



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA
RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**

WESLEY LIMA DE PAULA

**Papel da sinalização purinérgica na infecção por *Leishmania
braziliensis***

**Goiânia
2025**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 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 das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) 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 material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

WESLEY LIMA DE PAULA

3. Título do trabalho

Papel da sinalização purinérgica na infecção por *Leishmania braziliensis*

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento 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) autor(a) e ao(à) orientador(a);
 - b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
- 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;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

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



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Saar Gomes, Professor do Magistério Superior**, em 17/03/2025, às 18:22, 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 **Wesley Lima De Paula, Discente**, em 17/03/2025, às 18:42, 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 **5192288** e o código CRC **ACC31C34**.

Referência: Processo nº 23070.006656/2025-74

SEI nº 5192288

WESLEY LIMA DE PAULA

Papel da sinalização purinérgica na infecção por *Leishmania braziliensis*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, da Universidade Federal de Goiás, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro.

Área de Concentração: Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro

Linha de Pesquisa: Estudo dos mecanismos imunológicos e processos patológicos gerais na relação parasito-hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Saar Gomes

**Goiânia
2025**

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

de Paula, Wesley Lima

Papel da sinalização purinérgica na infecção por *Leishmania braziliensis* [manuscrito] : Role of purinergic signaling in *Leishmania braziliensis* infection / Wesley Lima de Paula. - 2025.

12, 49 f.: il.

Orientador: Prof. Rodrigo Saar Gomes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2025.
Bibliografia.

1. *Leishmania braziliensis*. 2. sinalização purinérgica. 3. resposta imune. 4. macrófagos. I. Gomes, Rodrigo Saar, orient. II. Título.

CDU 612.017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE WESLEY LIMA DE PAULA - Aos vinte e um dias do mês de fevereiro do ano de 2025 (21/02/2025), às 14h00min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. **RODRIGO SAAR GOMES** (UFG), **FÁTIMA RIBEIRO DIAS** (UFG) e **PAULINE MARTINS LEITE BORGES** (UFJF) para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada por WEBCONFERÊNCIA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: “**Papel da sinalização purinérgica na infecção humana por *Leishmania braziliensis***”, em nível de MESTRADO, área de concentração em **BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, de autoria de **WESLEY LIMA DE PAULA**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Orientador, Prof. Dr. **RODRIGO SAAR GOMES**, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1492/2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato Aprovado ou Reprovado:

Banca Examinadora	Aprovado / Reprovado
Prof. Dr. Rodrigo Saar Gomes	Aprovado
Profa. Dra. Fátima Ribeiro Dias	Aprovado
Profa. Dra. Pauline Martins Leite Borges	Aprovado

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato **Habilitado**, cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, na área de concentração em **BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16h10 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, **HELOÍSA DE SOUSA VIEIRA**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Papel da sinalização purinérgica na infecção por *Leishmania braziliensis*



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Saar Gomes**, Professor do Magistério Superior, em 21/02/2025, às 16:20, 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 **Fatima Ribeiro Dias, Professora do Magistério Superior**, em 21/02/2025, às 16:21, 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 **Pauline registrado(a) civilmente como Pauline Martins Leite Borges, Usuário Externo**, em 21/02/2025, às 16:22, 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 **5147029** e o código CRC **9FB00DF4**.

Referência: Processo nº 23070.006656/2025-74

SEI nº 5147029

**Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-
Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Wesley Lima de Paula

Orientador (a): Prof. Dr. Rodrigo Saar Gomes

Membros:

- 1. Prof. Dr. Rodrigo Saar Gomes**
- 2. Prof. Dra. Fátima Ribeiro Dias**
- 3. Prof. Dra. Pauline Martins Leite Borges**

Data: 21/02/2025

DEDICATÓRIA

Foi em nome da ciência que executei este projeto, por isso dedico este trabalho a todos aqueles a quem esta pesquisa possa, de alguma forma, ajudar.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Rodrigo Saar, meu orientador, pela manifestação de incondicional apoio e disponibilidade, pela compreensão por algumas dilatações, pelo aconselhamento assertivo e pelo estímulo permanente, que muito contribuíram para aumentar o desafio e melhorar a profundidade e a clareza da investigação, também, pela sua amizade.

À Professora Fátima Ribeiro Dias e ao Laboratório de Imunidade Natural por todo o apoio técnico e científico, essenciais para a realização dos experimentos que fundamentaram este trabalho.

Ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, seus docentes e funcionários, que desde 2023, quando ingressei no mestrado, me acompanham neste meu percurso acadêmico.

Aos colegas de mestrado e de laboratório pelo companheirismo nesta jornada de crescimento profissional e pelo compartilhamento de conhecimentos científicos.

Às fundações de fomento FAPEG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio fundamental para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

1. Introdução/ Revisão da literatura	13
1.1. Aspectos gerais das leishmanioses	13
1.2. Respostas imunes às leishmanioses	16
1.3. Sinalização purinérgica	19
2. Justificativa	23
3. Objetivos	24
3.1. Objetivo geral	24
3.2. Objetivos específicos	24
4. Metodologia	26
4.1. Aspectos éticos	26
4.2. Análise funcional	26
4.3. Infecções <i>in vitro</i>	26
4.4. Expressão de genes	27
4.5. Avaliação da resposta imune	27
4.6. Análises estatísticas	28
5. Resultados	29
5.1. Lesões de pacientes com LC expressam níveis elevados de CD39, CD73 e receptor de adenosina A2A	29
5.2. Correlação da expressão de receptores de adenosina A2A e A2B e moléculas envolvidas no processo inflamatório	31
5.3. Papel dos receptores de adenosina em macrófagos humanos infectados com <i>L. braziliensis</i>	32
6. Discussão	38
7. Conclusões	44
8. Referências bibliográficas	45

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Figura 1. Ciclo biológico da leishmaniose.....	15
Figura 2. Esquema representativo da sinalização purinérgica	20
Figura 3. Expressão de mRNA das enzimas CD39 e CD73 no sangue e nas lesões de pacientes com leishmaniose cutânea e controles saudáveis	30
Figura 4. Expressão de mRNA dos receptores de adenosina em pacientes com leishmaniose cutânea e controles saudáveis	31
Figura 5. Correlação da expressão de receptores de adenosina A2A e A2B com moléculas envolvidas no processo inflamatório	32
Figura 6. Expressão de mRNA dos receptores de adenosina em macrófagos humanos infectados com <i>Leishmania braziliensis</i>	33
Figura 7. Efeitos da inibição de A2AR e A2BR nas taxas de parasitismo e na produção de ROS em macrófagos humanos infectados, in vitro, com <i>L. braziliensis</i>	34
Figura 8. Medição das citocinas TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-10 em macrófagos humanos THP-1 infectados ou não, com <i>L. braziliensis</i> e tratados, ou não, com antagonistas seletivos dos receptores A2A e A2B	35
Figura 9. Efeitos da adenosina nas taxas de parasitismo de macrófagos humanos infectados, in vitro, com <i>L. braziliensis</i>	36
Figura 10. Expressão de mRNA de ADA em macrófagos humanos infectados com <i>Leishmania braziliensis</i>	36
Figura 11. Efeitos do bloqueio de ADA e inibição de A2AR nas taxas de parasitismo de macrófagos humanos infectados, in vitro, com <i>L. braziliensis</i>	37

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ADA: Adenosina deaminase
ADO: Adenosina
ADP: Difosfato de adenosina
AMP: Monofosfato de adenosina
AMPc: Monofosfato cíclico de adenosina
ATP: Trifosfato de adenosina
A2A: Receptor de adenosina A2A
A2B: Receptor de adenosina A2B
CD39: Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase-1
CD73: Ecto-5'-nucleotidase
CR1: Receptor do complemento 1
CR3: Receptor do complemento 3
DNA: Ácido desoxirribonucleico
IFN- γ : Interferon gama
IgG: Imunoglobulina G
IL-1 β : Interleucina 1-beta
IL-6: Interleucina-6
IL-10: Interleucina-10
iNOS: Óxido nítrico sintase induzível
LC: Leishmaniose cutânea
LPG: Lipofosfoglicano
LPS: Lipopolissacarídeo
MyD88: Fator 88 de diferenciação mielóide
NECA: N-etilcarboxamidoadenosina
NK: Natural Killer
NTPDase: Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
NF- κ B: Factor nuclear kappa B
PBS: Salina tamponada com fosfato
ROS: Intermediários reativos de oxigênio
TGF- β : Fator de crescimento transformador beta

THP-1: Macrófagos humanos de linhagem celular imortalizada

TNF: Fator de necrose tumoral

TRIF: Domínio Adaptador contendo TIR indutor de IFN- β

RESUMO

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. O processo de infecção provoca liberação de ATP pelas células e tecidos. O ATP extracelular pode ser convertido em adenosina, pelas enzimas CD39 e CD73. A adenosina tem efeitos anti-inflamatórios, através da ligação à receptores P1, especialmente receptores A2A e A2B. Esse trabalho avaliou o papel da sinalização purinérgica na resposta imune humana à *Leishmania braziliensis*. Os dados obtidos de análises de transcriptoma (GEO GSE55664) mostram que pacientes com leishmaniose cutânea localizada (LCL; n = 21), causada por *L. braziliensis*, apresentaram maior expressão de CD39, CD73 e receptor A2A do que os controles saudáveis (n = 7). Por outro lado, a expressão de A2BR foi menor nos pacientes com LCL. Nos pacientes encontramos correlações positivas entre a expressão de A2AR e *IL1B*, *IL6* e *IL32*, enquanto a expressão de A2BR é negativamente correlacionada com a expressão dos genes dessas citocinas. Foram avaliadas as taxas de parasitismo em macrófagos humanos THP-1 infectados por *Leishmania braziliensis*-GFP, que também expressaram maiores níveis de A2AR, na presença e ausência de antagonistas seletivos do A2AR, em 24 e 48 horas. Não houve alteração nas taxas de parasitismo nos macrófagos e na produção de citocinas e ROS. No entanto, quando a enzima adenosina deaminase (ADA) é inibida, o antagonista de A2AR reduz significativamente as taxas de infecção. Esses dados sugerem que a infecção por *L. braziliensis* altera a expressão de enzimas e receptores envolvidos na sinalização purinérgica, e essas alterações são importantes na modulação da resposta imune durante a LCL.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*, sinalização purinérgica, resposta imune, macrófagos.

ABSTRACT

Leishmaniasis are infectious-parasitic diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*. The infection process causes the release of ATP by cells and tissues. Extracellular ATP can be converted into adenosine by the enzymes CD39 and CD73. Adenosine has anti-inflammatory effects by binding to P1 receptors, especially A2A and A2B receptors. This work evaluated the role of purinergic signaling in the human immune response to *Leishmania braziliensis*. Data obtained from transcriptome analyzes (GEO GSE55664) show that patients with localized cutaneous leishmaniasis (LCL; n = 21), caused by *L. braziliensis*, showed higher expression of CD39, CD73 and A2A receptor than healthy controls (n = 7). On the other hand, A2BR expression was lower in patients with LCL. In patients, we found positive correlations between the expression of A2AR and *IL1B*, *IL6* and *IL32*, while the expression of A2BR is negatively correlated with the expression of the genes of these cytokines. Parasitism rates were evaluated in human THP-1 macrophages infected by *Leishmania braziliensis*-GFP, which also expressed higher levels of A2AR, in the presence and absence of selective A2AR antagonists, at 24 and 48 hours. There was no change in parasitism rates in macrophages and in the production of cytokines and ROS. However, when the enzyme adenosine deaminase (ADA) is inhibited, the A2AR antagonist significantly reduces infection rates. These data suggest that *L. braziliensis* infection alters the expression of enzymes and receptors involved in purinergic signaling, and these changes are important in modulating the immune response during LCL.

Keywords: *Leishmania braziliensis*, purinergic signaling, immune response, macrophages.

1 INTRODUÇÃO/REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias consideradas negligenciadas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que afetam, especialmente, uma parcela da população em situação de vulnerabilidade socioeconômica. As leishmanioses são caracterizadas por um amplo espectro clínico com conjunto de sinais e sintomas variados, desde lesões cutâneas localizadas, com cura espontânea, até formas graves que afetam as mucosas ou órgãos internos. As diferentes formas clínicas dependem da espécie do agente etiológico e do estado imunológico do hospedeiro (Bogdan & Rollinghoff, 1998).

As leishmanioses ocorrem em regiões tropicais e subtropicais, podendo se manifestar de forma visceral, cutânea e/ou mucosa. É estimado que, por ano, 1,5 a 2 milhões de indivíduos sejam acometidos pela doença, e que 1 a 1,5 milhão de casos correspondam à forma tegumentar da doença (Who, 2007). No Brasil, o parasito foi identificado pela primeira vez por Lindenberg, em 1909, em trabalhadores das áreas de desmatamento para construção de rodovias no interior do estado de São Paulo. Desde então sua transmissão vem sendo documentada em vários municípios brasileiros. Inicialmente tida como uma zoonose de animais silvestres que acometia humanos em contato com áreas florestais, posteriormente sua ocorrência também começou a ser descrita em áreas rurais e periurbanas (Ministério da Saúde, 2017).

Por ser uma das afecções dermatológicas mais importantes no Brasil, devido seu grande potencial de causar não só deformidades físicas nos indivíduos, mas também acometimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, a leishmaniose tegumentar pode ser considerada também uma doença ocupacional. Além disso, ela tem ampla distribuição com registro de casos em praticamente todas as regiões do país (Barral et al., 1995). Atribui-se o aumento da incidência e prevalência da leishmaniose a fatores de risco provocados pelo homem, como grande migração, desmatamento, urbanização e imunossupressão. As condições do meio ambiente, o nível socioeconômico, os comportamentos demográficos e humanos também são essenciais no impacto da doença. Fatores como o ambiente e os movimentos migratórios podem levar a alterações no ciclo biológico envolvendo mais precisamente a movimentação dos vetores e reservatórios e, por sua vez, aumentar a susceptibilidade de seres humanos a flebotomíneos infectados.

Vale ressaltar também o acometimento da leishmaniose por parte da população rural que geralmente sofre com surtos da doença durante as épocas de colheita. (Oryan & Akbari, 2016).

As leishmanioses são causadas por parasitos do gênero *Leishmania* e transmitidas por fêmeas de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* no Brasil, durante o repasto sanguíneo. A leishmaniose cutânea (LC) tem como agentes etiológicos a *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. major* e *L. tropica*, sendo *L. braziliensis* a principal causadora da LC no Brasil. A *L. braziliensis* está distribuída por todo o Brasil e em vários países da América Central e do Sul. A LC é caracterizada por lesões de pele nodulares e indolores que aumentam, sofrem ulceração no centro e persistem por meses a anos (Convit et al, 1972; Carvalho et al, 1994; Costa et al, 1986; Galvao et al, 1993; Leopoldo et al, 2006; Turetz et al, 2002).

No intestino médio de fêmeas de flebotomíneos, as formas amastigotas de *Leishmania* se proliferam e se diferenciam em formas promastigotas. Estas formas infecciosas do parasito migram através do esôfago para a probóscida do vetor invertebrado, onde estão finalmente prontos para serem inoculados em seu hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo (Séguin & Descoteaux, 2016). A contaminação de mamíferos se dá pela inoculação de formas promastigotas pelo inseto vetor no local da picada no hospedeiro. Essas formas promastigotas, posteriormente, são fagocitadas por várias populações de fagócitos recrutadas no local da inoculação, incluindo neutrófilos, monócitos e, principalmente, macrófagos e, no interior destes, as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas. O ciclo se reinicia com novo repasto sanguíneo pelo flebotomíneo e por sua consequente infecção pelas formas amastigotas (Marzochi, 1992). O ciclo biológico está representado na figura 1.

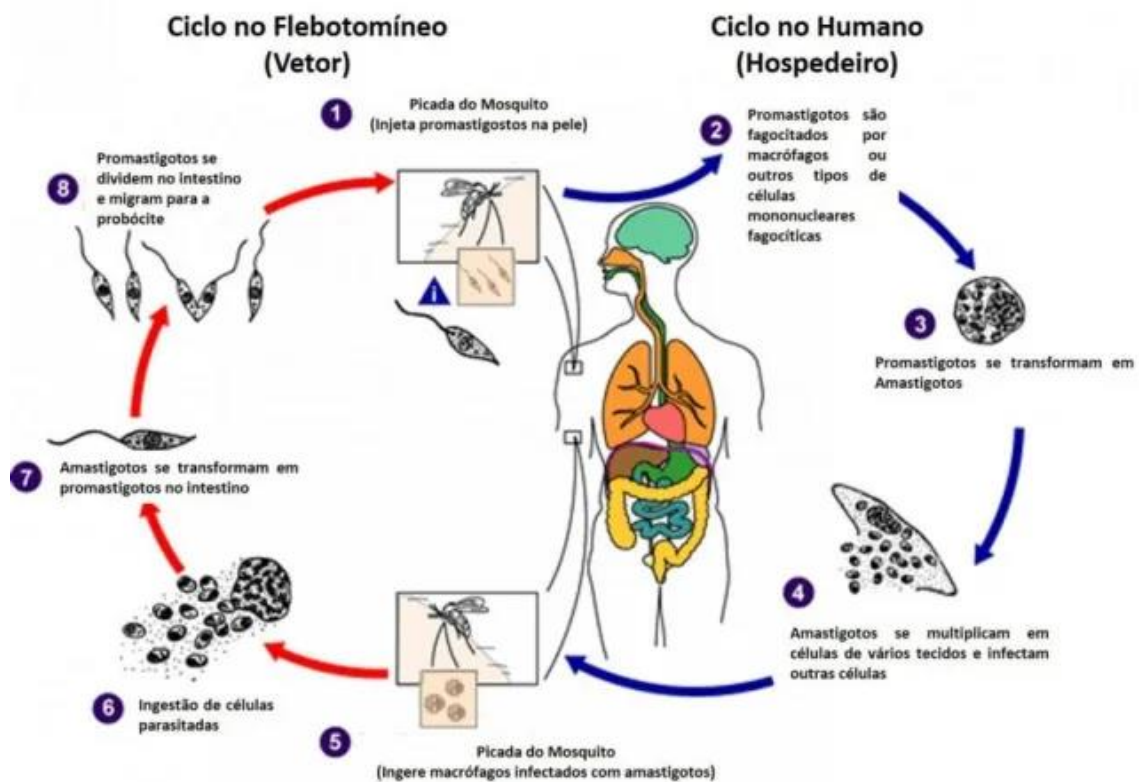


Figura 1. Ciclo biológico da leishmaniose. Adaptado de CDC – U.S. Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>

O exame parasitológico para diagnóstico da LC é feito com base no exame direto ou cultura, e para isso utiliza-se material coletado para realização de biópsia ou o aspirado das úlceras. A identificação microscópica exige mão de obra experiente, além disso a cultura pode levar algum tempo até ficar pronta e sofrer contaminação, dificultando assim o diagnóstico. A intradermoreação de Montenegro (IDRM), um método indireto, tem a limitação de levar entre 3 e 6 semanas após o início da doença para se tornar positiva, com sensibilidade variável entre as áreas endêmicas, e não havendo padronização dos antígenos utilizados na sua produção. Outros recursos diagnósticos como a reação em cadeia pela polimerase (PCR) e testes sorológicos também têm sido utilizados (Neves et al., 2011).

O primeiro fármaco de escolha para o tratamento da leishmaniose tegumentar americana (LTA) é o antimoniato de N-metilglucamina. Como opções terapêuticas de segunda linha, são disponibilizados o isotionato de pentamidina e a anfotericina B. É possível que as diferentes espécies de *Leishmania* tenham influência na resposta terapêutica aos antimoniais. Em relação aos custos dos tratamentos, quanto as despesas com as drogas, a pentamidina apresenta custo mais elevado que o antimonial, porém o tratamento parenteral com o antimonial gera despesas relacionadas a insumos

hospitalares, afastamento do trabalho ou internação. Desse modo, a pentamidina constitui uma importante opção terapêutica para a leishmaniose cutânea, visto seu custo-benefício, além de ser segura para cardiopatas. Os efeitos colaterais dos antimoniais incluem toxicidades cardíaca, hepática, pancreática, renal e do sistema músculo-esquelético. Outros fármacos usados para o tratamento da LTA são miltefosina, azitromicina, itraconazol, cetoconazol, alopurinol, paramomicina e pentoxifilina (Neves et al., 2011).

A grande maioria dos indivíduos que se recuperaram da leishmaniose, desenvolveram imunidade contra a infecção, o que justifica esforços para o desenvolvimento de uma vacina que previna a doença; porém, até o momento, nenhuma vacina para leishmaniose humana está registrada. Algumas vacinas com potencial de imunização e que abarcam conjunto de antígenos estão em desenvolvimento pré-clínico e em estudos clínicos (Burza et al., 2018).

1.2 Resposta imune às leishmanioses

A LC pode se curar espontaneamente ou evoluir para a formação de pápulas, nódulos, placas e úlceras, além da invasão de linfonodos regionais e evolução para lesões mucosas (Leishmaniose Cutâneo Mucosa). O tipo de resposta imunológica que o indivíduo irá desenvolver é o que determinará a evolução da infecção e as diferentes formas de apresentação clínica da leishmaniose tegumentar. Esta resposta inflamatória dependerá de fatores genéticos do hospedeiro, além da espécie de *Leishmania* promotora da infecção (Silveira et al., 2008).

O sucesso da infecção por *Leishmania* em macrófagos depende da capacidade do parasito em escapar da lise extracelular causada por proteínas do sistema complemento, aderir a essas células através de receptores de membrana, ser fagocitado e resistir aos mecanismos microbicidas (Alexander & Russell, 1992). A interação de promastigotas com o macrófago ocorre com a participação das moléculas de superfície dos parasitos, tais como os lipofosfoglicanos (LPG) ou gp63, ou opsoninas derivadas do hospedeiro, como complemento, a fibronectina e imunoglobulina (Bogdan & Rollinghoff, 1999; Brittingham et al, 1999; Mosser & Rosenthal, 1993). A superfície celular de *Leishmania* possui moléculas relacionadas com a capacidade de interação do parasito com as células hospedeiras e os macrófagos, por sua vez, têm receptores de membrana que facilitam a adesão e internalização de *Leishmania*. O envolvimento destes receptores está bem

caracterizado, em particular, pela participação de receptores de complemento na fagocitose e na sobrevivência intracelular do parasito (Mosser & Edelson, 1985).

As formas metacíclicas de *Leishmania* são resistentes à ação lítica do sistema complemento por apresentarem moléculas de superfície alongadas, como o LPG (Pimenta et al, 1992; Puentes et al, 1989). Além disso, as moléculas de LPG podem interagir diretamente com receptores p150/95 e CR3, na superfície dos macrófagos, favorecendo, assim, a fagocitose dos parasitos (Talamas-Rohana et al, 1990). Dentre as funções do LPG, destaca-se, ainda, a importância dessa molécula na inibição da fusão do fagossomo-endossomo e na resistência às enzimas lisossomais, o que garante a sobrevivência do parasito no interior das células (Desjardins & Descoteaux, 1997). Acreditava-se que o LPG fosse importante para a interação com macrófagos tanto de formas promastigotas, quanto de amastigotas, que pareciam possuir uma forma estruturalmente distinta dessa molécula (Glaser et al, 1991; Moody et al, 1991; Turco, 1988). Tem-se observado que a expressão de LPG é reduzida em formas amastigotas, em paralelo a um aumento na expressão de proteofosfoglicanos (PPG), que possuem semelhanças estruturais com o LPG (Piani et al, 1999).

Outra molécula largamente expressa na superfície de *Leishmania*, em especial nas formas promastigotas metacíclicas (Yao et al, 2005), é a gp63 uma metaloproteínase amplamente distribuída pela superfície de promastigotas. A gp63 atua na conversão de C3b em C3bi, favorecendo a adesão e internalização do parasito (Brittingham et al, 1999). O C3b se liga ao receptor CR1 e o C3bi se liga ao receptor CR3 (CD11b/CD18), sendo esse último mecanismo, possivelmente, o mais importante para os processos de adesão e fagocitose de formas promastigotas de *Leishmania* em macrófagos (Kane & Mosser, 2000). Por outro lado, os estudos sobre os mecanismos de interação de amastigotas com os macrófagos são escassos e limitados à descrição da função de receptores para região Fc de IgG e ligantes para o sulfato de heparan (Love et al, 1998; Peters et al, 1995; Kima et al, 2000; Guy & Belosevic, 1993).

Durante o processo de fagocitose pode ocorrer uma ativação do macrófago para produzir NO (óxido nítrico) e ROS (espécies reativas de oxigênio), que são altamente tóxicos para o parasito (Liew et al, 1990; Murray, 1982). Já é bem estabelecido que essas moléculas são as mais efetivas contra *Leishmania* (Liew et al, 1990; Bogdan, 2001; Green et al, 1991). Contudo, a entrada via receptores do tipo CR3 (CD11b/CD18), receptor para C3bi e principal mecanismo na fagocitose de *Leishmania*, inibe a ativação do macrófago e a produção dessas moléculas tóxicas, o que garante a sobrevivência do parasito (Mosser

et al, 1987; Mosser & Edelson, 1985; Wilson & Pearson, 1988). Além da capacidade de infectar células hospedeiras, os parasitos do gênero *Leishmania* possuem significativa capacidade de modular a resposta imune, promovendo a sobrevivência e manutenção da infecção (Gregory & Olivier, 2005; Soong, 2012). As duas principais formas biológicas do parasito (promastigotas e amastigotas) são conhecidamente capazes de reduzir a expressão de inúmeros genes e alterar as funções do macrófago (Buates & Matlashewski, 2001; Chaussabel et al, 2003).

O macrófago pode controlar e eliminar o parasito através de diversos mecanismos que envolvem a produção da citocina IL-12, que, por sua vez, estimula linfócitos T e células NK a produzirem IFN- γ , que age em sinergismo com a citocina TNF- α na estimulação dos próprios macrófagos para produzirem ROS, tóxicos para o parasito (Kane & Mosser, 2000; Gorak et al, 1998). O óxido nítrico (NO) envolvido na resposta imune contra patógenos é proveniente da NOS (óxido nítrico sintase II), conhecida como NOS induzível ou somente iNOS. A produção de NO por iNOS é dependente de inúmeras citocinas inflamatórias como IFN- γ , TNF- α e IL-1 e essa produção pode ser inibida por citocinas anti-inflamatórias como TGF- β , IL-3, IL-4 e IL-10 (Jorens et al, 1995). O mecanismo exato pelo qual o NO é capaz de eliminar o parasito ainda não é totalmente esclarecido, mas acredita-se que o NO reaja com ferro intracelular levando à inibição de enzimas que possuam o ferro no núcleo do seu grupo prostético. Isso pode ocasionar a inibição de enzimas envolvidas na síntese de DNA, como a ribonucleotídeo redutase, na respiração mitocondrial e nas atividades metabólicas do parasito (Lepoivre et al, 1994; Nathan & Xie, 1994).

Durante a resposta imune inata, células como macrófagos reconhecem os antígenos dos patógenos via receptores da imunidade inata, como os receptores similares a Toll (TLRs), receptores similares a NOD (NLRs), receptor para manose (MR), dectina-1, dentre outros (Awasthi et al. 2004). A ativação desses receptores ativa vias de ativação celulares para a produção de citocinas da imunidade inata, que podem ser pró-inflamatórias, como o TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-23, ou anti-inflamatórias ou reguladoras, como o IL-10. O tipo de resposta dos macrófagos, na defesa inicial contra os patógenos, influencia os perfis das respostas imunes adquiridas e o desfecho clínico das doenças (Awasthi et al, 2004).

A resposta imune protetora contra *Leishmania* envolve, de maneira geral, a produção de IL-12 por macrófagos ou células dendríticas infectadas, e diferenciação de células T auxiliares CD4+ do tipo 1 (Th1), produtoras de IFN- γ . Adicionalmente, tem

sido demonstrado que a produção de IL-17, por linfócitos Th17, é essencial para o controle do crescimento do parasito, uma vez que a IL-17 também induz NO em macrófagos infectados com *L. infantum*, em sinergismo com IFN γ (Pitta et al., 2009; Ghosh et al., 2013; Sacramento et al., 2014; Quirino et al., 2016).

1.3 Sinalização purinérgica

O processo de ativação do sistema imune ocorre pela participação de diferentes moléculas de sinalização que podem ser liberadas em resposta a uma lesão tecidual ou a agentes patogênicos exógenos. Este mecanismo se faz necessário tanto para desencadear respostas imunes inatas, quanto para balancear e resolver o processo inflamatório em curso (Gallucci & Matzinger, 2001).

Nos processos infecciosos e inflamatórios há uma grande liberação de ATP (adenosina trifosfato) por conta da lise de células e tecidos atingidos. Além disso, o ATP pode ser liberado por mecanismos não líticos, como a exocitose de vesículas contendo ATP, através de canais permeáveis a nucleotídeos, por vesículas de transporte que fornecem proteínas para a membrana celular e via lisossomais (Fredholm et al., 2011). O ATP extracelular sinaliza através de receptores purinérgicos do tipo P2. A ligação do ATP aos receptores do tipo P2 resulta no aumento da produção de importantes citocinas pró-inflamatórias, como IFN γ , TNF- α , IL-1 e IL-12 (la Sala et al, 2003; Langston et al, 2003).

Todas as células possuem componentes do sistema purinérgico e são capazes de liberá-los de forma balanceada, a depender do estímulo. Na sinalização purinérgica há o envolvimento dos mediadores da sinalização compostos por nucleotídeos (adenosina trifosfato - ATP, adenosina difosfato – ADP, adenosina monofosfato – AMP) e nucleosídeos extracelulares (adenosina e inosina), por receptores purinérgicos específicos (P2X, P2Y e P1), através de onde os nucleotídeos e nucleosídeos desempenham suas funções e por ectoenzimas, responsáveis por controlar os níveis extracelulares dos mediadores (Atkinson et al, 2006). O esquema está representado na figura 2.

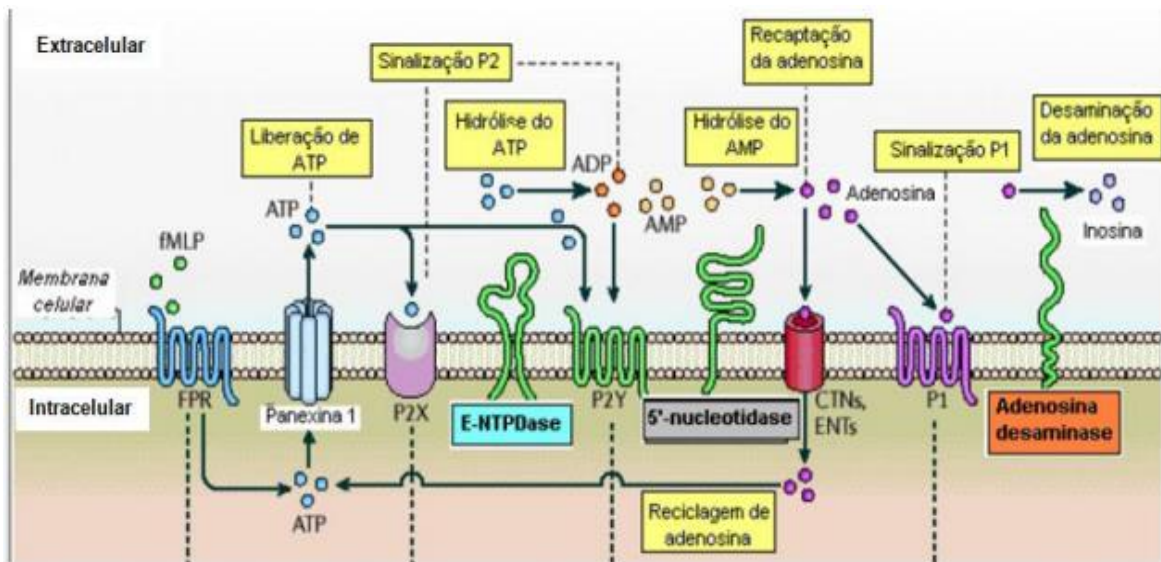


Figura 2. Esquema representativo da sinalização purinérgica. Fonte: Tese de doutorado “Avaliação da sinalização purinérgica em pacientes com mieloma múltiplo” UFSM, Pâmela de Brum Soares, UFSM, 2016. Adaptado de JUNGER, 2011. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/handle/1/18109>

A natureza das atividades enzimáticas de CD39 (nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1) e CD73 (5'-ectonucleotidase), enzimas expressas em diferentes tipos celulares, regulam a duração, magnitude e natureza química dos sinais purinérgicos através da hidrólise de ATP/ADP em AMP e de AMP em adenosina, respectivamente. Há, desse modo, uma regulação encarregada de ajustar as funções da resposta imune. Este processo acarreta numa mudança de um ambiente pró-inflamatório impulsionado pelo ATP para um ambiente anti-inflamatório, induzido pela adenosina. Dessa forma, a sinalização purinérgica envolvendo a via CD39/CD73 muda dinamicamente o contexto fisiopatológico no qual está inserida (Antonioli et al, 2013).

Devido à sua importância energética, fundamental para o metabolismo das células, a adenosina trifosfato (ATP) pode ser considerada também uma molécula sinalizadora nos meios intra e extracelular. Além do ATP, seus produtos de hidrólise como adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP) e a adenosina (ADO) também atuam como sinalizadores em diferentes tecidos e órgãos (Burnstock et al, 2013).

O ATP extracelular é capaz de sinalizar através de receptores purinérgicos do tipo P2. Esses receptores são divididos em dois grandes grupos, dependentes dos mecanismos de transdução de sinal envolvidos e na estrutura molecular dos receptores. Os receptores do tipo P2X estão associados à canais de íons, enquanto os receptores do tipo P2Y estão associados à proteína G. A ligação do ATP aos receptores do tipo P2 ocasiona um aumento na produção de importantes citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF- α , IL-

1 e IL-12 (la Sala et al, 2003; Langston et al, 2003). A ligação em receptores membros da subfamília P2X está envolvida em processos neurosensoriais, agregação plaquetária, morte celular, ativação de IL-1 β e TNF- α (North, 2002; Ferrari et al, 2006). Por outro lado, a ligação aos receptores P2Y está associada à proliferação celular, apoptose, inflamação, maturação de células dendríticas e aumento na produção de IL-13, dependendo do subtipo do receptor (Abbracchio et al, 1998; Schnurr et al, 2000).

A hidrólise de ATP extracelular pela atividade catalítica da CD39 é capaz de reduzir esse importante estímulo inflamatório ao mesmo tempo que eleva a concentração de AMP extracelular, que, através da ação da enzima 5'-ectonucleotidase, pode ser convertido em adenosina. A adenosina, por sua vez, exerce seus efeitos através da ligação à receptores da família P1 – receptores A1, A2A, A2B e A3 – acoplados a proteína G (Fredholm et al, 1994).

A adenosina extracelular desempenha um papel imunorregulatório modulando a função de componentes celulares da resposta imune adaptativa e inata. Sua atividade imunossupressora, permite com que ela interfira em estágios posteriores do processo inflamatório como mediador de feedback negativo, como na ativação de células T reguladoras e na liberação de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10. Deste modo, nota-se que o equilíbrio entre as concentrações de ATP (pró-inflamatório) e adenosina (anti-inflamatória) é um fenômeno fundamental na homeostase imune e, assim, as ectonucleotidases desempenham relevante papel na regulação dos níveis desses nucleotídeos e nucleosídeos (Antonioli et al, 2012).

A ação da adenosina nos receptores A2A e A2B, leva, de maneira geral, a um aumento de AMP cíclico intracelular, com conseqüente inibição da resposta imune, pela redução na produção de IFN- γ , TNF- α e IL-12 e um aumento na produção de IL-10 pelas células (Raskovalova et al, 2005; Lappas et al, 2005; Panther et al, 2003). A ligação de adenosina aos receptores A1 e A3, por outro lado, inibe a elevação na produção de AMPc, com um conseqüente aumento na concentração de cálcio intracelular (Abbracchio & Ceruti, 2007). Sabe-se que a adenosina é capaz de evitar o *burst* respiratório em macrófagos (Si et al, 1997; Edwards, III et al, 1994; Csoka et al, 2007) e suprimir a produção de NO por células estimuladas com LPS (Hasko et al, 1996). Um importante trabalho na área demonstrou que o NECA (um análogo de adenosina) foi capaz de reduzir a expressão de iNOS e produção de NO por macrófagos estimulados com IFN- γ , em uma via dependente do receptor A2B (Xaus et al, 1999). Além disso, salienta-se o papel de adenosina na redução da produção de TNF- α e IL-12, tanto pela ação sobre A2A quanto

sobre A2B (Hasko et al, 2000; Kara et al, 2010). CD39 e CD73 expressos em células T reguladoras (Tregs) convertem ATP extracelular em adenosina, o que suprime a função das células T efetoras. Recentemente, descobriu-se que camundongos *knockout* para CD39 possuem resposta inflamatória aumentada devido ao aumento de ATP extracelular e diminuição de adenosina (Huang et al., 2021).

Inúmeros estudos têm se dedicado a demonstrar o papel da sinalização purinérgica nas infecções por diferentes agentes patogênicos. Enzimas análogas à CD39 e CD73 humana foram caracterizadas em diversos microrganismos infecciosos. Em tripanossomatídeos, essas enzimas são fundamentais para a via de salvação de nucleotídeos purínicos (Fietto et al, 2004), uma vez que esses parasitos são incapazes de realizar síntese *de novo* de purinas (Marr et al, 1978). A atividade e a expressão diferenciais de enzimas que modulam ATP/adenosina em diferentes espécies e cepas de *Leishmania* estão associadas à capacidade de infecção *in vivo* (de Souza et al, 2010; Maioli et al, 2004; Marques-da-Silva et al, 2008) e ao direcionamento da forma clínica da doença (Leite et al, 2012). Adicionalmente, essas enzimas são importantes para a adesão, internalização e modulação da resposta de macrófagos frente à infecção (Gomes et al, 2015).

2 JUSTIFICATIVA

Segundo a OMS, a leishmaniose está na lista das 10 principais doenças tropicais negligenciadas, afetando globalmente mais de 12 milhões de pessoas. Isso se deve ao fato de que a doença atinge principalmente populações de países em desenvolvimento, justamente onde há menos investimentos em medicamentos e vacinas por parte de grandes laboratórios privados que empenham maiores esforços no campo da saúde em países desenvolvidos.

Apesar de inúmeras estratégias de prevenção da leishmaniose em áreas endêmicas, essa doença continua sendo considerada um enorme problema de saúde pública em regiões tropicais e temperadas. Como estratégias quimioterápicas e vacinais ainda são carentes de mais pesquisas e o entendimento profundo dos mecanismos de subversão da resposta imune pela *Leishmania* se torna, dentro desse contexto, fundamental para um efetivo combate à essa doença negligenciada.

Sabemos que a manipulação da sinalização purinérgica (balanço ATP/Adenosina) em *Leishmania*, assim como em outros agentes patogênicos, participa do controle e imunopatogênese das infecções. Contudo, os mecanismos envolvidos ainda carecem de investigações aprofundadas. O presente estudo busca entender como a expressão das enzimas CD39 e CD73, bem como dos receptores de adenosina, A2A e A2B, participam da infecção por *Leishmania* em macrófagos humanos, principal célula hospedeira desse parasito e se a alteração no balanço ATP/adenosina altera a resposta imune e as taxas de infecção de macrófagos humanos na presença de *L. braziliensis*. Esperamos que os novos conhecimentos sobre a participação da sinalização purinérgica no processo de infecção por *L. braziliensis*, à luz dos nossos resultados, possa não só esclarecer os mecanismos de infecção dessa espécie, mas também pavimentar novas estratégias em tratamentos e prevenção.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o papel da sinalização purinérgica nas infecções por *L. braziliensis*.

3.2. Objetivos específicos

Análise funcional:

- Avaliar a expressão de CD39, CD73 e receptores de adenosina no sangue total e nas lesões de pacientes com leishmaniose cutânea e controles saudáveis;
- Avaliar a expressão dos receptores de adenosina, A2A e A2B, nas lesões de pacientes com leishmaniose cutânea e controles saudáveis;
- Correlacionar a expressão de receptores de adenosina, A2A e A2B, com a expressão de genes envolvidos na resposta imune de pacientes com leishmaniose cutânea;

Validação *in vitro*:

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

- Avaliar a resposta imune através da produção de citocinas em macrófagos humanos infectados, ou não, com *L. braziliensis* e tratados, ou não, com antagonistas seletivos dos receptores A2A e A2B.

- Avaliar os efeitos da adenosina na carga parasitária de macrófagos humanos infectados com *L. braziliensis*.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos

Esse estudo dispensa aprovação de comitê de ética de pesquisa por ser realizado com dados presentes em repositórios públicos, previamente publicados, e macrófagos humanos de linhagem celular imortalizada (THP-1).

4.2 Análise Funcional

O conjunto de dados estão disponíveis nos bancos de dados GEO para acesso público (GSE# GSE162760) e (GSE# GSE127831) e consistem em transcriptomas de amostras de sangue total de 14 controles saudáveis e 50 pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* (Farias et al. 2021; Amorim et al, 2024) e transcriptomas de amostras de pele de 7 controles saudáveis e biópsias de lesões de 21 pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* (Amorim et al, 2019; Nascimento et al, 2021; Sacramento et al. 2023). A expressão gênica (log₂ expression) de CD39, CD73, receptores de adenosina (A2A e A2B) e genes de citocinas, quimiocinas, moléculas microbidas, receptores da resposta imune e moléculas associadas à sinalização purinérgica foram avaliados. Mapas de calor e clusters foram construídos, com auxílio do software GraphPad Prism.

4.3 Infecções *in vitro*

Promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/2003/M2904) expressando a proteína verde fluorescente GFP (abreviatura do inglês *green fluorescent protein*) foram cultivadas em meio de Grace (Sigma-Aldrich), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco - Life Technologies), 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (todos reagentes Sigma-Aldrich), a 26°C. Os parasitos foram cultivados em placas de 24 poços (Corning-Costar) por, no máximo, 6 passagens, sendo utilizados, nos experimentos, na fase estacionária do crescimento (6º dia de cultivo).

Células da linhagem imortalizada monocítica humana THP-1 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), suplementado com 50 µg/mL gentamicina, 2 mM L-glutamina e 10% de SFB (Gibco) inativado. As células THP-1 (1×10^6 células/mL) foram diferenciadas com 100 ng/mL de Phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA; Sigma-Aldrich) por 24 h, a 37 °C/5% CO₂, lavadas com meio RPMI suplementado, e permitidas descansar por adicionais 24 horas (dos Santos et al., 2017). As células THP-1 diferenciadas em macrófagos foram tratadas, ou não, com 10 µM de antagonista seletivo do receptor de adenosina A2A (ZM241385; Sigma-Aldrich) ou A2B (PSB-603; Sigma-Aldrich) e/ou Pentostatina (inibidor de ADA; Sigma-Aldrich), por 1 hora, infectadas com formas promastigotas de fase estacionária de *L. braziliensis*-GFP (MOI 5:1), por 24 h ou 48h, a 36 °C/5% CO₂. As taxas de infecção foram avaliadas por citometria de fluxo (BD Accuri C6). A porcentagem de macrófagos infectados (GFP+) e a média de intensidade de fluorescência do GFP (MFI) foram analisadas. A concentração e atividade de ADA foram avaliadas por Adenosine Deaminase (ADA) Activity Assay Kit (Elabscience) conforme orientação do fabricante.

4.4 Expressão de genes

Foi avaliada a expressão de mRNA para os receptores de adenosina A2A e A2B por PCR quantitativa em tempo real. Realizamos o isolamento de RNA total por coluna de sílica (Total RNA Purification Kit; Cellco Biotecnologia) conforme protocolo dos fabricantes e sintetizamos cDNA com iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Os primers utilizados foram: FH1_ADORA2A (GTGTCTATTTGCGGATCTTC Forward Human 1 ADORA2A), BH1_ADORA2A (AAGTGAAGCAGTTGAGATG Reverse Human 1 ADORA2A), FH1_ADORA2B (AAAGTCTGCCTTGTTTATGG Forward Human 1 ADORA2B), BH1_ADORA2B (AATTTTTGAGGTCACCTTCC Reverse Human 1 ADORA2B).

4.5 Avaliação da Resposta Imune

As produções de TNF, IL-6, IL-10 e IL-1β foram avaliadas por CBA (Cytometric Bead Array), utilizando o kit BD™ Human Inflammatory Cytokine, conforme protocolo do fabricante, 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. braziliensis*. A produção de espécies reativas de oxigênio 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, conforme protocolo do fabricante.

4.6 Análises Estatísticas

Os dados *in vitro* 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. Os dados de análise funcional foram apresentados em valores individuais e mediana e analisadas por teste de Mann Whitney; correlações entre os dados foram realizadas por teste de Spearman e apresentados por mapas de calor. A significância foi estabelecida em $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Lesões de pacientes com LC expressam níveis elevados de CD39, CD73 e receptor de adenosina A2A

Inicialmente avaliamos as expressões gênicas (*log2 expression*) das enzimas CD39 (hidrólise de ATP em AMP) e CD73 (hidrólise de AMP em adenosina), em transcriptoma de sangue total de 50 pacientes com LC causadas por *L. braziliensis* e de 14 controles saudáveis, e em biópsias de lesões de 21 pacientes com LC causadas por *L. braziliensis* e 7 amostras de pele de controles saudáveis. As expressões das enzimas CD39 e CD73 no sangue de pacientes com LC e de controles saudáveis não apresentaram diferença significativa, enquanto a expressão das mesmas enzimas nas lesões de pacientes com LC estavam aumentadas, comparada aos controles saudáveis (Figura 3), sugerindo fortemente o acúmulo de adenosina após a infecção no sítio de lesão.

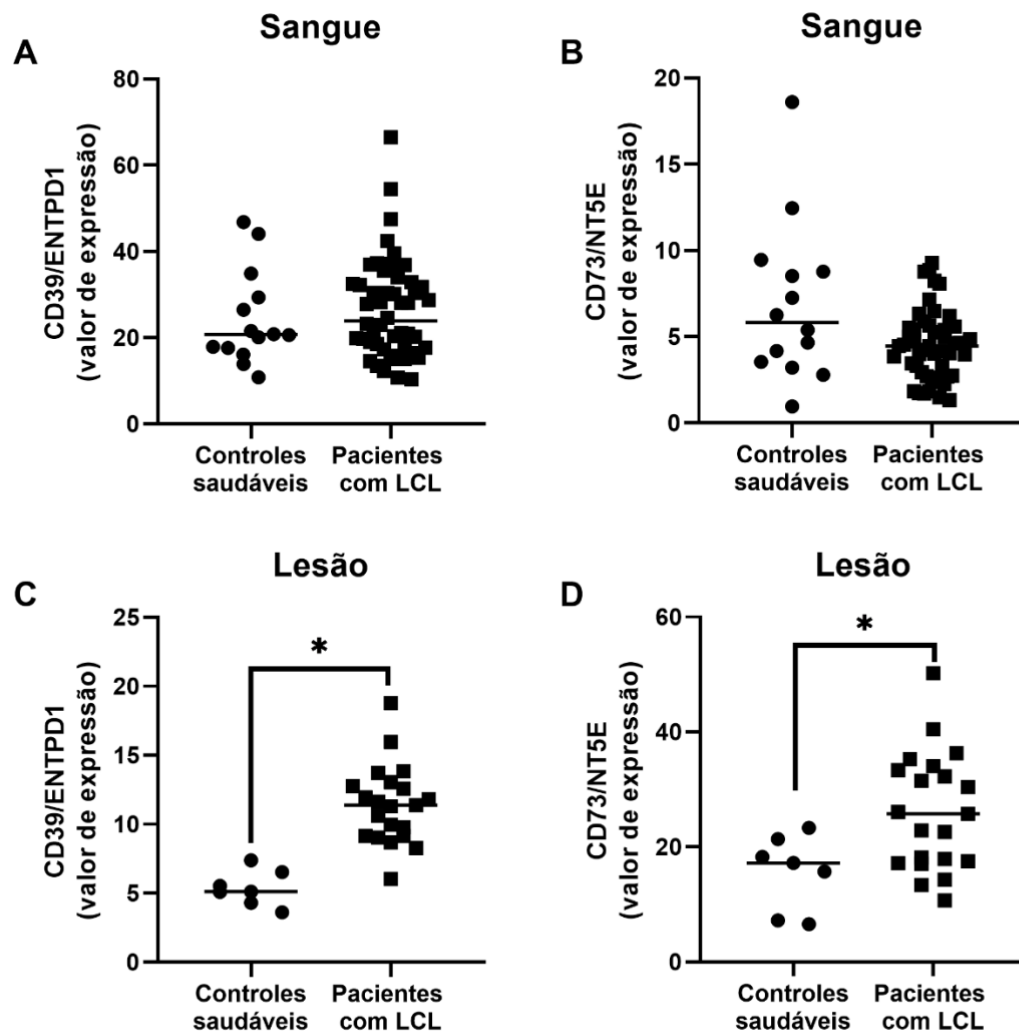


Figura 3. Expressão de mRNA das enzimas CD39 e CD73 no sangue e nas lesões de pacientes com leishmaniose cutânea e controles saudáveis. As expressões de CD39 e CD73 foram avaliadas em transcriptomas de sangue total (A e B) de 50 pacientes com LC e 14 controles saudáveis e nas lesões (C e D) de 21 pacientes com LC e 7 controles saudáveis disponíveis nos repositórios GEO (GSE162760) e GEO (GSE127831), respectivamente. Os dados são apresentados em valores individuais e mediana. * $p < 0,05$, pelo teste Mann-Whitney.

Também avaliamos a expressão dos dois principais receptores de adenosina, A2A (*ADORA2A*) e A2B (*ADORA2B*). Biópsias de lesões de pacientes com LC, causada por *L. braziliensis*, apresentam maior expressão de *ADORA2A* e menor expressão de *ADORA2B*, comparados aos controles saudáveis (Figura 4).

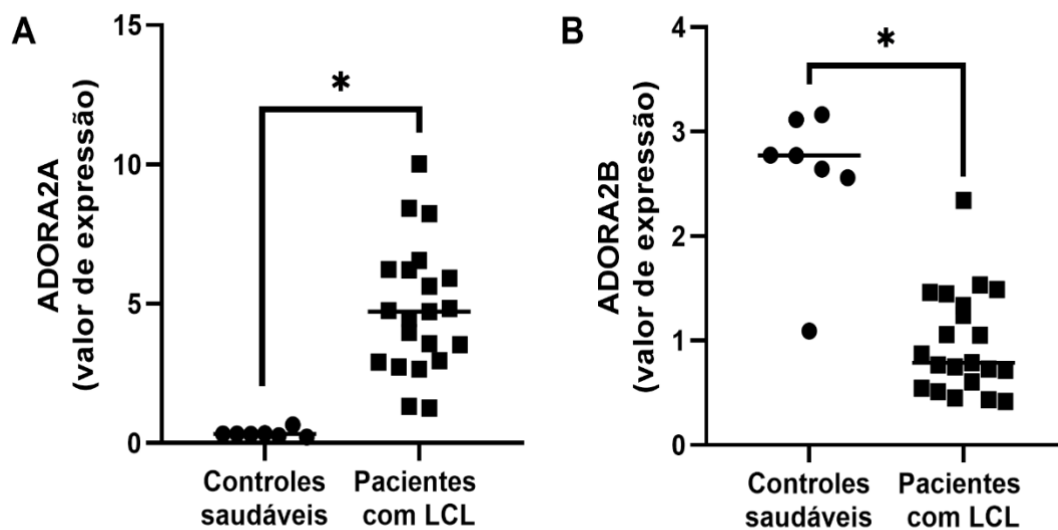


Figura 4. Expressão de mRNA dos receptores de adenosina em pacientes com leishmaniose cutânea e controles saudáveis. A expressão de (A) *ADORA2A* e (B) *ADORA2B* foram avaliadas em transcriptoma de biópsias de lesões de 21 pacientes com LC e 7 controles saudáveis, disponíveis no repositório GEO (GSE127831). Os dados são apresentados em valores individuais e mediana. * $p < 0,05$, pelo teste Mann-Whitney.

5.2 Correlação da expressão de receptores de adenosina A2A e A2B e moléculas envolvidas no processo inflamatório

Foram avaliadas as correlações dos receptores de adenosina A2A e A2B com citocinas e moléculas envolvidas no processo inflamatório (Figura 5). A expressão do receptor A2A, nas lesões de pacientes com LC, foi correlacionada positivamente com a expressão de IL1B ($r = 0,776$; $p = 3,47E^{-05}$), IL6 ($r = 0,655$; $p = 0,001$), IL10 ($r = 0,601$; $p = 0,003$), IL15 ($r = 0,466$; $p = 0,033$), IL32 ($r = 0,636$; $p = 0,001$), TGF β 1 ($r = 0,498$; $p = 0,021$) e NOS2 ($r = 0,537$; $p = 0,011$). Além disso, a expressão do receptor A2A, em pacientes com LC, foi negativamente correlacionada com ARG1 ($r = -0,711$; $p = 0,000$).

Curiosamente, enquanto houve correlações positivas do receptor A2A com IL1B, IL6 e IL32 e correlação negativa com ARG1, o inverso foi demonstrado nas correlações dessas citocinas com a expressão do receptor A2B. A expressão do receptor A2B foi negativamente correlacionada com a expressão de IL1B ($r = -0,520$, $p = 0,015$), IL6 ($r = -0,596$, $p = 0,004$) e IL32 ($r = -0,445$, $p = 0,0429$), e positivamente correlacionada com ARG1 ($r = 0,681$, $p = 0,000$). Esses dados sugerem que os receptores de adenosina A2A

e A2B, embora classicamente conhecidos como anti-inflamatórios, se comportam de forma diferente durante a infecção com *L. braziliensis*. O receptor A2A, cuja expressão é aumentada nos pacientes com LC, pode ter um efeito pró-inflamatório durante a infecção.

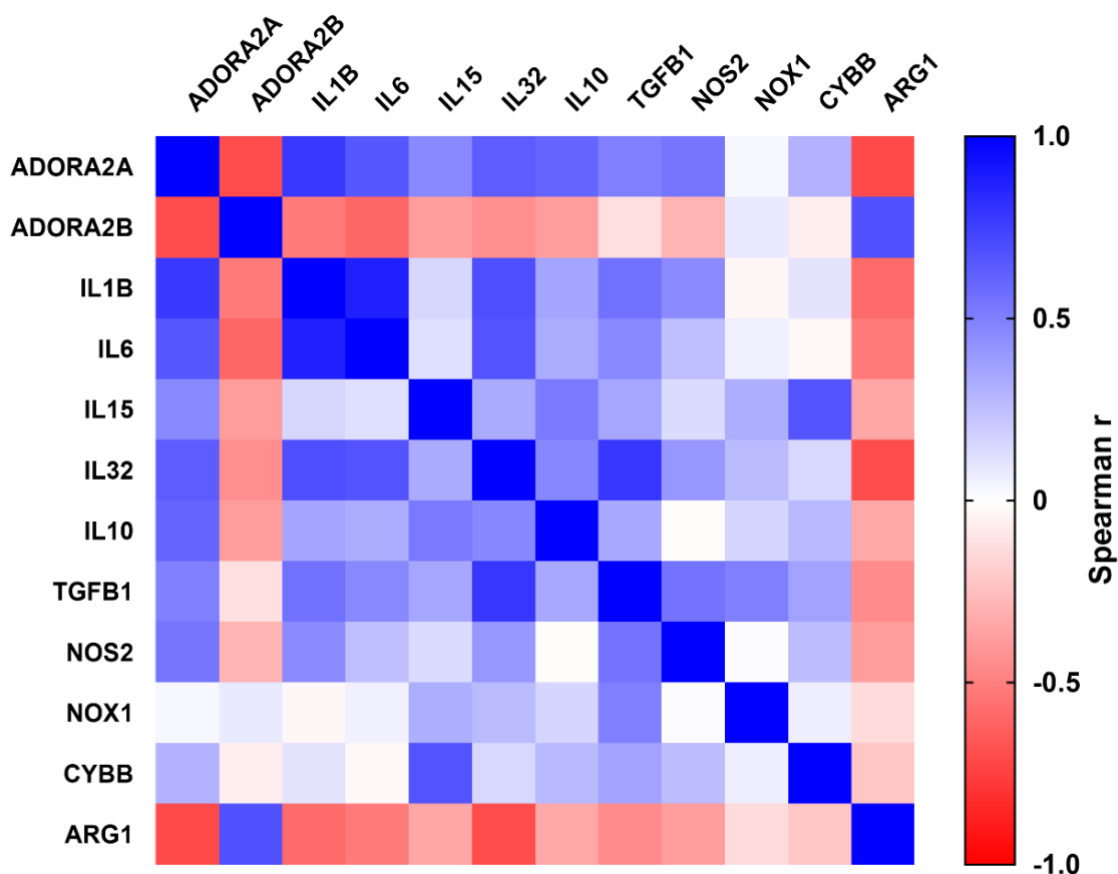


Figura 5. Correlação da expressão de receptores de adenosina A2A e A2B com moléculas envolvidas no processo inflamatório. A correlação (Spearman) de receptores de adenosina A2A e A2B e moléculas envolvidas no processo inflamatório e controle de leishmanioses foi avaliada em lesões de pacientes com leishmaniose cutânea. Os mapas de calor apresentam o valor de r (correlação de Spearman), entre -1 (vermelho) e +1 (azul).

5.3 Papel dos receptores de adenosina em macrófagos humanos infectados com *L. braziliensis*

Para avaliar o papel dos receptores de adenosina nas infecções in vitro com *L. braziliensis*, nós realizamos a infecção de macrófagos derivados da linhagem THP-1 e avaliamos a expressão dos receptores de adenosina. Assim como observado na análise de transcriptomas de lesões de pacientes com LC, a infecção de macrófagos humanos com

L. braziliensis aumenta a expressão do receptor A2A, mas não do receptor A2B (Figura 6).

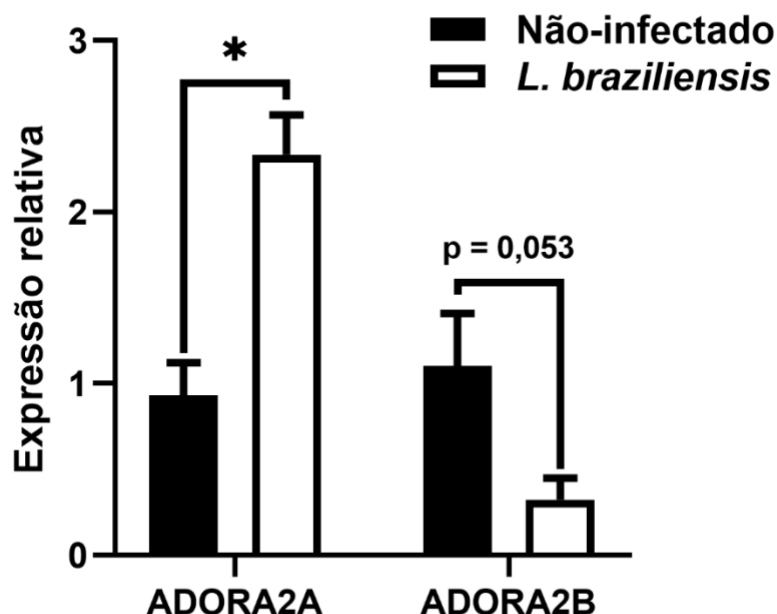


Figura 6. Expressão de mRNA dos receptores de adenosina em macrófagos humanos infectados com *Leishmania braziliensis*. As expressões de ADORA2A e ADORA2B foram avaliadas em macrófagos humanos infectados por *Leishmania braziliensis* por PCR em tempo real e avaliada pelo método 2^{-ddCt} . Os dados mostram média e desvio padrão de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$, por teste t de Student.

Nós decidimos avaliar, então, a infecção de macrófagos humanos THP-1 tratados, ou não, com antagonistas seletivos dos receptores A2A e A2B. As análises foram realizadas por citometria de fluxo, uma vez que utilizamos parasitos GFP+. Os tratamentos dos macrófagos com antagonistas seletivos dos receptores A2A (ZM241385) e A2B (PSB-603) não tiveram efeitos na porcentagem de células infectadas (GFP+; Figura 7A) e na intensidade média de fluorescência das células (MFI; Figura 7B), sugerindo que ambos não têm efeitos na capacidade de infecção de macrófagos humanos, mesmo que a expressão do receptor A2A esteja aumentada. A produção de espécies reativas de oxigênio foi avaliada e a presença dos mesmos antagonistas também não exerceu efeitos sobre este mecanismo microbicida nos macrófagos infectados com *L. braziliensis* (ROS; Figura 7C).

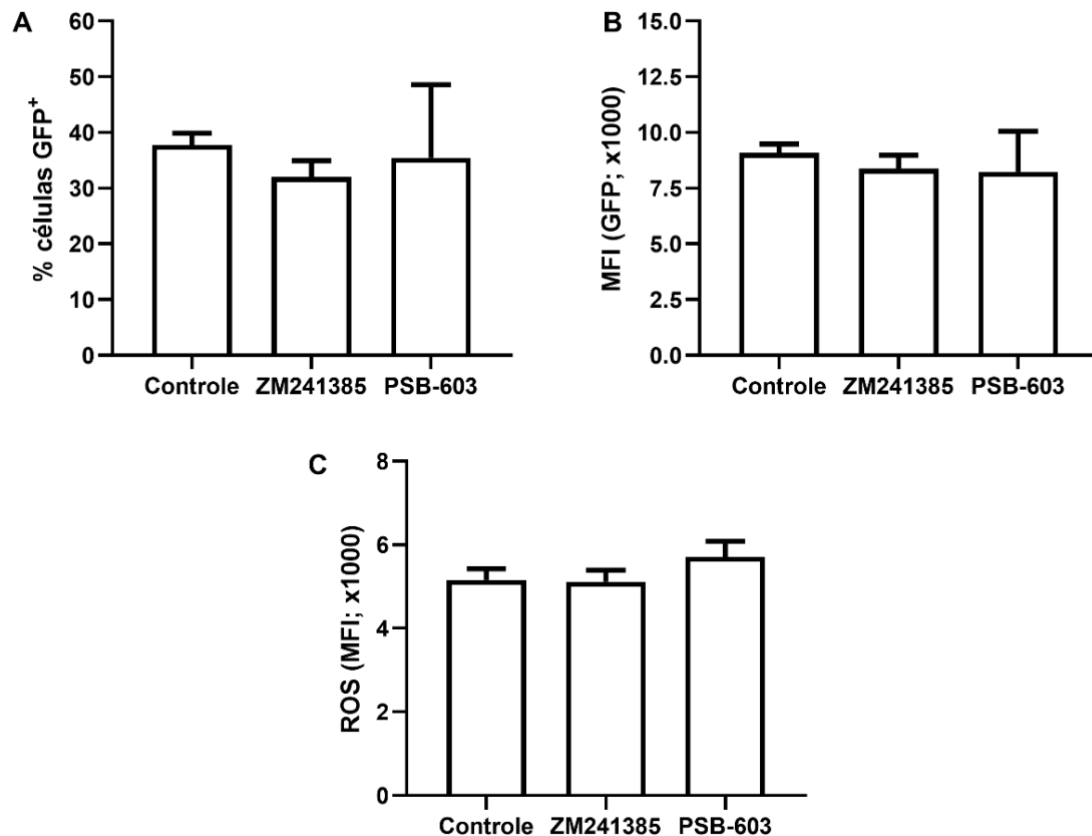


Figura 7. Efeitos da inibição de A2AR e A2BR nas taxas de parasitismo e na produção de ROS em macrófagos humanos infectados, *in vitro*, com *L. braziliensis*. Macrófagos humanos da linhagem THP-1 foram infectadas com *L. braziliensis*-GFP (MOI 5:1) por 24 e 48 horas, na presença ou ausência de antagonistas seletivos dos receptores A2A (10 μ M) e A2B (10 μ M). As taxas de infecção foram analisadas por citometria de fluxo. Os dados mostram média e desvio padrão de 4 experimentos independentes.

Para avaliar a resposta imune, foram medidas as produções das citocinas TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-10 em macrófagos humanos THP-1 infectados, ou não, com *L. braziliensis* e tratados, ou não, com antagonistas seletivos dos receptores A2A (ZM241385) e A2B (PSB-603). Os níveis de TNF (Figura 8A), IL-1 β (Figura 8B), IL-6 (Figura 8C) e IL-10 (Figura 8D) foram aumentados após infecção por *L. braziliensis*, mas nenhuma alteração foi observada após os tratamentos das células com antagonistas seletivos dos receptores A2A e A2B, sugerindo que a infecção por *L. braziliensis* induz a produção dessas citocinas, mas os receptores de adenosina não interferem na resposta imune de macrófagos humanos infectados.

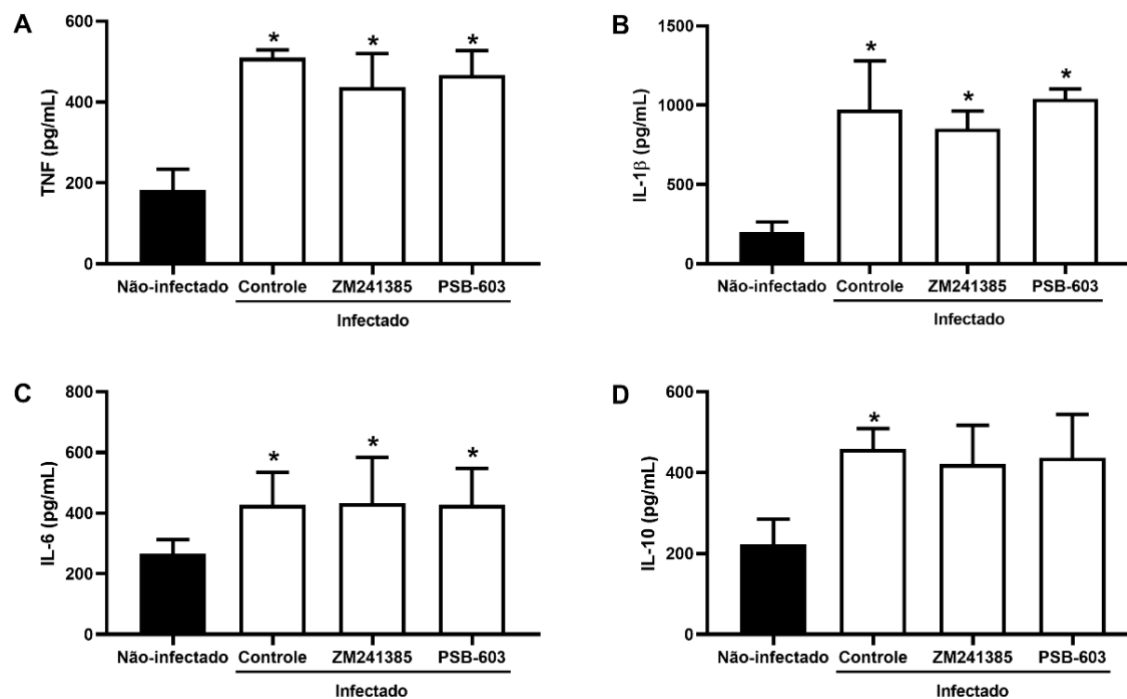


Figura 8. Quantificação das citocinas TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-10 em macrófagos humanos THP-1 infectados ou não, com *L. braziliensis* e tratados, ou não, com antagonistas seletivos dos receptores A2A e A2B. Macrófagos humanos da linhagem THP-1 foram infectadas com *L. braziliensis*-GFP (MOI 5:1) por 24 e 48 horas, na presença ou ausência de antagonistas seletivos dos receptores A2A (10 μ M) e A2B (10 μ M). As citocinas foram medidas e analisadas por CBA. Os dados mostram média e desvio padrão de 4 experimentos independentes. * $p < 0,05$, por teste t de Student.

Para confirmar que a adenosina/receptor de adenosina A2A não tem efeito nas infecções por *L. braziliensis*, nós infectamos macrófagos humanos na presença, ou ausência, de adenosina e, novamente, não encontramos alterações nas taxas de infecção de macrófagos (Figura 9).

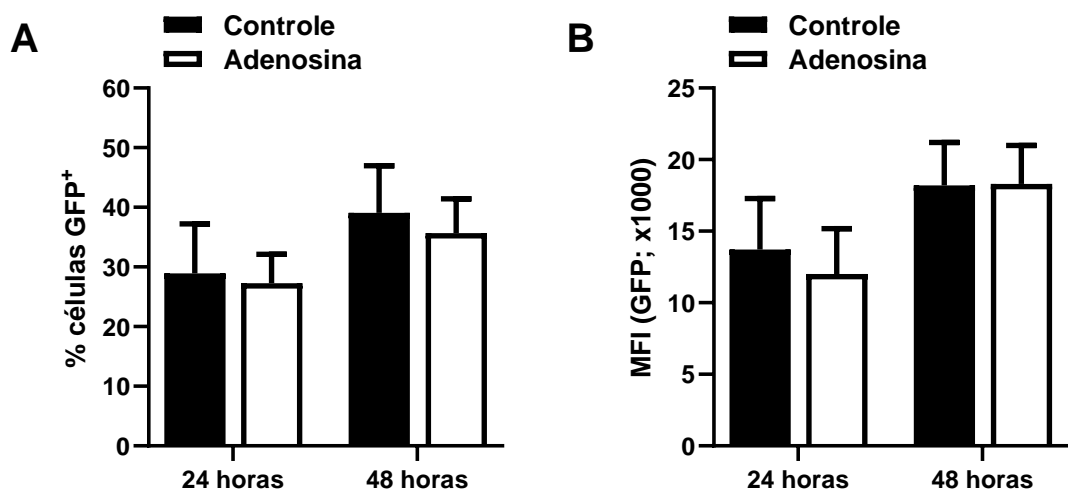


Figura 9. Efeitos da adenosina nas taxas de parasitismo de macrófagos humanos infectados, *in vitro*, com *L. braziliensis*. Macrófagos humanos da linhagem THP-1 foram infectadas com *L. braziliensis*-GFP (MOI 5:1) por 24 e 48 horas, na presença ou ausência de adenosina (50 μ M). As taxas de infecção foram analisadas por citometria de fluxo. Os dados mostram média e desvio padrão de 4 experimentos independentes.

Uma das possibilidades para a ausência de efeitos da adenosina/receptor A2A nas taxas de infecção de *L. braziliensis*, é que a adenosina esteja sendo convertida em inosina, pela ação da enzima adenosina deaminase (ADA). De fato, a concentração e atividade de ADA estão aumentadas em macrófagos THP-1 infectados com *L. braziliensis* (Figura 10).

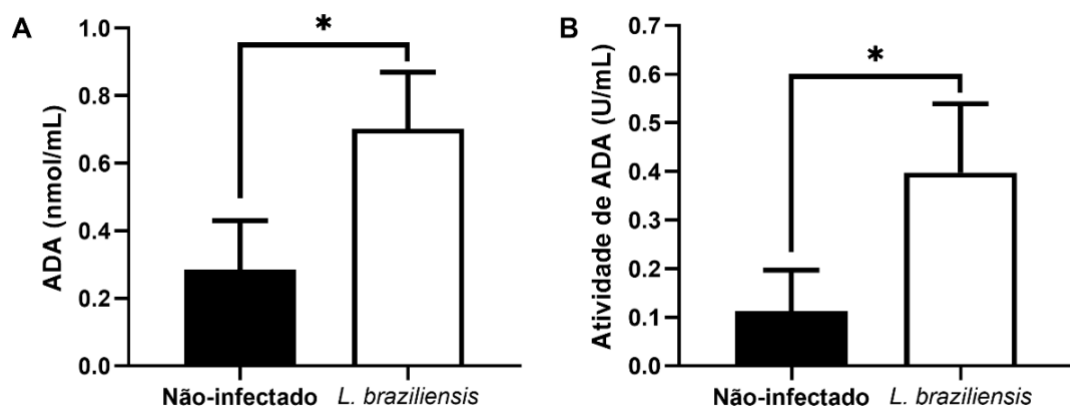


Figura 10. Concentração e atividade de ADA em macrófagos humanos infectados com *Leishmania braziliensis*. A (A) concentração e (B) atividade de ADA em macrófagos humanos infectados por *Leishmania braziliensis* foi avaliada por Adenosine Deaminase (ADA) Activity Assay Kit. Os dados mostram média e desvio padrão de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$, por teste t de Student.

Para confirmar que a atividade da ADA, que converte a adenosina em inosina, impede a ação da adenosina e do receptor A2A nas infecções de macrófagos humanos com *L. braziliensis*, nós realizamos a infecção das células na presença do inibidor farmacológico de ADA (pentostatina), e presença, ou ausência, do antagonista seletivo do receptor A2A (ZM241385). Quando a ADA está inibida (o que favorece o acúmulo de adenosina), a inibição do receptor A2A reduz as taxas de infecção de macrófagos humanos (Figura 11).

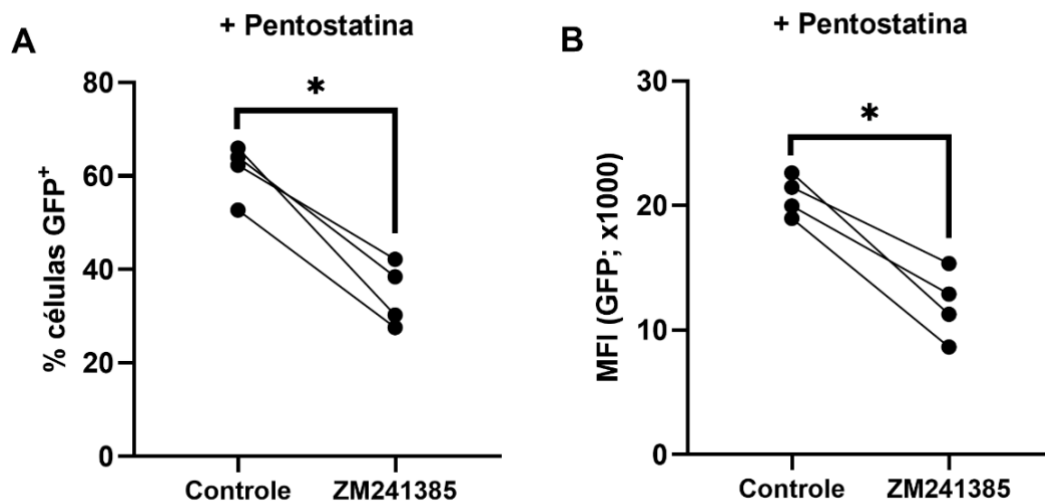


Figura 11. Efeitos do bloqueio de ADA e inibição de A2AR nas taxas de parasitismo de macrófagos humanos infectados, *in vitro*, com *L. braziliensis*. Macrófagos humanos da linhagem THP-1 foram infectadas com *L. braziliensis*-GFP (MOI 5:1) por 24 e 48 horas, na presença ou ausência de antagonista seletivo de A2AR (10 μ M) e presença de pentostatina (10 μ M), um inibidor de ADA. As taxas de infecção foram analisadas por citometria de fluxo. Os dados mostram média e desvio padrão de 4 experimentos independentes. * $p < 0,05$, por teste t de Student.

6 DISCUSSÃO

A atividade das enzimas CD39 e CD73 impacta na natureza química dos sinais purinérgicos, desempenhando, assim, um papel fundamental na regulação da duração e magnitude das respostas imunes, atuando na conversão de ADP/ATP em AMP e AMP em adenosina, respectivamente. Isso acarreta a modificação de um ambiente pró-inflamatório promovido por ATP para um ambiente anti-inflamatório impulsionado por adenosina (Antonioli et al., 2013). Nossos resultados demonstraram expressão gênica aumentada das enzimas CD39 e CD73 analisadas em transcriptomas de lesões de pacientes com LC causada por *L. braziliensis*, comparadas a controles saudáveis, sugerindo, assim, acúmulo de adenosina após a infecção no sítio de lesão. Um estudo anterior também observou aumento na expressão de CD39 e CD73 em células dendríticas murinas infectadas por *L. amazonensis* (Figueiredo et al., 2012). Além disso, já foi demonstrado que 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). No entanto o papel dessas enzimas em células humanas, em infecções por *L. braziliensis*, nunca foram relatadas anteriormente. Foram descritas alterações na função do CD39 em diferentes patologias, como na doença arterial coronariana (El-Omar et al, 2005), na infecção por HIV, que mostrou um aumento da atividade de CD39 em linfócitos de pacientes HIV-positivos (Leal et al, 2005), em pacientes com leucemia linfocítica crônica que apresentaram uma porcentagem maior de linfócitos T CD39 + comparados a controles saudáveis (Pulte et al, 2005) e também em associação com doenças como isquemia cerebral em modelos animais (Pinsky et al, 2002).

Um trabalho que avaliou neutrófilos estimulados in vitro, com *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, constatou que a cultura estimulada com *L. amazonensis* apresentou aumento da expressão de CD73. Por conta da atividade enzimática de CD73 em degradar AMP, poderia, assim, haver um aumento de adenosina, contribuindo para um ambiente menos pró-inflamatório durante a infecção por *L. amazonensis* em neutrófilos, comparada a infecção por *L. braziliensis*. Pelo fato de *L. amazonensis* apresentar maior atividade própria da enzima CD73, cria-se, então, uma interação com neutrófilos mais favorável ao parasito (Júnior, 2015). Macrófagos infectados com *L. amazonensis* aumentaram a expressão de CD73, diferentemente de macrófagos tratados com LPS. Notou-se também

que quando a atividade enzimática de CD73 foi bloqueada pelo sal de sódio β , γ -metilenoadenosina 5'-difosfato (APCP), a carga parasitária dos macrófagos apresentou significativa diminuição. Acompanhados, esses dados demonstram que *L. amazonensis* induz um fenótipo regulador em macrófagos, que ao ativar a via CD39/CD73 permite a sobrevivência do parasito (Luís et al., 2022). O acúmulo de adenosina em infecções humanas por *L. braziliensis* poderia influenciar na resposta imune e favorecer o estabelecimento da infecção.

Avaliamos a expressão dos receptores de adenosina A2A e A2B em transcriptomas de biópsias de lesões de pacientes com LC, causada por *L. braziliensis*, e observamos que houve maior expressão de ADORA2A e menor expressão de ADORA2B, comparados aos controles saudáveis. Para validar esses dados, procedemos com a infecção *in vitro* de macrófagos humanos THP-1 tratados, ou não, com antagonistas seletivos dos receptores A2A e A2B e, assim como observado na análise de transcriptomas de lesões de pacientes com LC, a infecção de macrófagos humanos com *L. braziliensis* aumenta a expressão do receptor A2A, mas não do receptor A2B. A resposta anti-inflamatória da adenosina ocorre por meio dos receptores do tipo A2 e esses efeitos ocorrem devido ao aumento de AMPc intracelular, inibição de citocinas pró-inflamatórias e alteração do equilíbrio Th1/Th2, induzindo uma resposta do tipo Th2 (Abbrachio & Ceruti, 2007). A ativação dos receptores de adenosina A2A e A2B aumentou a carga parasitária de *L. infantum* no interior dos macrófagos. Esses receptores podem ser ativados pela adenosina endógena transportada para fora dos macrófagos diferenciados de THP-1 através de transportadores de adenosina (possivelmente ENT1/2). Desta forma, os receptores de adenosina do tipo A2 e ENT podem se tornar promissores alvos terapêuticos para intervenções farmacológicas no tratamento da leishmaniose visceral. Se confirmado *in vivo*, abre-se a possibilidade do uso de antagonistas de receptores de adenosina A2 (pentoxifilina) e inibidores de transportadores de nucleosídeos (dipiridamol), já aprovados para tratar outras condições clínicas, para o tratamento também, desta doença (Silva, et al., 2020).

Um estudo demonstrou que a sinalização de A2AR é explorada por parasitas *L. infantum*, agente etiológico da leishmaniose visceral, para colonizar com sucesso o hospedeiro vertebrado. Camundongos com gene A2AR deletado exibiram uma reação celular bem desenvolvida com uma forte resposta imune Th1 nos órgãos parasitados, além de uma intensa infiltração de neutrófilos ativados nos órgãos-alvo da doença. Foi observado também que durante a cultura de células *ex vivo*, os esplenócitos A2AR $-/-$

produziram menores quantidades de IL-10. Este trabalho demonstrou que a via de sinalização A2AR é prejudicial ao desenvolvimento da imunidade adaptativa do tipo Th1 e que essa via pode estar associada ao processo regulatório (Lima et al., 2017).

Já foi descrito anteriormente que o bloqueio do receptor A2B com antagonista seletivo reduziu a sobrevivência de *L. amazonensis* no interior das células murinas estimuladas com IFN- γ e LPS (Gomes, 2015), e 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). Foi demonstrado por um estudo que durante a infecção por *L. amazonensis*, a expressão dos receptores P2Y2 e P2Y4 é regulada positivamente, sugerindo, junto com outros estudos, um papel significativo do parasito na regulação de diversos receptores envolvidos na sinalização purinérgica (Marques-da-Silva et al., 2011). Agonistas que têm como alvo os receptores de adenosina A1, A2A, A2B e A3 são potenciais opções de tratamentos eficientes para distintas patologias, a saber, doenças cardiovasculares, doenças autoimunes e câncer. Pelo fato de cada um desses receptores de adenosina desempenhar um papel distinto, obter agonistas de receptores altamente específicos é essencial. Apesar dos receptores de adenosina A2A e A2B compartilharem de muitas similaridades estruturais e de sequência, parecem diferir muito em suas respostas a estímulos inflamatórios (Jones et al., 2017).

Notavelmente, no entanto, nossos dados mostraram que o receptor A2A, ainda que aumentado, é positivamente correlacionado com citocinas e moléculas envolvidas na resposta imune pró-inflamatória em lesões de pacientes com LCL. Além disso, a inibição farmacológica desse receptor não alterou as taxas de infecção de macrófagos humanos infectados com *L. braziliensis*. Os níveis de TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-10 foram aumentados após infecção por *L. braziliensis*, mas nenhuma alteração foi observada após os tratamentos das células com antagonistas seletivos dos receptores A2A e A2B, sugerindo que a infecção por *L. braziliensis* altera a produção dessas citocinas, mas os receptores de adenosina não interferem nesse mecanismo imune. A fim de caracterizar diferenças no perfil de citocinas e quimiocinas produzido por macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, um trabalho procedeu com a dosagem de citocinas e quimiocinas nos sobrenadantes dos macrófagos infectados e avaliou sua expressão gênica. Foram observados níveis mais altos de citocinas e quimiocinas nas culturas infectadas com *L. braziliensis* em comparação às infectadas com *L. amazonensis*. Além disso, nas culturas infectadas por *L. braziliensis* também houve aumento significativo da expressão gênica das citocinas IL-1B1, IL-6, G-CSF e da enzima iNOS, além do aumento

sugestivo da expressão da citocina IL-10, da quimiocina CCL3 e dos receptores de quimiocinas CCR2 e CCR5. Desta forma, conclui-se então que a infecção por *L. braziliensis* modulou uma resposta predominantemente pró-inflamatória, enquanto que na infecção por *L. amazonensis* não foi observada alteração na expressão dos genes alvos da pesquisa em relação às culturas controle (Machado, 2014).

Foram analisadas, anteriormente, a expressão de citocinas em camundongos com linhagens suscetíveis e resistentes à infecção por *L. amazonensis*, e observou-se que em camundongos suscetíveis, na lesão primária e no fígado, houve aumento das expressões de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF e IFN β e da indução de iNOS, níveis estes associados a maior destruição tecidual observada, enquanto níveis elevados de TGF- β estariam associados a desativação do macrófago e consequente estabelecimento do parasito na fase inicial da infecção. Os camundongos resistentes à infecção por *L. amazonensis* apresentaram níveis de expressão de citocinas diminuídos em todos os órgãos analisados (Cardoso, 2012). Outro trabalho quantificou as citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17 em pacientes com leishmaniose visceral causada por *L. danovani*, antes e depois do tratamento. Nos pacientes, antes do tratamento, foram observados aumento nos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-17 e IFN- γ e uma produção mais alta também de IL-6 e IL-10 em relação aos indivíduos controles, todas com diminuição após o tratamento. (Carvalho, 2016).

Sabe-se que agonistas do receptor de adenosina podem regular negativamente a produção de TNF- α por monócitos do sangue periférico humano ativados por LPS, e que esse efeito é mediado principalmente por receptores A2A. Desta forma, agonistas seletivos do receptor de adenosina A2A têm potencial de representar uma abordagem terapêutica atraente para diferentes doenças inflamatórias (Zhang et al., 2005). Para compreender os efeitos da inibição dos receptores de adenosina no controle da infecção por moléculas tóxicas ao parasito, foi realizada a dosagem de ROS. A produção de espécies reativas de oxigênio foi avaliada e ficou demonstrado que a presença dos mesmos antagonistas também não exerceu efeitos sobre este mecanismo microbicida nos macrófagos infectados com *L. braziliensis*. Já é bem fundamentado na literatura que a produção de ROS gerada pela ativação do macrófago é bem eficaz para a eliminação de *Leishmania* spp., pelo fato de ser altamente tóxico para o parasito (Liew et al, 1990; Murray, 1982). Além disso, o ROS exerce um importante papel na regulação da resposta inflamatória, através da mediação da apoptose de neutrófilos em resposta a infecções (Carneiro et al., 2018). Um estudo anterior, que observou células infectadas com *L.*

amazonensis, constatou que estas liberam menores quantidades de ROS, o que poderia explicar a dificuldade de eliminação do parasito (Almeida et al., 2012).

Para confirmar que a adenosina/receptor de adenosina A2A não tem efeito nas infecções por *L. braziliensis*, nós infectamos macrófagos humanos na presença, ou ausência, de adenosina e, novamente, não encontramos alterações nas taxas de infecção de macrófagos. Um estudo observou que camundongos BALB/c, altamente suscetíveis, tornaram-se resistentes à infecção por *L. infantum* na ausência de A2AR (A2AR^{-/-}), demonstrado por pouca quantidade de parasitos no baço e fígado. A resistência nesses animais foi relacionada ao predomínio de uma resposta Th1, caracterizada pelo aumento de células TCD4⁺ produtoras de IFN- γ e expressão de iNOS nos órgãos-alvo da leishmaniose visceral (Lima, 2015).

Uma das possibilidades para a ausência de efeitos da adenosina/receptor A2A nas taxas de infecção de *L. braziliensis*, é que a adenosina esteja sendo convertida em inosina, pela ação da enzima adenosina deaminase (ADA). Verificamos então a expressão de ADA e notamos que de fato a ADA está aumentada em macrófagos THP-1 infectados com *L. braziliensis*. Para confirmar que a atividade da ADA, que converte a adenosina em inosina, impede a ação da adenosina e do receptor A2A nas infecções de macrófagos humanos com *L. braziliensis*, nós realizamos a infecção das células na presença do inibidor farmacológico de ADA (pentostatina), e presença, ou ausência, do antagonista seletivo do receptor A2A (ZM241385). Nós constatamos que quando a ADA está inibida (o que favorece o acúmulo de adenosina, impedindo a conversão de adenosina em inosina), a inibição do receptor A2A reduz as taxas de infecção de macrófagos humanos. A adenosina deaminase é um nucleosídeo que pertence a um grupo de enzimas que atuam no metabolismo das purinas e que está presente nos tecidos humanos, principalmente no citoplasma e na membrana celular. Destaca-se sua relevante função na proliferação e diferenciação de linfócitos e na maturação dos monócitos. A isoenzima ADA2 (sérica) também está presente nos monócitos e nos macrófagos, hipotetizando que altos níveis dessa isoenzima pode ser resultado de sua liberação pelo sistema monocítico-macrofágico em doenças causadas por patógenos intracelulares (Mahylowski et al., 2011).

Corroborando nosso resultado, um estudo realizado para avaliar a atividade da enzima adenosina deaminase em pacientes recém diagnosticados com LC em comparação com controles saudáveis, verificou uma maior atividade da enzima no sangue de pacientes diagnosticados com LC e uma diminuição gradual dos níveis enzimáticos ao longo do período de acompanhamento pós-tratamento (Espino, 2024). Outro trabalho que

determinou os níveis de ADA e suas isoenzimas (ADA1, ADA1-CD26 e ADA2) em plasma de pacientes acometidos por LV constatou que a ADA está significativamente aumentada na LV. Este aumento é verificado em ambas isoenzimas, porém a ADA2 prevalece em pacientes acometidos por LV. A verificação de ADA pode ser utilizada como um marcador da resposta inflamatória na LV, e a determinação da isoenzima ADA2, é importante para avaliar a ativação ou participação de monócitos e macrófagos durante a infecção (Cavalcante, 2014).

Pesquisadores avaliaram a atividade das enzimas CD73 e ADA em plaquetas de camundongos infectados experimentalmente pelo protozoário *Trypanosoma evansi*. Os ratos foram divididos em grupos que correspondiam ao tempo de infecção e se averiguou que os animais que estavam no início da infecção e com alta parasitemia apresentaram uma diminuição significativa na atividade das enzimas CD73 e ADA, se comparados aos controles saudáveis. Em camundongos com infecção crônica, foi constatado aumento da atividade enzimática, observada pela hidrólise de ADP e AMP (Oliveira, 2010). A atividade de ADA no soro e nos linfócitos também foram avaliadas em ratos infectados por *Sporothrix schenckii* e observou-se que na fase aguda houve uma diminuição na atividade de ADA. Com a cronicidade da infecção, observou-se um aumento na atividade enzimática. Assim, sugeriu-se que a infecção pelo *S. schenckii* altera as atividades de ADA no soro e nos linfócitos de ratos infectados, influenciando na patogênese da esporotricose e explicitando que esta enzima se comporta de forma diferente nas infecções de diversos agentes etiológicos (Castro, 2011).

A atividade elevada da ADA pode refletir uma tentativa do sistema imune em controlar a infecção, mas também pode estar associada à exacerbação inflamatória. A atividade da ADA pode desempenhar um papel crítico na regulação da resposta imune celular. Essa regulação pode influenciar o equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias e devem ser estudadas mais profundamente.

7 CONCLUSÕES

A expressão do receptor de adenosina A2A está aumentada em lesões de pacientes com LCL, mas, ao contrário do esperado, esse receptor é correlacionado positivamente com uma resposta pró-inflamatória nas lesões dos pacientes. A infecção de macrófagos humanos por *L. braziliensis* aumenta a expressão do receptor de adenosina A2A, mas, também, da enzima adenosina deaminase (ADA). O uso de antagonistas específicos para receptores de adenosina, como o ZM241385 (para A2A) e o PSB-603 (para A2B), não exercem efeitos na capacidade de infecção de macrófagos humanos, embora a expressão do receptor A2A esteja aumentada, e tampouco alteram a produção de ROS. A infecção por *L. braziliensis* aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1 β e IL-6, mas o tratamento com antagonistas seletivos dos receptores de adenosina, não apresentou efeito na produção destas. Dados preliminares sugerem que a conversão de adenosina em inosina, pela ADA, impede que a adenosina tenha efeitos na resposta imune e sobrevivência de *L. braziliensis*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abadías G, Diago A, Cerro PA, Palma RAM, Gilaberte, E. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Actas Dermo Sifiliograficas 112*: 601-618, 2021.

Abbracchio MP, Burnstock G. Purinergic Signaling: Pathophysiological Roles. *Jpn J Pharmacol. 778*: 113-145, 1998

Abbracchio MP, Ceruti S. P1 Receptors and cytokine secretion. *Purinergic Signalling 3*: 13-25, 2007.

Alexander J, Russell DG. The interaction of leishmania species with macrophages. *Adv.Parasitol. 31*: 175-254, 1992.

Amorim CF, Novais FO, Nguyen BT, Misic AM, Carvalho LP, Carvalho EM, Beiting DP, Scott F. Variable gene expression and parasite load predict treatment outcome in cutaneous leishmaniasis. *Sci Transl Med*: Nov 20;11(519), 2019.

Amorim CF, Novais FO, Nguyen BT, Nascimento MT. Localized skin inflammation during cutaneous leishmaniasis drives a chronic, systemic IFN- γ signature. *PLoS Negl Trop Dis*: Apr;15(4): e0009321, 2021.

Antonioli L, Colucci R, La Motta C, Tuccori M, Awwad O, Settimo F, Blandizzi C, Fornai M. Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders. *Curr Drug Targets*: 842-62, 2012.

Antonioli L, Pacher P, Vizi, ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in Molecular Medicine, 19*: 355-367, 2013.

Atkinson B, Dwyer K, Enyoloji K, Robson SC. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. *Blood Cells Mol Dis.*, 36(2): 217-22, 2006.

Awasthi A, Kumar MR, Saha B. Immune response to leishmania infection. *Indian J. Med. Res.* 119: 238–258, 2004.

Bajracharya B, Gonçalves R, Afonso LCC, Shrestha D, Talvani A. Ecto-5' nucleotidase/CD73 medeia a sobrevivência de *Leishmania amazonensis* em macrófagos. *BioMed Research International*. 10.1155/9928362, 2022.

Barral A, Costa JML, Bittencourt AL, Barral M, Carvalho, EM. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: Clinical and immunopathologic aspects. *International Journal of Dermatology*, 34: 474-479, 1995.

Basano SA, Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 7: 328-337, 2004.

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.

Brittingham A, Chen G, Mcgwire BS, Chang KP, Mosser DM. Interaction of leishmania Gp63 with cellular receptors for fibronectin. *Infect. Immun.* 67: 4477-4484, 1999.

Buates S, Matlashewski G. General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection. *J. Immunol.* 166: 3416-3422. 2001.

Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *The Lancet* 392: 951–970, 2018.

Cardoso FO. Infecção por *Leishmania amazonensis* em camundongos sensíveis e resistentes. Alterações na matriz celular, perfil de citocinas e caracterização do infiltrado inflamatório. Rio de Janeiro [Tese de doutorado em biologia parasitária- Instituto Oswaldo Cruz], 2012.

Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 56: 315-325, 1994.

Carvalho FCT. Perfil de citocinas do padrão Th1, Th2, Th17 e o estado redox de indivíduos com leishmaniose visceral pré e pós tratamento. Botucatu [Dissertação de mestrado em medicina tropical- UNESP], 2016.

Carvalho LCF. Efeito de ectonucleotidases de *Leishmania* sobre a produção de IL-1 β em células dendríticas. Ouro Preto [Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas - UFOP], 2018.

Castro RAO. População leucocitária e expressão de CD39 e CD73 durante o curso da infecção por *Leishmania amazonensis*. Ouro Preto [Tese de Doutorado em Ciências Biológicas - UFOP], 2019.

Castro VS. Atividade da adenosina desaminase no soro e nos linfócitos de ratos infectados por *Sporothrix schenckii*. Santa Maria [Dissertação de mestrado em medicina veterinária- UFSM], 2011.

Cavalcante, IJM. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral no Brasil de 2001 a 2011, no estado do Ceará de 2007 a 2011 e perfil da adenosina desaminase em pacientes acometidos pela doença. Fortaleza [Tese de doutorado em Farmacologia- UFC], 2014.

Charpentier T, Hammami A, Stäger S. Hypoxia inducible factor 1 α : A critical factor for the immune response to pathogens and Leishmania. *Cellular Immunology*, 309: 42-49, 2016.

Chaussabel D, Semnani RT, McDowell MA, Sacks D, Sher A, Nutman TB. Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites. *Blood* 102: 672-681, 2003.

Convit J, Pinardi ME, Rondon AJ. Diffuse Cutaneous Leishmaniasis: A disease due to an immunological defect of the host. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 66: 603-610, 1972.

Costa JM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, Rosa AC, Cuba CC, Magalhaes AV, Barreto AC. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: A Report Of Eight Cases. *J.Trop.Med.Hyg.* 89: 319-323, 1986.

Csoka B, Nemeth ZH, Selmeczy Z, Koscsó B, Pacher P, Vizi ES, Deitch EA, Haskó G. Role Of A(2a) Adenosine receptors in regulation of opsonized *E. Coli* induced macrophage function. *Purinergic.Signal.* 3: 447- 452, 2007.

Desjardins M, Descoteaux A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the leishmania lipophosphoglycan. *J.Exp.Med.* 185: 2061-2068, 1997.

Edwards CK, Watts LM, Parmely MJ, Linnik MD, Long RE, Borchering DR. Effect of the carbocyclic nucleoside analogue Mdl 201,112 on inhibition of interferon-gamma-induced priming of lewis (Lew/N) rat macrophages for enhanced respiratory burst and mhc class II Ia+ antigen expression. *J. Leukoc. Biol.* 56: 133-144, 1994.

Espino, JJM. Avaliação da atividade da enzima adenosina deaminase em pacientes com leishmaniose cutânea. Brasília [Dissertação de mestrado em Medicina Tropical- UNB], 2024.

Faleiro RJ, Kumar R, Hafner LM, Engwerda CR. Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. *Plos Negl. Trop. Dis.* 8: e2914, 2014.

Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, Panther E, Di Virgilio F. The P2x7 receptor: A key player in IL-1 processing and release. *J. Immunol.* 176: 3877-3883, 2006.

Fietto JL, Demarco R, Nascimento IP, Castro IM, Carvalho TM, De SW, Bahia MT, Alves MJ, Verjovski AS. Characterization and immunolocalization of an Ntp diphosphohydrolase of *Trypanosoma Cruzi*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 316: 454-460, 2004.

Follador I, Araújo C, Bacellar O, Araújo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho, EM. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 34: 54–58, 2002.

Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev.* 46: 143-156, 1994.

Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Müller CE. International union of basic and clinical pharmacology. Nomenclature and classification of adenosine receptors - An update. *Pharmacological Reviews*, 63: 1-34, 2011.

Galdino H, Maldaner AE, Pessoni LL, Soriani FM, Pereira, LIA., Pinto, SA, Duarte, FB, Gomes, CM, Fleuri, AKA, Dorta, ML, de Oliveira MAP, Teixeira MM, Batista AC, Joosten LAB, Vieira LQ, Dias, FR. Interleukin 32 γ (IL-32 γ) is highly expressed in cutaneous and mucosal lesions of american tegumentary leishmaniasis patients: association with tumor necrosis factor (TNF) and IL-10. *BMC Infect. Dis.* 14: 249, 2014.

Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Current Opinion in Immunology*: 13: 114–119, 2001.

Galvao CE, Silva AC, Saldanha AC, Silva CM, Costa MR, Costa JM. Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania Viannia Braziliensis* in the state of Maranhão, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*: 26, 121-123, 1993.

Geoffrey Burnstock, Timothy R Arnett, Isabel R Orriss. Purinergic signalling in the musculoskeletal system. *Purinergic Signal.*: 541-72, 2013.

Ghosh K, Sharma G, Saha A, Kar S, Das PK, Ukil A. Successful therapy of visceral leishmaniasis with curdlan involves T-Helper 17 cytokines. *J. Infect. Dis.* 207: 1016–1025, 2013.

Glaser TA, Moody SF, Handman E, Bacic A, Spithill TW. An antigenically distinct lipophosphoglycan on amastigotes of *Leishmania Major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 45: 337-344, 1991.

Gomes RS, Silva MVT, Santos JC, Silva LL, Batista AC, Machado JR, Teixeira MM, Dorta ML, Oliveira MAP, Dinarello CA, Joosten LAB, Dias FR. IL-32 γ promotes the healing of murine cutaneous lesions caused by *Leishmania braziliensis* infection in contrast to *Leishmania amazonensis*. *Parasites and Vectors*, 10: 1-7, 2017.

Gorak PM, Engwerda CR, Kaye PM. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *Eur. J. Immunol.* 28: 687–695, 1998.

Goto H, Prianti MG. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 51: 241-246, 2009.

Green LC, Luzuriaga KR, Wagner DA, Rand W, Istfan N, Young VR, Tannenbaum, SR. Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78: 7764-7768, 1981.

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.

Gregory DJ, Olivier M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. *Parasitology* 130 Suppl: S27-S35, 2005.

Guy RA, Belosevic M. Comparison of receptors required for entry of *Leishmania Major* amastigotes into macrophages. *Infect.Immun.* 61: 1553-1558, 1993.

Handa M, Guidotti G. Purification and cloning of a soluble atp- diphosphohydrolase (Apyrase) from potato tubers (*Solanum Tuberosum*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218: 916-923, 1996.

Hasko G, Kuhel DG, Chen JF, Schwarzschild MA, Deitch EA, Mabley JG, Marton A, Szabo C. Adenosine inhibits Il-12 and Tnf-[Alpha] production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *Faseb J.* 14: 2065-2074, 2000.

Hasko G, Pacher P. Regulation of macrophage function by adenosine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32: 865-869, 2012.

Huang Z, Xie N, Illes P, Di Virgilio F, Ulrich H, Semyanov A, Verkhatsky A, Sperlagh B, Yu SG, Huang C, Tang Y. From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6: 162, 2021.

Jones KR, Choi U, Gao JL, Thompson RD, Rodman LE, Malech HL, Elizabeth MK. A novel method for screening adenosine receptor specific agonists for use in adenosine drug development. *Scientific Reports*, vol, 7: 44816, 2017.

Jorens PG, Matthys KE, Bult H. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages. *Mediators Inflamm.* 4: 75-89, 1995.

Júnior OAOM. Avaliação do efeito de receptores purinérgicos em neutrófilos cultivados in vitro com formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis*. Belo Horizonte [Dissertação de mestrado em Biologia Celular - UFMG], 2015.

Kane MM, Mosser DM. Leishmania parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr. Opin. Hematol.* 7: 26-31, 2000.

Kara FM, Chitu V, Sloane J, Axelrod M, Fredholm BB, Stanley ER, Cronstein BN. Adenosine A1 receptors (A1rs) play a critical role in osteoclast formation and function. *Faseb J.* 24: 2325-2333, 2010.

Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.* 9: 604–615, 2011.

Kima PE, Constant SL, Hannum L, Colmenares M, Lee KS, Haberman AM, Shlomchik MJ; McMahon-Pratt D. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.* 191: 1063-1068, 2000.

Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem. J.* 420: 1-16, 2009.

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.

Langston HP, Ke Y, 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.

Lappas CM, Rieger JM, Linden J. A2a Adenosine receptor induction inhibits Ifn-gamma production in murine Cd4+ T Cells. *J. Immunol.* 174: 1073-1080, 2005.

Leite PM, Gomes RS, Figueiredo AB, Serafim TD, Tafuri WL, De Souza CC, Moura SA, Fietto JL, Melo MN, Ribeiro-Dias F, Oliveira MA, Rabello, Afonso LC. Ecto-nucleotidase activities of promastigotes from *Leishmania (Viannia) Braziliensis* relates to parasite infectivity and disease clinical outcome. *Plos. Negl. Trop. Dis.* 6: E1850, 2012.

Leopoldo PT, Machado PR, Almeida RP, Schriefer A, Giudice A, De Jesus AR, Ho JL, Guimaraes LH, Bacellar O, Carvalho EM. Differential effects of antigens from *L. Braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. *Bmc. Infect. Dis.* 6: 75-80, 2006.

Lepoivre M, Flaman JM, Bobe P, Lemaire G, Henry Y. Quenching of the tyrosyl free radical of ribonucleotide reductase by nitric oxide. Relationship to cytoxicity induced in tumor cells by cytotoxic macrophages. *J. Biol. Chem.* 269: 21891-21897, 1994.

Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RM, Moncada S. Macrophage killing of leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-Arginine. *J. Immunol.* 144: 4794-4797, 1990.

Lima MHF. Papel do receptor de adenosina A2A (A2AR) no controle da resposta inflamatória durante a infecção experimental por *Leishmania infantum*. Ribeirão Preto [Dissertação de mestrado- USP], 2015.

Lima MHF, Sacramento LA, Quirino GFS, Ferreira MD, Benevides L, Santana AKM, Cunha FQ, Almeida RP, Silva JS, Carregaro V. *Leishmania infantum* parasites subvert the host inflammatory response through the adenosine A2A receptor to promote the establishment of infection. *Front. Immunol.*, 19 vol. 8 - 10.3389, 2017.

Love DC, Mentink KM, Mosser DM. *Leishmania amazonensis*: The phagocytosis of amastigotes by macrophages. *Exp. Parasitol.* 88: 161-171, 1998.

Machado MM. Análise de diferentes cepas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* quanto a infectividade/virulência e perfil de citocinas e quimiocinas produzidas por macrófagos murinos infectados. Rio de Janeiro [Dissertação de mestrado em biologia parasitária- Instituto Oswaldo Cruz], 2011.

Maioli TU, Takane E, Arantes RM, Fietto JL, Afonso LC. Immune response induced by new world leishmania species in C57bl/6 mice. *Parasitol.Res.* 94: 207-212, 2004.

Marr JJ, Berens RL, Nelson DJ. Purine metabolism in *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis*. *Biochim. Biophys. Acta* 544: 360-371, 1978.

Marzochi MCA. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. *Jornal Brasileiro de Medicina*, 63: 82-104, 1992.

Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. *Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis*. Brasil, 2003.

Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. *Departamento de Vigilância Epidemiológica*. Brasil, 2003.

Moody SF, Handman E, Bacic A. Structure and antigenicity of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* amastigotes. *Glycobiology* 1: 419-424, 1991.

Mosser DM, Edelson PJ. The Mouse macrophage receptor for C3bi (Cr3) is a major mechanism in the phagocytosis of leishmania promastigotes. *J. Immunol.* 135: 2785-2789, 1985.

Mosser DM, Rosenthal LA. Leishmania macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin. Cell Biol.* 4: 315-322, 1993.

Mosser DM, Vlassara H, Edelson PJ, Cerami A. Leishmania promastigotes are recognized by the macrophage receptor for advanced glycosylation endproducts. *J. Exp. Med.* 165: 140-145, 1987.

Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A, Brodskyn C, Oliveira, CI. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infection and Immunity*, 73: 5827-5834, 2005.

Murray HW. Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J. Immunol.* 129: 351-357, 1982.

Nascimento MT, Franca M, Carvalho AM, Amorim CF et al. Inhibition of gamma-secretase activity without interfering in notch signalling decreases inflammatory response in patients with cutaneous leishmaniasis. *Emerg Microbes Infect.* Dec;10 (1): 1219-1226, 2021.

Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell* 78: 915-918, 1994.

Neves LO, Talhari AC, Gadelha EPN, Silva Júnior RM, Guerra JA, Ferreira LCL, Talhari S. 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 RA. Molecular physiology of P2x receptors. *Physiol. Rev.* 82: 1013-1067, 2002.

Oliveira CB. Atividade das enzimas ntpdase, 5'-nucleotidase e adenosina deaminase em plaquetas de ratos infectados por *Trypanosoma evansi*. Santa Maria [Dissertação de mestrado em medicina veterinária- UFSM], 2010.

Oliveira WN, Ribeiro LE, Schrieffer A, Machado P, Carvalho E M, Bacellar O. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine*, 66: 127-132, 2014.

Oryan A, Akbari M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9: 925–932, 2016.

Oshiro, F. P. *Leishmania amazonensis* induz a liberação de IL- 1 β ao interferir no sistema de sinalização purinérgica de macrófagos. Ouro Preto [Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas - UFOP], 2019.

Panther E, Corinti S, Idzko M, Herouy Y, Napp M, Girolomoni G, Norgauer J. Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic. *Cells. Blood* 101: 3985-3990, 2003.

Peters C, Aebischer T, Stierhof YD, Fuchs M, Overath P. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *leishmania mexicana amastigotes*. *J. Cell Sci.* 108: 3715-3724, 1995.

Piani A, Ilg T, Elefanty AG, Curtis J, Handman E. *Leishmania major* proteophosphoglycan is expressed by amastigotes and has an immunomodulatory effect on macrophage function. *Microbes Infect.* 1: 589–599, 1999.

Pimenta PF, Turco SJ, Mcconville MJ, Lawyer PG, Perkins PV, Sacks DL. Stage-specific adhesion of leishmania promastigotes to the sandfly midgut. *Science* 256: 1812-1815, 1992.

Pitta MGR, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, Kouriba B, Argiro L, Kheir M el, Bucheton B, Mary C, El-Safi SH, Dessein A. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *J. Clin. Invest.* 119: 2379–2387, 2009.

Puentes SM, Dwyer DM, Bates PA, Joiner KA. Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. *J. Immunol.* 143: 3743-3749, 1989.

Quirino GFS, Nascimento MSL, Davoli FM, Sacramento LA, Lima MHF, Almeida RP, Carregaro V, Silva JS. Interleukin-27 (IL-27) mediates susceptibility to visceral leishmaniasis by suppressing the IL-17 neutrophil response (JA Appleton, Ed.). *Infect. Immun.* 84: 2289–2298, 2016.

Raskovalova T, Huang X, Sitkovsky M, Zacharia LC, Jackson EK, Gorelik E. Gs protein-coupled adenosine receptor signaling and lytic function of activated Nk cells. *J. Immunol.* 175: 4383-4391, 2005.

Rinaldi FM, Oshiro M, Miguita K. A importância da dosagem de adenosina deaminase (ADA). Núcleo de Hematologia e Bioquímica, *Centro de Patologia, Bol Inst Adolfo Lutz.* 21(1):18-20, 2011.

Sacramento LA, Amorim CF, Lombana CG, Beiting D, Novais F, Carvalho LP, Carvalho EM, Scott F. CCR5 promotes the migration of pathological CD8+ T cells to the leishmanial lesions. *PLoS Pathog*; 20(5): e1012211, 2024.

Sacramento LA, Cunha FQ, Almeida RP, Silva JS, Carregaro V. Protective role of 5-lipoxygenase during *Leishmania infantum* infection is associated with Th17 subset. *Biomed Res. Int.* 2014: 1–12, 2014.

Sacramento LA, Farias AC, Campos TM, Saldanha M et al. NKG2D promotes CD8 T cell-mediated cytotoxicity and is associated with treatment failure in human cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.*: Aug;17(8): e0011552, 2023.

Santos JC, Heinhuis B, Gomes RS, Michelle SMA, Real F, Mortara RA, Keating ST, Dinarello CA, Joosten LAB, Ribeiro DF. Cytokines and microbicidal molecules regulated by IL-32 in THP-1-derived human macrophages infected with New World Leishmania species. *Plos Negl. Trop. Dis.* 11: e0005413, 2017.

Schnurr M, Then F, Galambos P, Scholz C, Siegmund B, Endres S, Eigler A. Extracellular Atp and Tnf-Alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. *J. Immunol.* 165: 4704-4709, 2000.

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

Si QS, Nakamura Y, Kataoka K. Adenosine inhibits superoxide production in rat peritoneal macrophages via elevation of camp level. *Immunopharmacology* 36: 1-7, 1997.

Silva D, Moreira D, Silva AC, Quintas C, Gonçalves J, Fresco P. Intracellular adenosine released from THP-1 differentiated human macrophages is involved in an autocrine control of Leishmania parasitic burden, mediated by adenosine A2A and A2B receptors. *European Journal of Pharmacology*. Vol. 885, 15, 173504, 2020.

Silva MEA, Oliveira JC, Figueiredo AB, Lima Junior DS, Carneiro CM, Fietto JLR, Afonso LCC. Extracellular nucleotide metabolism in leishmania: Influence of adenosine in the establishment of infection. *Microbes Infect.* 10: 850-857, 2008.

Silveira FT, Lainson R, Gomes CMC, Laurenti MD, Corbett CEP. Reviewing the role of the dendritic langerhans cells in the immunopathogenesis of american cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102: 1075–1080, 2008.

Soong L. Subversion and utilization of host innate defense by *Leishmania amazonensis*. *Front Immunol.* 3: 58, 2012.

Souza MC, De Assis EA, Gomes RS, Marques Da Silva EA, Melo MN, Fietto JL, Afonso LC. The influence of ecto-nucleotidases on *Leishmania amazonensis* infection and immune response in C57b/6 mice. *Acta Trop.* 115: 262-269, 2010.

Suarez, MS. Avaliação da interação entre neutrófilos humanos infectados por *Leishmania Amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* com células dendríticas: Impacto dos receptores de adenosina. Salvador [Tese de Doutorado em Patologia Humana - UFBA], 2019.

Talamas RP, Wright SD, Lennartz MR, Russell D.G. Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the Cr3, P150,95 and Lfa-1 family of leukocyte integrins. *J. Immunol.* 144: 4817-4824, 1990.

Turco SJ. The lipophosphoglycan of leishmania. *Parasitol. Today* 4: 255-257, 1988.

Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD, Carvalho EM. Disseminated leishmaniasis: A new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J. Infect. Dis.* 186: 1829-1834, 2002.

WHO. Consultative meeting on cutaneous leishmaniasis. *World Health Organization*, 1-37, 2007.

Wilson ME, Pearson RD. Roles of Cr3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. *Infect. Immun.* 56: 363-369, 1988.

Xaus J, Mirabet M, Lloberas J, Soler C, Lluís C, Franco R, Celada A. Ifn gamma up-regulates the A2b adenosine receptor expression in macrophages: A mechanism of macrophage deactivation. *J. Immunol.* 162: 3607-3614: 1999.

Yao C, Luo J, Hsiao C, Donelson JE, Wilson ME. Internal and surface subpopulations of the major surface protease (Msp) of *Leishmania Chagasi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 139: 173-183, 2005.

Zhang JG, Hepburn L, Cruz G, Borman RA, Clark KL. The role of adenosine A2A and A2B receptors in the regulation of TNF- α production by human monocytes. *Biochem Pharmacol.* 15;69(6): 883-9, 2005.