., 2004; RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998).

Nos casos de BDCL causados por *L. amazonensis*, as lesões apresentam-se de maneira mais tardia, após 6 meses, em comparação com a *L. braziliensis* que apresenta lesões após 2 ou 3 meses, além do menor número de lesões metastáticas (SILVEIRA et al., 2004). Na derme destes casos é possível encontrar grandes coleções de macrófagos vacuolados e fortemente parasitados, rodeados por grupos de linfócitos e plasmócitos.

Essa espécie possui um ciclo zoonótico mantido em reservatórios silvestres, roedores do gênero *Proechymis* e o *Oryzomys*, o que facilita sua disseminação em áreas florestais e periurbanas, especialmente em regiões impactadas pelo desmatamento e outras alterações ambientais. Além disso, a *L. amazonensis* tem se expandido para outras regiões do, como o Nordeste e o Centro-Oeste, pois seu principal vetor, *Lu. flaviscutellata*, apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrado em diferentes habitats, contribuindo para o aumento da incidência de leishmaniose cutânea no país (BRASIL, 2017).

1.3. Resposta imune à *L. amazonensis*

A resposta imunológica do hospedeiro desempenha um papel crucial na determinação da gravidade da infecção e na capacidade do organismo de controlar a progressão da doença. A interação entre o sistema imunológico e o parasito *Leishmania* envolve mecanismos complexos, que podem resultar tanto na eliminação do parasito quanto na sua persistência crônica no hospedeiro, diferenciando as formas clínicas apresentadas pela doença. Esta resposta inflamatória dependerá não apenas do histórico genético do hospedeiro, do estado nutricional e da imunocompetência, mas também em grande parte da espécie de parasito que inicia a infecção, do vetor e de fatores ambientais e sociais (COSTA-DA-SILVA, et al 2022). A eficácia da resposta

imune inata, mediada por células fagocíticas, como macrófagos e neutrófilos, é determinante no controle inicial da infecção.

Quando as formas promastigotas da *Leishmania* são introduzidas na pele, pela picada do inseto vetor, elas se deparam com algumas células, como macrófagos residentes, células de Langerhans e mastócitos, que compõem o sistema imune da pele. Através de alterações de membrana, os parasitos conseguem resistir ao sistema complemento e infectar os macrófagos com sucesso. Essas modificações podem envolver mudanças na estrutura dos lipofosfoglicanos (LPG), regulação positiva da expressão de gp63 e mudanças no conteúdo enzimático, dependendo da espécie de *leishmania* analisada (ALEXANDER et al., 1999). As moléculas de LPG ajudam a sobrevivência dos parasitos a resposta imune do hospedeiro de inúmeras formas, dificultando a ligação do complexo MAC do sistema complemento ao parasito, através do alongamento na estrutura do LPG (CASTELLANO, 2005). Além disso, inibem a fusão do fagossomo-endossomo (DESJARDINS E DESCOTEAUX, 1997) e a atividade da proteína quinase C (PKC) (GIORGIONE et al., 1996) e suprimem a expressão de NOS2 de macrófagos e a produção de NO (PROUDFOOT et al., 1996).

A metaloproteinase 63 (GP63) é uma molécula expressa na superfície do parasito, em abundância nas formas promastigotas metacíclicas (YAO et al, 2005). A GP63 cliva o C3b em C3bi, o que ajuda o parasito a evitar a lise mediada pelo sistema complemento (OLIVIER et al, 2012). Além disso, as moléculas C3b e C3bi se ligam aos receptores do sistema complemento CR1 e CR3, respectivamente, facilitando a adesão e fagocitose dos promastigotas de *Leishmania* (KANE & MOSSER, 2000). Supressão da explosão oxidativa, proteção da citólise e degradação lisossomal também foram associados às atividades da GP63 (ALEXANDER et al, 1999). Além disso, a lipofosfoglicana (LPG) e a metaloprotease gp63 protegem os promastigotas das enzimas hidrolíticas presentes no intestino do flebotômíneo. A LPG também desempenha um papel crucial na adesão dos promastigotas ao epitélio intestinal do inseto, facilitando sua sobrevivência e desenvolvimento (ALEXANDER et al., 1999).

Os parasitos promastigotas fagocitados pelos macrófagos ficam dentro de um vacúolo parasitóforo, o fagolisossoma, formado pela fusão do fagossomo contendo o parasito com os lisossomos contendo enzimas líticas. Esses fagócitos reconhecem o parasito através de receptores do tipo Toll (TLRs) e a interação do LPS com o TLR2

induz a ativação dos macrófagos, que resulta na produção de NO (óxido nítrico), ROS (intermediários reativos de oxigênio), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-12 (IL-12), essenciais para a ativação de uma resposta imune efetora (GUPTA et al, 2014). É bem estabelecido que a produção de ROS e NO são mais efetivas contra *Leishmania* (LIEW et al, 1990; BOGDAN, 2001; GREEN et al, 1991). A entrada via receptores do tipo CR3 é vantajosa ao parasito, pois permite a infecção silenciosa dos macrófagos sem indução de estresse oxidativo e redução da produção de IL-12, devido a um aumento da fosforilação de Erk 1/2 (MARTH & KELSALL, 1997; SUTTERWALA et al., 1998) (COSTA-DA-SILVA et al, 2022). Além da capacidade de facilitar a infecção das células hospedeiras, os parasitos do gênero *Leishmania* possuem diversos mecanismos para modificar a resposta imune, proporcionando sua sobrevivência e manutenção da infecção (OLIVIER & GREGORY, 2005).

Um dos principais mecanismos de evasão imunológica é a inibição da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de óxido nítrico (NO), substâncias microbicidas cruciais para a eliminação intracelular de patógenos (BOUSSOULAS et al., 2019). O óxido nítrico (NO), que desempenha um papel crucial na resposta imune contra patógenos, é gerado pela enzima óxido nítrico sintase II (NOS II), também chamada de NOS induzível ou iNOS. A síntese de NO pela iNOS é estimulada por diversas citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF- α e IL-1. Por outro lado, essa produção pode ser suprimida por citocinas com ação anti-inflamatória, como TGF- β , IL-3, IL-4 e IL-10 (JORENS et al, 1995). Além disso, o parasito modula a produção de citocinas, favorecendo um ambiente anti-inflamatório por meio da indução de produção de interleucina-10 (IL-10) e do fator de crescimento transformador beta (TGF- β) por macrófagos infectados, que inibem a ativação efetiva dos macrófagos e a resposta imune adaptativa e está intimamente relacionado a um retardo na expressão de iNOS (BOGDAN & ROLLINGHOFF, 1998; STENGER et al., 1994; SUTTERWALA et al., 1998; CUNNINGHAM, 2002; COSTA et al., 2020). Um dos mecanismos da *L. amazonensis* de evadir o sistema imune é através da sua capacidade de inibir a produção de NO pelos macrófagos, o que favorece a sobrevivência do parasito no interior da célula (BALESTIERI et al., 2002; ALMEIDA et al., 2012; CALEGARI-SILVA et al., 2009). Essa inibição parece estar associada a uma redução na atividade da iNOS e a uma expressão deficiente dessa enzima, de forma dependente de NF κ B, em macrófagos infectados (CALEGARI-SILVA et al., 2009).

A resposta adaptativa, mediada principalmente pelas células T CD4+, desempenha um papel fundamental na defesa contra a infecção por *Leishmania*. É amplamente reconhecido que o controle eficaz da infecção depende de uma resposta imune celular predominantemente do tipo 1, caracterizada pela ativação de linfócitos CD4+ e CD8+ e pela liberação de citocinas como IL-12, IFN- γ , TNF- α , linfotóxina, além de quimiocinas derivadas de macrófagos (COÊLHO et al, 2010; SOONG L., 2012). Pesquisas indicam que uma resposta Th1 robusta, marcada pela produção de interferon-gama (IFN- γ), desempenha um papel crucial no controle da infecção, estimulando a ativação dos macrófagos e a subsequente produção de óxido nítrico (NO) (SILVA & ALMEIDA, 2017; CECÍLIO et al, 2014). Por outro lado, a predominância de uma resposta Th2, associada à produção de interleucinas como IL-4, IL-5, IL-13, IL-10 e TGF- β favorece a progressão da doença, uma vez que essas citocinas inibem a ativação dos macrófagos e promovem um ambiente permissivo à replicação do parasito (SMITH et al., 2018; CECILIO et al, 2014)(Figura 2). A variabilidade clínica das leishmanioses reflete, em parte, as diferentes respostas imunes geradas pelo hospedeiro, e, de maneira geral, citocinas do tipo Th2 aumentadas, que restringem a resposta do tipo Th1, levam a um ambiente imunológico permissivo à replicação do parasito (GABRIEL et al,2019). As infecções por *L. amazonensis* ocasionam um aumento de células Treg CD4+CD25+CD86+, juntamente com uma expressão aumentada de FoxP3, TGF- β e IL-10R (JI et al., 2005). A *Leishmania amazonensis* também escapa da resposta imune ao inibir a produção precoce de citocinas e quimiocinas inflamatórias, além de impedir o desenvolvimento de células Th1 específicas de antígeno na presença de baixos níveis de citocinas Th2 (JI et al., 2003).

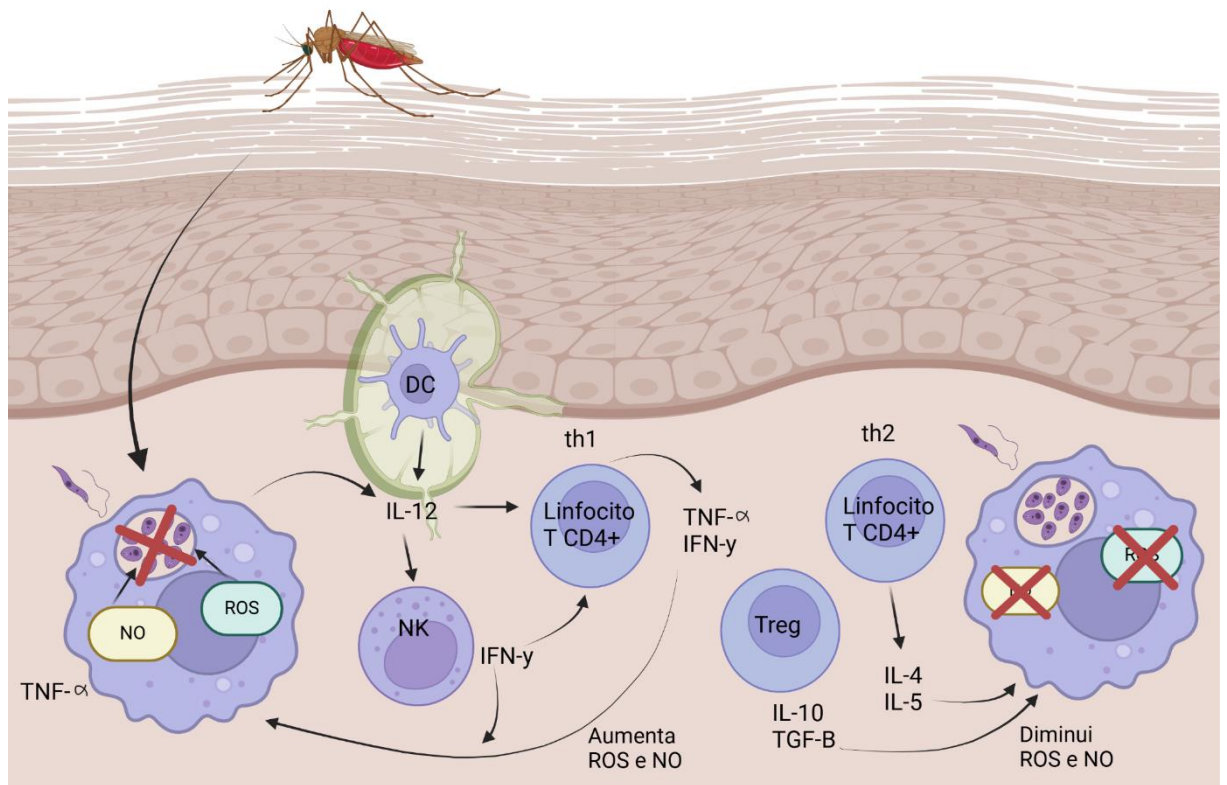


Figura 2. Resposta imune à infecção por *L. amazonensis*.

Portanto, a compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos na infecção por *Leishmania* é crucial para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e vacinais. Estratégias que favoreçam a indução de uma resposta Th1 protetora, a modulação de citocinas imunossupressoras como IL-10 e TGF- β e citocinas inflamatórias como IL-1 β , TNF, IL-6 e IL-12 são essenciais para o controle eficaz da doença.

1.4. Sinalização Purinérgica

A sinalização purinérgica tem emergido como um importante mecanismo regulador das respostas imunológicas, desempenhando um papel crucial tanto na homeostase do sistema imune quanto na modulação de respostas inflamatórias. A sinalização mediada por nucleotídeos extracelulares, como ATP e adenosina, ocorre por meio de receptores purinérgicos expressos em diversos tipos celulares, incluindo macrófagos, células dendríticas e linfócitos, e está intimamente associada à regulação da inflamação e imunidade durante infecções, autoimunidade e câncer

(BURNSTOCK, 2016)(Figura 3). Durante certas condições, como processos infecciosos e inflamatórios, hipóxia e isquemia, ocorre uma liberação significativa de ATP (adenosina trifosfato) para o meio extracelular. O ATP pode ser liberado por vários mecanismos, incluindo a lise celular, a exocitose de vesículas ricas em ATP, a abertura de canais permeáveis a nucleotídeos, a liberação de vesículas transportadoras que entregam proteínas para a membrana celular, além de vias lisossomais e de hemicanais formados por panexinas e conexinas. (FREDHOLM et al., 2011; BURNSTOCK & BOEYNAEMS, 2014).

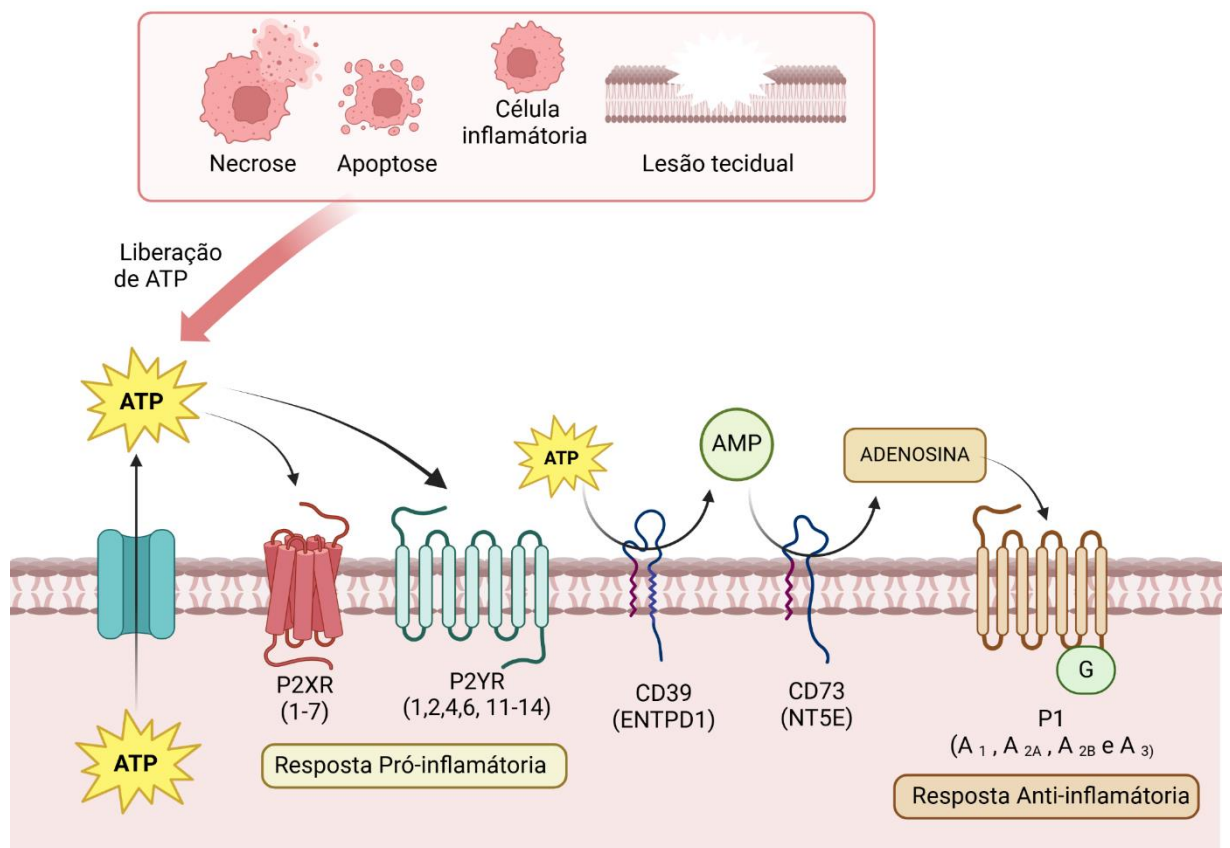


Figura 3. Sinalização purinérgica.

Os receptores purinérgicos são classificados em dois grandes grupos: receptores P1 acoplados à proteína G (metabotrópicos), ativados pela adenosina, e receptores P2, que respondem a nucleotídeos como ATP e ADP (BURNSTOCK & KENNEDY, 2011). Dentro dessa classificação, os receptores P1 incluem quatro subtipos (A₁, A_{2A}, A_{2B}, e A₃), enquanto os receptores P2 são divididos em dois grupos principais: os P2X, que são canais iônicos, e os P2Y, que são acoplados à proteína G (RALEVI & BURNSTOCK, 1998; BURNSTOCK, 2004). A ativação desses receptores gera respostas distintas que podem ser tanto pró-inflamatórias quanto anti-

inflamatórias, dependendo do contexto e do receptor envolvido. Quando o ATP é liberado para o meio extracelular as ectoenzimas CD39 (nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1) e CD73 (5'-ectonucleotidase), enzimas expressas em diferentes tipos celulares, incluindo análogos em parasitos protozoários, atuam na hidrólise de ATP/ADP em AMP e de AMP em adenosina, respectivamente. Dessa forma, a atividade enzimática de CD39 e CD73 regulam a duração, intensidade e natureza dos sinais purinérgicos, controlando a resposta inflamatória. A transformação de ATP/ADP e AMP para adenosina, acarreta uma mudança na atividade das células imunes pró-inflamatórias conduzidas por ATP para um estado anti-inflamatório mediado por adenosina. A expressão e atividade de CD39 e CD73 sofrem mudanças dinâmicas de acordo com o contexto fisiopatológico no qual estão inseridos (ANTONIOLI et al., 2013). Em infecções por *L. amazonensis*, a atividade da E-NTPDase é regulada diferencialmente ao longo do ciclo de vida do parasito, estando significativamente aumentada em amastigotas e promastigotas metacíclicos, ambas formas infectantes em hospedeiros mamíferos (PAES-VIEIRA et al, 2021).

O ATP extracelular sinaliza através de receptores purinérgicos do tipo P2. As subfamílias P2YR e P2XR consistem em oito (P2Y1, 2, 4, 6, 11–14) e sete (P2X1–7) membros, respectivamente (DI VIRGILIO et al., 2017). O receptor P2X7, por exemplo, é amplamente conhecido por promover a produção de citocinas inflamatórias, como IL-1 β e IL-18, através da ativação da via do inflamassoma NLRP3 (DI VIRGILIO et al., 2017). De maneira geral a ligação do ATP aos receptores do tipo P2 gera um aumento na produção de diversas citocinas inflamatórias, como IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-12 (LA SALA et al, 2003; LANGSTON et al, 2003). A ativação dos receptores da subfamília P2X está relacionada a processos como percepção sensorial, agregação de plaquetas, morte celular, além da ativação de IL-1 β e TNF- α (NORTH, 2002; FERRARI et al., 2006). Em contrapartida, a interação com receptores P2Y está associada à proliferação celular, apoptose, processos inflamatórios, maturação de células dendríticas e, dependendo do subtipo, ao aumento da produção de IL-13 (ABBRACCHIO et al., 1998; SCHNURR et al., 2000).

A adenosina, através da ativação de receptores P1, desempenha um papel central na resolução de respostas inflamatórias. Os subtipos dos receptores de adenosina são distribuídos de maneira diferente por cada célula-alvo. Por exemplo, ADORA2B é altamente expresso em células endoteliais vasculares, enquanto

ADORA2A é altamente expresso em células imunes, como neutrófilos e linfócitos (ELTZSCHIG et al, 2012). A ligação de adenosina aos receptores A2A e A2B limita a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF- α e IL-12 e induz aumento na produção de IL-10 pelas células, promovendo uma resposta imune mais regulada e prevenindo danos teciduais (HASKÓ et al., 2008). Os receptores A2 são capazes de estimular a adenilato ciclase, levando ao acúmulo de AMPc, o que prejudica a expressão de CD40, a geração de mediadores inflamatórios, a produção de IL-12 e a atividade microbicida (FIGUEIREDO et al, 2017). A infecção por *L. amazonensis*, dependente da ligação do receptor A2B, prejudica a ativação de células dendríticas (DC), ao diminuir a expressão de MHC classe II, CD86 e CD40 (FIGUEIREDO et al, 2012). Além disso, a sinalização via A2A tem sido associada à indução de células T reguladoras (Tregs), que são essenciais para o controle da inflamação crônica e a manutenção da tolerância imunológica (SITKOVSKY, 2020). Durante o término da sinalização, a adenosina é metabolizada em inosina através da adenosina desaminase (ADA) ou em AMP através da adenosina quinase (ELTZSCHIG et al, 2012).

1.5. Justificativa

A leishmaniose é endêmica em 99 países, com uma média de 52.645 casos por ano e mais de 12 milhões de pessoas infectadas, estando na lista das 10 principais doenças tropicais negligenciadas, segundo a OMS. A doença afeta predominantemente populações de países em desenvolvimento, situados em regiões tropicais e subtropicais, onde o investimento em saúde e pesquisa científica para desenvolvimento de novos medicamentos e vacinas é reduzido. As ferramentas de controle e prevenção ainda são limitadas, pois carecem de mais pesquisas e do entendimento mais profundo dos mecanismos de evasão da resposta imune pela *Leishmania*, se tornando, dentro desse contexto, fundamental para um efetivo combate à essa doença negligenciada. Essa situação é agravada pela escassez de medicamentos eficazes e pela elevada toxicidade das terapias disponíveis, que frequentemente causam efeitos adversos severos e limitam a adesão ao tratamento.

Na imunopatologia de diversas doenças infecciosas, como a leishmaniose, a sinalização purinérgica desempenha um papel dual, regulando tanto a ativação imune necessária para o controle do patógeno quanto a modulação da inflamação excessiva,

que pode levar a danos teciduais. Assim, compreender a dinâmica da sinalização purinérgica na resposta imune pode oferecer novas oportunidades terapêuticas. A manipulação de receptores purinérgicos, seja para aumentar a atividade imunossupressora em doenças autoimunes ou para modular a inflamação em infecções crônicas, como a leishmaniose, representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. O avanço no entendimento dessa via de sinalização oferece insights valiosos para o controle da resposta inflamatória e da imunidade, sendo essencial para o tratamento de diversas patologias inflamatórias e infecciosas, incluindo as leishmanioses.

Entretanto, os mecanismos envolvidos ainda carecem de investigações aprofundadas. O presente estudo busca entender como a expressão dos receptores de adenosina, A2A e A2B, participam da infecção por *L. amazonensis* em macrófagos humanos, principal célula hospedeira desse parasito. O nosso interesse específico por essa espécie se baseia, primeiramente, no aumento da expressão de outros receptores purinérgicos durante a infecção por *L. amazonensis* encontrados na literatura, e, ainda, pelo amplo conhecimento da capacidade desse parasito de promover uma resposta imune alterada, com desregulação na produção de citocinas e baixa resposta pró-inflamatória. Espera-se que os conhecimentos obtidos sobre a função da sinalização purinérgica no processo de infecção por *L. amazonensis*, com base nos resultados obtidos, não apenas contribuam para esclarecer os mecanismos de infecção dessa espécie, mas também possibilitem o desenvolvimento de novas abordagens para tratamento e prevenção.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o papel da sinalização purinérgica nas infecções por *Leishmania amazonensis*.

2.2. Objetivo específicos

- Avaliar a expressão dos receptores adenosina A2A e A2B, em macrófagos humanos infectados com *Leishmania amazonensis* e controles saudáveis;
- Investigar os efeitos da inibição dos receptores de adenosina, A2A e A2B, na carga parasitária de macrófagos humanos infectados com *L. amazonensis*;
- Avaliar os efeitos da inibição dos receptores de adenosina, A2A e A2B, na resposta imune de macrófagos humanos infectados com *L. amazonensis*;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

Esse estudo dispensa aprovação de comitê de ética de pesquisa por ser realizado com macrófagos humanos de linhagem celular imortalizada (THP-1).

3.2. Infecções *in vitro*

Promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* expressando a proteína verde fluorescente (GFP) foram cultivadas em meio Grace (Sigma-Aldrich), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB; Gibco), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, todos da marca Sigma-Aldrich, a 26°C. Os parasitos foram mantidos em placas de 24 poços por até seis passagens e utilizados em experimentos durante a fase estacionária do crescimento (6º dia de cultivo). A proteína verde fluorescente (GFP) foi utilizada como um marcador de viabilidade celular do macrófago e sobrevivência do parasito, uma vez que a fluorescência não é emitida na ausência de infecção e cessa quando os parasitos morrem.

Células da linhagem monocítica humana THP-1 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) com 50 µg/mL de gentamicina, 2 mM de L-glutamina e 10% de SFB inativado. Essas células foram diferenciadas em macrófagos com 100 ng/mL de PMA (Forbol 12-miristato 13-acetato; Sigma-Aldrich) por 24h, a 37 °C/5% CO₂, sendo posteriormente lavadas e incubadas com meio RPMI suplementado por 24 horas adicionais (dos Santos et al., 2017). Os macrófagos diferenciados de células THP-1 foram tratados ou não com 10 µM de antagonistas seletivos dos receptores de adenosina A2A (ZM241385; Sigma-Aldrich) ou A2B (PSB-603; Sigma-Aldrich). Após 1 hora de tratamento, as células foram infectadas com promastigotas de *L. amazonensis*-GFP (MOI 5:1) por 24 horas, a 36 °C e 5% de CO₂. As taxas de infecção foram analisadas por citometria de fluxo, avaliando a porcentagem de macrófagos infectados (GFP+) e a média de intensidade de fluorescência do GFP (MFI). Para análise da expressão dos receptores A2A e A2B, o RNA total foi isolado por coluna de sílica (Total RNA Purification Kit; Cellco Biotecnologia), conforme protocolo do fabricante, e convertido em cDNA com iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad), analisadas por PCR quantitativa em tempo real.

3.4. Expressão de genes

Foi avaliada a expressão de mRNA para os receptores de adenosina A2A e A2B por PCR quantitativa em tempo real, conforme previamente estabelecido (Galdino et al., 2014), usando os pares de primers ACCGCTACATTGCCATCCGCAT e TCCTTTGGCTGACCGCAGTTGT, para ADORA2A; e GGGCTTCTGCACTGACTTCT e CCGTGACCAAACCTTTTATACCTG, para ADORA2B.

3.5. Avaliação da Resposta Imune

A produção de citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF e IL-6 foram avaliadas por CBA (Cytometric Bead Array), com kits comerciais, nos sobrenadantes das culturas de células THP-1 diferenciadas em macrófagos tratadas com antagonistas seletivos dos receptores de adenosina A2A(ZM241385; Sigma-Aldrich) ou A2B(PSB-603; Sigma-Aldrich) e infectadas por *L. amazonensis*. A produção de ROS foi avaliada utilizando a sonda fluorescente CM-H2DCFDA, que emite fluorescência ao ser clivada por espécies reativas de oxigênio, sendo então analisada por citometria de fluxo.

3.6. Análises Estatísticas

Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão (SD). Os testes t de Student, One-way ou Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, foram utilizados para as análises estatísticas. A significância foi estabelecida em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Infecção por *L. amazonensis* aumenta a expressão dos receptores de adenosina A2A e A2B

Os receptores do tipo A2 são responsáveis pela resposta anti-inflamatória da adenosina e esses efeitos se devem pelo aumento de AMPc intracelular, inibição de citocinas pró-inflamatórias e alteração do equilíbrio Th1/Th2 induzindo uma resposta do tipo Th2 (ABBRACCHIO & CERUTI, 2007). Já foi anteriormente descrito na literatura que a ativação do receptor A2B pode ser usada por *L. amazonensis* para inibir a função de DC e evitar a resposta imune (FIGUEIREDO et al, 2012). Além disso, a infecção por *L. amazonensis* regula positivamente a expressão de CD73, o que está associado à inibição da resposta imunológica devido à maior produção de adenosina (BAJRACHARY et al., 2022). A expressão dos receptores P2Y2 e P2Y4 também é regulada positivamente durante infecção por *L. amazonensis* (MARQUES-DA-SILVA et al., 2011), sugerindo, junto com outros estudos, um papel significativo do parasito na regulação de diversos receptores envolvidos na sinalização purinérgica. No entanto, por mais que a indução da expressão gênica dos receptores de adenosina A2A e A2B já tenha sido descrito em infecções por *L. donovani*, a participação da *L. amazonensis* na regulação dos receptores nunca havia sido avaliada em macrófagos humanos (BASU et al., 2020).

Assim, decidimos avaliar se a infecção por *L. amazonensis* afetaria a expressão dos receptores de adenosina A2A e A2B, em comparação com um grupo controle não infectado. Para isso, foi realizada a síntese de cDNA a partir do RNA total isolado do sobrenadante de células THP-1 infectadas, ou não, com *L. amazonensis*, possibilitando a análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real. Como mostrado na Figura 1, a infecção de macrófagos com *L. amazonensis* aumenta a expressão dos receptores de adenosina A2A (Fig. 4A) e A2B (Fig. 4B), quando comparados aos macrófagos não infectados. Dado o conhecimento sobre os efeitos anti-inflamatórios da adenosina através da ligação aos seus receptores, principalmente o A2A e o A2B, a modulação da expressão de seus receptores pela *L. amazonensis* parece indicar um meio de regulação do sistema imune vantajoso para a sobrevivência e replicação do parasito.

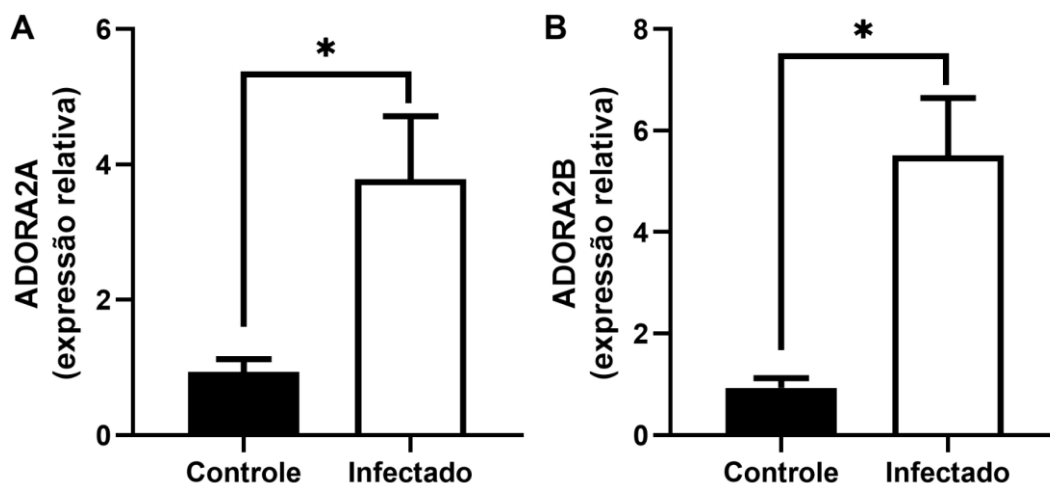


Figura 4. Expressão dos receptores A2A e A2B em macrófagos THP-1 infectados com *L. amazonensis*. Células THP-1 diferenciadas em macrófagos foram infectadas com *L. amazonensis* por 24 horas e PCR quantitativo em tempo real foi usado para verificar a expressão do receptor de adenosina ADORA2A (A2A) (A) e a expressão do receptor de adenosina ADORA2B (A2B) (B). Barras representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$, comparado ao controle.

4.2. Tratamento com antagonista dos receptores A2A e A2B diminui infecção

Um trabalho anterior demonstrou que o bloqueio do receptor A2B com antagonista seletivo reduziu a sobrevivência do parasito no interior das células murinas estimuladas com IFN- γ e LPS (GOMES, 2015). Para confirmar se os receptores de adenosina apresentam, durante infecção por *L. amazonensis*, função na regulação da resposta imune e consequente sobrevivência do parasito, foram utilizadas formas promastigotas de *L. amazonensis-GFP* para infectar células THP-1 diferenciadas em macrófagos que foram pré-incubadas com antagonistas seletivos dos receptores de adenosina A2A (ZM242385) ou A2B (PSB-603). O bloqueio dos receptores A2A e A2B reduziu a porcentagem de células infectadas (GFP+; Figura 5A) e a intensidade média de fluorescência das células (MFI; Figura 5B), de maneira mais acentuada quando A2BR foi inibido, quando comparado às células sem o tratamento. Esses dados indicam que os receptores de adenosina desempenham um papel importante na sobrevivência do parasito em macrófagos humanos, já que a inibição desses receptores promove a eliminação, ainda que parcial, de *L. amazonensis*.

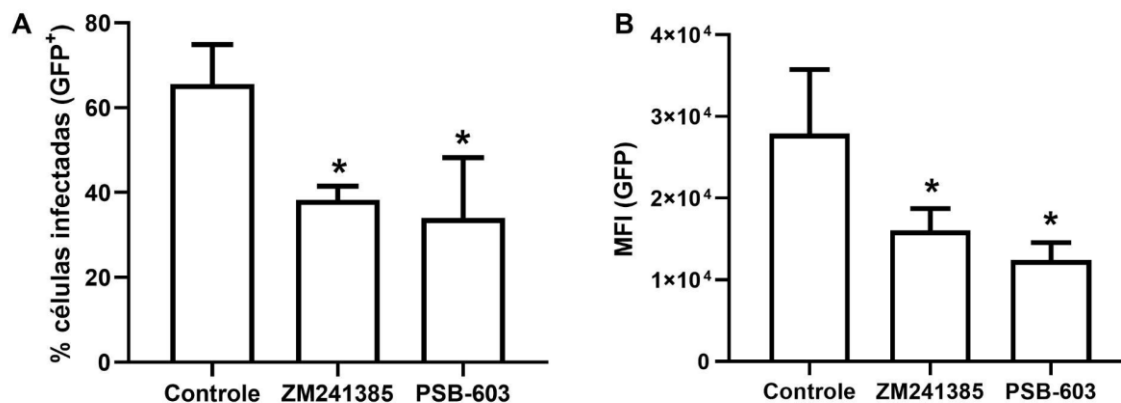


Figura 5. Papel dos receptores de adenosina na infecção de macrófagos humanos por *L. amazonensis*. Células THP-1 diferenciadas em macrófagos foram tratadas com 10 μ M de antagonistas seletivos de A2A (ZM241385) e A2B (PSB-603) e, após 1 hora do tratamento, as células foram infectadas com promastigotas de *L. amazonensis*-GFP (MOI 5:1). As taxas de infecção foram avaliadas por citometria de fluxo. (A) Porcentagem de macrófagos infectados (GFP+). (B) Média de intensidade de fluorescência do GFP (MFI). Barras representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$, comparado ao controle.

4.3. Tratamento com antagonista dos receptores A2A e A2B aumenta a produção de ROS em infecção por *L. amazonensis*

É bem documentado que a produção de ROS gerada pela ativação do macrófago é muito efetiva para a eliminação de *Leishmania spp.*, por ser altamente tóxico para o parasito (LIEW et al, 1990; MURRAY, 1982). Conforme demonstrado em um estudo anterior, células infectadas com *L. amazonensis* liberam quantidades menores de ROS, o que poderia explicar a dificuldade de eliminação do parasito (Almeida et al., 2012). Além disso, o ROS tem um papel fundamental na regulação da resposta inflamatória, mediando a apoptose adequada de neutrófilos em resposta a infecções (Carneiro et al., 2018). Para compreender os efeitos da inibição dos receptores de adenosina no controle da infecção por moléculas tóxicas, foi realizada a dosagem de ROS.

A produção de ROS foi avaliada por citometria de fluxo, com a leitura da fluorescência gerada pela clivagem da sonda fluorescente CM-H2DCFDA em resposta à presença de ROS, após infecção com *L. amazonensis* e tratamento com

antagonista seletivo A2A (ZM242385) ou A2B (PSB-603). O aumento na produção de ROS gerado pelo tratamento com PSB-603 (Figura 6) correlaciona-se com os resultados apresentados anteriormente. O bloqueio do receptor A2B, com PSB-603, promove um ambiente mais pró-inflamatório, aumentando a produção de ROS pelos macrófagos e resultando em uma redução na taxa de parasitismo, observada anteriormente. Nenhuma alteração significativa foi observada em células tratadas com o antagonista do A2A.

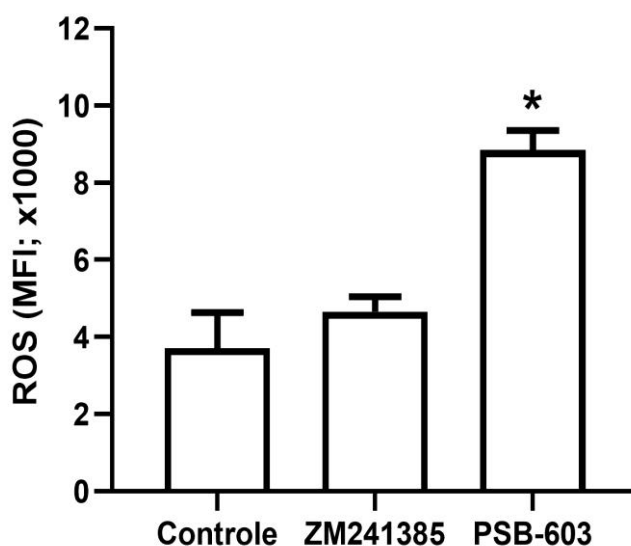


Figura 6. Produção de ROS em macrófagos THP-1 infectados com *L. amazonensis*. Células THP-1 diferenciadas em macrófagos foram tratadas com antagonistas seletivos de A2A (ZM241385) e A2B (PSB-603) e infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* por 24h. 10mM da sonda fluorescente CM-H2DCFDA, foi adicionada às células, 30 minutos antes da infecção por *L. amazonensis*, e a produção de ROS foi quantificada por citometria de fluxo. Barras representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$, comparado ao controle.

4.4. Macrófagos infectados por *L. amazonensis* e tratados com antagonistas dos receptores A2A e A2B apresentam aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias

Os macrófagos infectados com *L. amazonensis* produzem menos TNF, mesmo na presença de IFN- γ (GOMES et al., 2002). Além disso, a infecção com *L. amazonensis* já demonstrou diminuir e retardar a produção de citocinas inflamatórias, como IL-12, IFN- γ , IL-1 α e IL-1 β , nos tecidos dos pés e nos linfonodos de drenagem,

em comparação com os níveis observados em controles infectados com *L. major* (JONES et al., 2000). Para confirmar o papel dos receptores de adenosina na regulação de citocinas na resposta imune à *L. amazonensis*, a expressão de citocinas foi avaliada por meio do kit CBA com análise subsequente por citometria de fluxo. Observou-se que o antagonismo de receptores A2A e A2B promove um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias TNF (Figura 7A), IL-1 β (Figura 7B) e IL-6 (Figura 4C), por macrófagos humanos infectados com *L. amazonensis*, em concordância com os dados obtidos anteriormente. A regulação de citocinas é um mecanismo bem documentado de evasão imune utilizado pela *L. amazonensis*, onde a redução de citocinas pró-inflamatórias e o aumento de citocinas anti-inflamatórias criam um ambiente mais favorável ao parasito. Correlacionando com o aumento da produção de ROS e a diminuição da taxa de infecção, percebe-se que antagonizar os receptores de adenosina impede que a *L. amazonensis* mantenha-se em um ambiente anti-inflamatório, possivelmente via indução de uma maior expressão desses receptores, favorecendo uma resposta imune mais eficaz. As citocinas anti-inflamatórias avaliadas não apresentaram diferenças significativas.

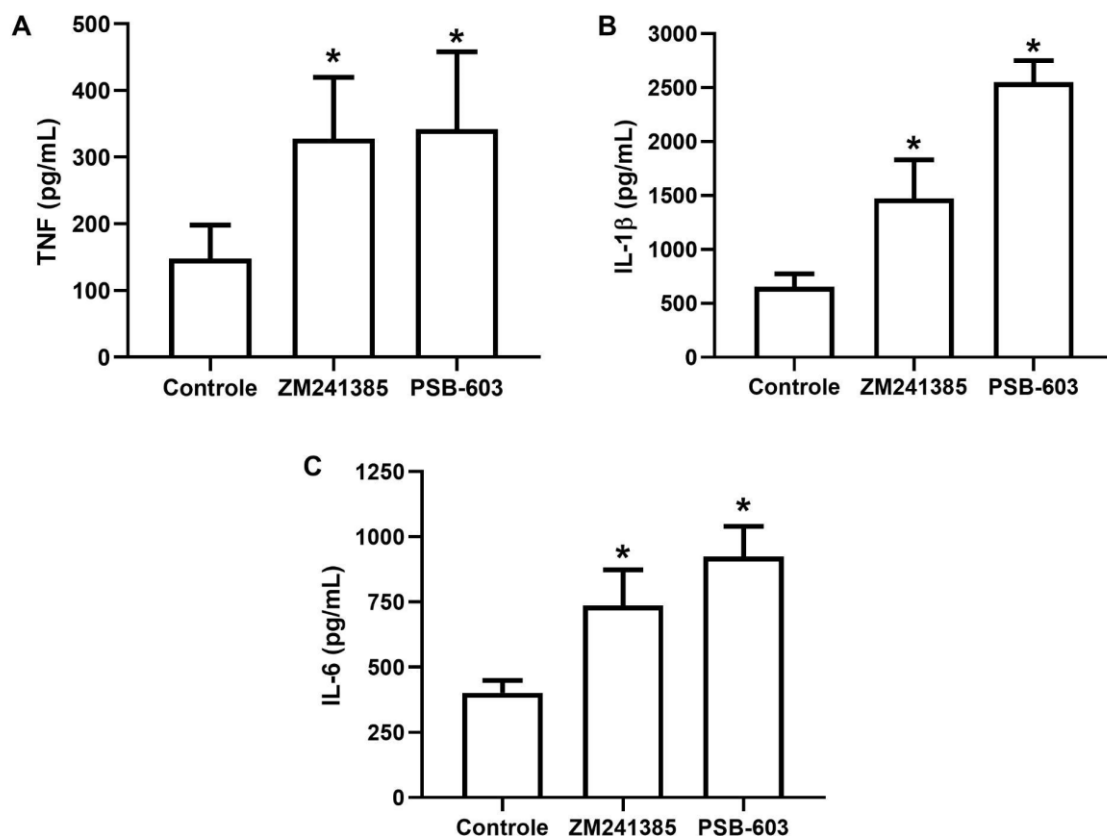


Figura 7. Produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos THP-1 infectados com *L. amazonensis*. Células THP-1 diferenciadas em macrófagos foram tratados com antagonistas seletivos de A2A (ZM241385) e A2B(PSB-603) e infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* por 24 horas. O sobrenadante foi coletado para a análise da produção de citocinas CBA/citometria de fluxo. (A) Produção de TNF. (B) Produção de IL-1 β . (C) Produção de IL-6. Barras representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata. *p < 0,05, comparado ao controle.

5. CONCLUSÃO

A infecção de células humanas por *L. amazonensis* aumenta a expressão dos receptores de adenosina A2A e A2B. O uso de antagonistas específicos para esses receptores, como o ZM241385 (para A2A) e o PSB-603 (para A2B), reduz significativamente a taxa de infecção por *L. amazonensis* e estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF, IL-1 β e IL-6. Ao bloquear esses receptores, cria-se um ambiente hostil para o parasito, caracterizado pela produção de ROS e citocinas pró-inflamatórias, que promovem um efeito leishmanicida e, conseqüentemente, reduzem as taxas de infecção por meio da eliminação das *leishmanias*. Esses resultados sugerem que a *L. amazonensis* regula a expressão dos receptores de adenosina como uma estratégia de evasão imunológica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G. Purinergic Signalling: Pathophysiological Roles. *Japanese Journal of Pharmacology*, v. 78, n. 2, p. 113–145, 1 jan. 1998.

AKHOUNDI, M. et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 57, p. 1–29, 1 out. 2017.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *Journal of Cell Science*, v. 112, n. 18, p. 2993–3002, 15 set. 1999.

ALMEIDA, T. F. et al. *Leishmania amazonensis* fails to induce the release of reactive oxygen intermediates by CBA macrophages. *Parasite Immunology*, v. 34, n. 10, p. 492–498, 11 set. 2012.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ANTONIOLI, L. et al. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in Molecular Medicine*, v. 19, n. 6, p. 355–367, 1 jun. 2013.

BAJRACHARYA, B. et al. The Ecto-5' nucleotidase/CD73 Mediates *Leishmania amazonensis* Survival in Macrophages. *BioMed Research International*, v. 2022, p. 1–10, 11 fev. 2022.

BALESTIERI, F. M. et al. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes and Infection*, v. 4, n. 1, p. 23–29, 1 jan. 2002.

BASU, M. et al. Increased host ATP efflux and its conversion to extracellular adenosine is crucial for establishing *Leishmania* infection. *Journal of Cell Science*, v. 133, n. 7, 20 fev. 2020.

BOGDAN C. Nitric Oxide And The Immune Response. *Nat. Immunol.* 2: 907-916, 2001.

BOGDAN C, ROLLINGHOFF M. The Immune Response To *Leishmania*: Mechanisms Of Parasite Control And Evasion. *Int.J.Parasitol.* 28: 121-134, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Leishmaniose Visceral: situação epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. [Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde; Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. 1 edição Brasília-DF, 2017]. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf>. Acesso em: 23 out. 2024.

BURNSTOCK, G. Purinergic signaling: from discovery to current developments. *Experimental Physiology*, v. 101, n. 11, p. 1089-1100, 2016.

BURNSTOCK, G. Introduction: P2 Receptors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 4, n. 8, p. 793–803, 1 abr. 2004.

BURNSTOCK, G.; KENNEDY, C. P2X receptors in health and disease. *Advances in Pharmacology*, v. 61, p. 333-372, 2011.

BOUSSOULAS, M. et al. Immunological evasion by *Leishmania*: Modulation of macrophage responses. *Trends in Parasitology*, v. 35, n. 9, p. 763-774, 2019.

CALEGARI-SILVA, T. C. et al. NF- κ B-mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection. *Immunology Letters*, v. 127, n. 1, p. 19–26, 25 ago. 2009.

CARNEIRO, M. B. H. et al. NOX2-Derived Reactive Oxygen Species Control Inflammation during *Leishmania amazonensis* Infection by Mediating Infection-Induced Neutrophil Apoptosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 200, n. 1, p. 196–208, jan. 2018.

CASTELLANO, L.R.C. Resposta imune anti-*Leishmania* e mecanismos de evasão Anti-*Leishmania* immune response and evasion mechanisms. [Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, Minas Gerais, Brasil.]. Disponível em: <https://vitae.ucv.ve/pdfs/VITAE_130.pdf>. Acesso em: 23 out. 2024.

CECÍLIO, P. et al. Deception and Manipulation: The Arms of *Leishmania*, a Successful Parasite. *Frontiers in Immunology*, v. 5, 20 out. 2014.

COÊLHO, Z. C. B. et al. In vitro initial immune response against *Leishmania amazonensis* infection is characterized by an increased production of IL-10 and IL-13. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 14, n. 5, p. 476–482, 15 dez. 2010.

COSTA, D. L. et al. Immunomodulation and evasion mechanisms of *Leishmania* parasites. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 535-540, 2020.

COSTA-DA-SILVA, A. C. et al. Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 7, n. 4, p. 54, 31 mar. 2022.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 72, n. 2, p. 132–141, 1 abr. 2002.

DESJARDINS, M.; DESCOTEAUX, A. Inhibition of Phagolysosomal Biogenesis by the *Leishmania* Lipophosphoglycan. *Journal of Experimental Medicine*, v. 185, n. 12, p. 2061–2068, 16 jun. 1997.

DE VRIES, H. J. C.; SCHALLIG, H. D. Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments. *American Journal of Clinical Dermatology*, p. 1–18, 14 set. 2022.

DI VIRGILIO, F. et al. Extracellular ATP and P2 purinergic signaling in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Cancer*, v. 18, n. 10, p. 601-618, 2017.

ELTZSCHIG, H. K.; SITKOVSKY, M. V.; ROBSON, S. C. Purinergic Signaling during Inflammation. *New England Journal of Medicine*, v. 367, n. 24, p. 2322–2333, 13 dez. 2012.

FERRARI, D. et al. The P2X7 Receptor: A Key Player in IL-1 Processing and Release. *The Journal of Immunology*, v. 176, n. 7, p. 3877–3883, 1 abr. 2006.

FIGUEIREDO, A. B. et al. *Leishmania amazonensis* impairs DC function by inhibiting CD40 expression via A2B adenosine receptor activation. *European Journal of Immunology*, v. 42, n. 5, p. 1203–1215, 6 fev. 2012.

FIGUEIREDO, A. B. et al. *Leishmania amazonensis*-Induced cAMP Triggered by Adenosine A2B Receptor Is Important to Inhibit Dendritic Cell Activation and Evade Immune Response in Infected Mice. *Frontiers in Immunology*, v. 8, 25 jul. 2017.

FORESTIER, C.-L.; GAO, Q.; BOONS, G.-J. *Leishmania* lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 4, 21 jan. 2015.

FREDHOLM, B. B. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—An Update. *Pharmacological Reviews*, v. 63, n. 1, p. 1–34, 8 fev. 2011.

GABRIEL, Á. et al. Cutaneous Leishmaniasis: The Complexity of Host's Effective Immune Response against a Polymorphic Parasitic Disease. *Journal of immunology research*, v. 2019, p. 1–16, 1 dez. 2019.

GIORGIONE, J. R.; TURCO, S. J.; EPAND, R. M. Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 93, n. 21, p. 11634–11639, 15 out. 1996.

GOMES, Rodrigo Saar. E-NTPDase-2 de *Leishmania amazonensis* é importante na adesão do parasito ao macrófago e participa da modulação da resposta inflamatória, de forma dependente e independente da atividade ectonucleotidásica. 2015. Tese (Dissertação de Doutorado em Ciências Biológicas - UFOP) Ouro Preto, 2015.

GOMES, I. N. et al. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. *Microbes and Infection*, v. 5, n. 4, p. 251–260, 1 abr. 2003.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. DE L. R. DE. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 1, p. 71–80, jan. 2003.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, n. 5, p. 573-580, 2019.

GREEN SJ, Nancy Ca, Meltzer MS. Cytokine-Induced Synthesis Of Nitrogen Oxides In Macrophages: A Protective Host Response To *Leishmania* And Other Intracellular Pathogens. *J.Leukoc.Biol.* 50: 93-103, 1991.

GUPTA, G.; OGHUMU, S.; SATOSKAR, A. R. Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. *Advances in Applied Microbiology*, v. 1, n. 1, p. 155–184, 2013.

HASKÓ, G. et al. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 7, n. 9, p. 759-770, 2008.

Jl, J. et al. CD4+CD25+ Regulatory T Cells Restrain Pathogenic Responses during *Leishmania amazonensis* Infection. *The Journal of Immunology*, v. 174, n. 11, p. 7147–7153, 19 maio 2005.

Jl, J.; SUN, J.; SOONG, L. Impaired Expression of Inflammatory Cytokines and Chemokines at Early Stages of Infection with *Leishmania amazonensis*. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 8, p. 4278–4288, ago. 2003.

JONES, D. E.; BUXBAUM, L. U.; SCOTT, P. IL-4-Independent Inhibition of IL-12 Responsiveness During *Leishmania amazonensis* Infection. *The Journal of Immunology*, v. 165, n. 1, p. 364–372, 1 jul. 2000.

JORENS, P. G.; MATTHYS, K. E.; BULT, H. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages. *Mediators of Inflammation*, v. 4, n. 2, p. 75–89, 1995.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Current Opinion in Hematology*, v. 7, n. 1, p. 26–31, Jan. 2000.

LANGSTON HP, Key, Gewirtz AT, Dombrowski KE, Kapp J.A. Secretion Of Il-2 And Ifn-Gamma, But Not Il-4, By Antigen-Specific T Cells Requires Extracellular Atp. *J.Immunol.* 170: 2962-2970, 2003.

LA SALA A, Ferrari D, Di VF, Idzko M, Norgauer J, Girolomoni G. Alerting And Tuning The Immune Response By Extracellular Nucleotides. *J.Leukoc.Biol.* 73: 339-343, 2003.

LIEW, F.Y. et al.. Macrophage Killing Of *Leishmania* Parasite In Vivo Is Mediated By Nitric Oxide From L-Arginine. *J.Immunol.* 144: 4794-4797, 1990.

MARQUES-DA-SILVA, C. et al. Infection with *Leishmania amazonensis* upregulates purinergic receptor expression and induces host-cell susceptibility to UTP-mediated apoptosis. *Cellular Microbiology*, v. 13, n. 9, p. 1410–1428, 11 jul. 2011.

MARTH, T.; KELSALL, B. L. Regulation of Interleukin-12 by Complement Receptor 3 Signaling. *Journal of Experimental Medicine*, v. 185, n. 11, p. 1987–1995, 2 jun. 1997.

MARZOCHI, M.C.A. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. *Jornal Brasileiro de Medicina*, 63: 82-104, 1992.

MORAES, P.; SILVEIRA, F. T. Histopatologia da forma localizada de leishmaniose cutânea por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 36, n. 5, p. 459–463, 1 out. 1994.

NEVES, L.O. et al. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86: 1092-1101, 2011.

NORTH, R. A. Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiological Reviews*, v. 82, n. 4, p. 1013–1067, 10 jan. 2002.

OLIVIER, M. et al. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes and Infection*, v. 14, n. 15, p. 1377–1389, 1 dez. 2012.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGETG. Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response: a Signaling Point of View. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 18, n. 2, p. 293–305, abr. 2005.

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 9, n. 10, p. 925–932, 1 out. 2016.

PAES-VIEIRA, L. et al. Differential regulation of E-NTPdases during *Leishmania amazonensis* lifecycle and effect of their overexpression on parasite infectivity and virulence. *Parasitology International*, v. 85, p. 102423, 21 jul. 2021.

PASSAES, A.C.S. et al. Quinoxalines against *Leishmania amazonensis*: SAR study, proposition of a new derivative, QSAR prediction, synthesis, and biological evaluation. *Scientific Reports*, v. 13, n. 1, 24 out. 2023.

PEREIRA, B. A. S.; ALVES, C. R. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Veterinary Parasitology*, v. 158, n. 4, p. 239–255, dez. 2008.

PROUDFOOT, L. et al. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 93, n. 20, p. 10984–10989, 1 out. 1996.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacological Reviews, v. 50, n. 3, p. 413–492, 1 set. 1998.

RIBEIRO-DE-JESUS, A. et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 31, n. 1, p. 143–148, jan. 1998.

SCHNURR, M. et al. Extracellular ATP and TNF- α Synergize in the Activation and Maturation of Human Dendritic Cells. The Journal of Immunology, v. 165, n. 8, p. 4704–4709, 15 out. 2000.

SÉGUIN O, DESCOTEAUX A. *Leishmania*, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite. Cellular Immunology, 309: 1–6, 2016.

SILVA, J. S.; ALMEIDA, R. P. Immune responses to *Leishmania* infection: Implications for the pathogenesis and disease outcome. Frontiers in Immunology, v. 8, p. 57-60, 2017.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 99, n. 3, p. 239–251, maio 2004.

SITKOVSKY, M. K. The A2A adenosine receptor: a potential broad regulator of COVID-19 virus infection. Frontiers in Immunology, v. 11, p. 1521, 2020.

SMITH, P. M. et al. Th1 and Th2 responses in leishmaniasis: Implications for vaccine development. Expert Review of Vaccines, v. 17, n. 12, p. 1117-1129, 2018.

SOONG, L. Subversion and Utilization of Host Innate Defense by *Leishmania amazonensis*. Frontiers in Immunology, v. 3, 2012.

STENGER, S. et al. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. Journal of Experimental Medicine, v. 180, n. 3, p. 783–793, 1 set. 1994.

SUTTERWALA, F. S. et al. Reversal of Proinflammatory Responses by Ligating the Macrophage Fcγ Receptor Type I. v. 188, n. 1, p. 217–222, 1 jul. 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Data on leishmaniasis (Global Health Observatory) WHO, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> .Acesso em: 11 out. 2024.

YAO, C. et al. Internal and surface subpopulations of the major surface protease (MSP) of *Leishmania chagasi*. Molecular and Biochemical Parasitology, v. 139, n. 2, p. 173–183, fev. 2005.