



UFBA

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
FACULDADE DE MEDICINA  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA



FIOCRUZ

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**TESE DE DOUTORADO**

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE NEUTRÓFILOS  
HUMANOS INFECTADOS POR *Leishmania amazonensis* OU  
*Leishmania braziliensis* COM CÉLULAS DENDRÍTICAS: IMPACTO  
DOS RECEPTORES DE ADENOSINA.**

**MARTHA SENA SUAREZ**

Salvador – Bahia  
2019

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
FACULDADE DE MEDICINA  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**TESE DE DOUTORADO**

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE NEUTRÓFILOS  
HUMANOS INFECTADOS POR *Leishmania amazonensis* OU  
*Leishmania braziliensis* COM CÉLULAS DENDRÍTICAS: IMPACTO  
DOS RECEPTORES DE ADENOSINA.**

**MARTHA SENA SUAREZ**

Orientadora: Cláudia Ida Brodskyn

Co-orientadora: Elvira Maria Saraiva

Tese apresentada ao Curso de Pós-  
Graduação em Patologia Humana,  
para obtenção do grau de Doutor.

**Salvador – Bahia  
2019**

Título da Tese: "AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE NEUTRÓFILOS HUMANOS INFECTADOS POR *Leishmania amazonensis* OU *Leishmania braziliensis* COM CÉLULAS DENDRÍTICAS: IMPACTO DOS RECEPTORES DE ADENOSINA"

MARTHA SENA SUAREZ

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 22 de agosto de 2019

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Maria Olívia Amado Ramos Bacellar  
Professora  
UFBA



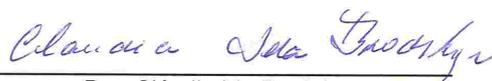
Dra. Maria Fernanda Rios Grassi  
Pesquisadora  
IGM/Fiocruz



Dra. Camila Indiani de Oliveira  
Pesquisadora  
IGM/Fiocruz



Dr. Lucas Pedreira de Carvalho  
Pesquisador  
IGM/Fiocruz



Dra. Cláudia Ida Brodskyn  
Pesquisadora  
IGM/Fiocruz

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

CNPq

## AGRADECIMENTOS

Minha vó e mãe Cleunice , por todo amor e por tudo que me ensinou. Minha eterna saudade e amor incondicional;

Maristela, minha mãe, melhor amiga e companheira de todas as horas;

Heraldo, Osemilton e Ricardo, que mais do que avô/pai, pai e tio, são meus amigos e heróis;

Jorge, meu marido, por todo amor, companheirismo, compreensão e incentivo;

Claudia Brodskyn por acreditar em mim em todos esses anos de parceria e aprendizado e me ajudar tanto nessa jornada tão importante;

Elvira Saraiva por me receber tão bem, contribuir tanto e ser essa pessoa tão compreensiva, prestativa e agradável. Um verdadeiro prazer a convivência com você;

Amigos do Fundão por terem me recebido de braços abertos no laboratório e tornarem os dias de trabalho tão prazerosos;

Ao PGPAT e toda equipe do CPQGM pela parceria de anos;

A equipe da biblioteca pelo suporte e correções;

CAPES e CNPQ pelo suporte financeiro ao longo do curso;

Michele Tanny Nascimento, Leandra Linhares-Lacerda e Raquel de Souza Martins do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, IOC, RJ pelas imagens de imunofluorescência;

Anita Leocádio Freitas-Mesquita e José Roberto Meyer-Fernandes por tanta gentileza e pelas dosagens das enzimas das *Leishmanias*;

Amanda Figueiredo e Luis Carlos Crocco Afonso pelos anticorpos, pela atenção e carinho sempre.

SUAREZ, Martha Sena. Avaliação da interação entre neutrófilos humanos infectados por *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* com células dendríticas: impacto dos receptores de adenosina. 84 f. il. Tese (Doutorado em Patologia Humana) –Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Os neutrófilos (NØs) modulam a resposta imune pela produção de citocinas e quimiocinas ou interação direta com outras células. Células dendríticas (DCs) apresentam antígenos e ao interagirem com diferentes componentes do sistema imune, modulam a resposta adaptativa, responsável pela eliminação de microrganismos e manutenção da memória imunológica. O ATP extracelular produzido após dano celular exibe propriedades pró-inflamatórias, enquanto a adenosina, produto do catabolismo do ATP, exibe propriedades antiinflamatórias. Neste trabalho, avaliamos o efeito da interação entre DCs humanas e NØs infectados por *L. braziliensis* (*Lb*) ou *L. amazonensis* (*La*) e a participação dos receptores de adenosina. **METODOLOGIA:** NØs purificados do sangue de doadores saudáveis foram infectados ou não por *Lb* ou *La* e co-cultivados com DCs geradas *in vitro* de monócitos tratados com IL-4 / GM-CSF. As DCs nestas co-culturas foram avaliadas quanto sua taxa de infecção, expressão de moléculas de superfície e produção de citocinas. Para investigar a participação da adenosina, a carga parasitária nestas células foi avaliada após inibição de CD39, CD73 ou receptores A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub>. **RESULTADOS:** O co-cultivo de DCs com NØs infectados com *La* aumentou a carga parasitária, reduziu a expressão de moléculas de superfície e a produção de IL-12 (pró-inflamatória) e aumentou a produção de IL-10 (anti-inflamatória). Resultados opostos foram obtidos nas co-culturas de DCs e NØs infectados por *Lb*. O bloqueio do CD39, mas não do CD73, em NØs ou em DCs reduziu a carga parasitária nas DCs co-cultivadas com NØs infectados por *La*. Já a inibição dos receptores A<sub>2B</sub> ou A<sub>2A</sub> diminui a carga parasitária após a co-cultura das DCs com NØs infectados por *La* ou quando cultivadas com adenosina. Este mesmo tratamento só alterou a carga parasitária em DCs co-cultivadas com NØs infectados por *Lb* na presença da adenosina. **CONCLUSÃO:** Nossos resultados indicam que NØs infectados por *La* e *Lb* modulam diferentemente a ativação das DCs por influência da adenosina e seus receptores.

**Palavras-chave:** Neutrófilos, Células Dendríticas, Adenosina.

SUAREZ, Martha Sena. Avaliação da interação entre neutrófilos humanos infectados por *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* com células dendríticas: impacto dos receptores de adenosina. 84 f. il. Tese (Doutorado em Patologia Humana) –Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Neutrophils (NØs) modulate the immune response by cytokine and chemokine production or direct interaction with other cells. Dendritic cells (DCs) present antigens and by interacting with different components of the immune system, modulate the adaptive response, responsible for the elimination of microorganisms and maintenance of immune memory. Extracellular ATP produced after cells' injury exhibits proinflammatory properties, while adenosine, ATP catabolism product, exhibits antiinflammatory properties. In this study, we evaluated the effect of the interaction between human DCs and neutrophils infected by *L. braziliensis* or *L. amazonensis*, and the participation of adenosine receptors.

**METHODOLOGY:** Neutrophils purified from peripheral blood of healthy donors were infected or not with *L. braziliensis* or *L. amazonensis* and co-cultured with DCs generated *in vitro* with IL-4/GM-CSF. Analyzing DCs in these co-cultures we assessed their infection rate, expression of surface molecules and cytokine production. To investigate the involvement of adenosine, the parasite load on these cells was assessed following inhibition of CD39, CD73, or A<sub>2A</sub> and A<sub>2B</sub> adenosine receptors. **RESULTS:** DCs co-cultured with *L. amazonensis*-infected neutrophils showed a significant increase in parasite load, reduction on the expression of surface molecules and production of pro-inflammatory cytokines, as well as increase in anti-inflammatory cytokines production. Opposite results were obtained in the co-cultures of DCs and *L. braziliensis*-infected neutrophils. Blocking CD39 but not CD73 on neutrophils or DCs induces a decrease in parasite load in DCs co-cultured with *L. amazonensis*-infected neutrophils. Additionally, inhibition of A<sub>2B</sub> or A<sub>2A</sub> adenosine receptor leads to a decrease of the parasite load after the co-culture of DCs with *L. amazonensis*-infected neutrophils or when these cells were cultivated with adenosine. This same treatment only altered the parasite load in DCs co-cultivated with neutrophils infected by *L. braziliensis* in presence of adenosine. **Conclusion:** Neutrophils could be an important cell in modulating the activation or inhibition of DCs and different species of *Leishmania* present differential behaviors in the interactions between neutrophils and DCs.

**Key words:** Neutrophils, Dendritic Cells, Adenosine.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. O papel imunomodulador dos neutrófilos no local da transmissão de *Leishmania* pela picada de flebotomíneos-----14
- Figura 2. Morfologia dos neutrófilos de doadores saudáveis após purificação-----27
- Figura 3. Estratégia de *gate* para análise das moléculas co-estimulatórias nas DCs-----30
- Figura 4. Diferentes taxas de infecção das DCs na presença de neutrófilos infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*-----34
- Figura 5. Avaliação da apoptose em neutrófilos infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* -----36
- Figura 6. Frequência dos marcadores de superfície em DCs co-cultivadas com neutrófilos infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* -----37
- Figura 7. Avaliação da produção de citocinas no sobrenadante das DCs co-cultivadas com neutrófilos infectados com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*-----39
- Figura 8. Concentração de ATP no sobrenadante da interação entre neutrófilos e *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis*-----40
- Figura 9. Aumento na frequência de ectonucleotidases nas DCs após infecção por *L. amazonensis*, mas não por *L. braziliensis*-----41
- Figura 10. Infecção de neutrófilos por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* aumenta a frequência de CD39-----42

Figura 11. Ectonucleotidases das DCs modulam a carga parasitária-----	43
Figura 12. Inibição de CD39 de neutrófilos com POM-1 antes da infecção por <i>L. amazonensis</i> reduz a carga parasitária nas DCs-----	45
Figura 13. Inibição de CD39 em neutrófilos com POM-1 reduz a carga parasitária-----	47
Figura 14. Antagonista do receptor A <sub>2B</sub> de adenosina (MRS1754) reduz a carga parasitária em DCs infectadas por <i>L. amazonensis</i> , mas não por <i>L. braziliensis</i> -----	49
Figura 15. Antagonista do receptor A <sub>2A</sub> de adenosina (SCH58261) reduz a carga parasitária em DCs infectadas por <i>L. amazonensis</i> , mas não por <i>L. braziliensis</i> -----	51
Figura 16. Adenosina induz aumento da carga parasitária nas DCs infectadas e esse efeito é revertido pelos inibidores do A <sub>2A</sub> (SCH58261) e A <sub>2B</sub> (MRS1754) -----	53
Figura 17. Avaliação da viabilidade da <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i> na presença dos inibidores POM-1, αβ-MAD, SCH58261 e MRS1754-----	55
Figura 18. Inibição do receptor A <sub>2A</sub> de adenosina com SCH58261 altera a sua expressão---	56
Figura 19. Inibição do receptor A <sub>2B</sub> de adenosina com MRS1754 altera a sua expressão-----	58
Figura 20. <i>L. amazonensis</i> expressa receptores A <sub>2A</sub> e A <sub>2B</sub> de adenosina-----	60
Figura 21. Atividade das enzimas 3'-NU/NT e 5'-NU/NT em <i>Leishmania amazonensis</i> e <i>Leishmania braziliensis</i> -----	61

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>CBA</b>	Ensaio de Citometria com Esferas, do inglês <i>Cytometric Bead Array</i>
<b>CCL3,4</b>	Quimiocina Ligante 3, 4, do inglês <i>Chemokine (C--C motif) Ligand 3,4</i>
<b>DC-SIGN</b>	DC Specific Intracellular Adhesion Molecule 3-Grabbing Nonintegrin
<b>ENTPDase</b>	(do inglês <i>Ecto-Nucleotide Diphosphohydrolases</i> )
<b>SBF</b>	Soro Bovino Fetal
<b>NET</b>	<i>Neutrophils Extracellular Trap</i>
<b>NE</b>	<i>Neutrophil Elastase</i>
<b>ELISA</b>	Ensaio Imunoenzimatico, do inglês <i>Enzyme Liked Immunosorbent Assay</i>
<b>ROS</b>	Espécies Reativas do Oxigênio, do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL-8</b>	Interleucina8
<b>LTB4</b>	Leucotrieno B4
<b>LPG</b>	Lipofosfoglicano
<b>LPS</b>	Lipopolissacarideo
<b>MMP-9</b>	Metoproteinase 9
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>NADPH</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleotideo P
<b>PMN</b>	Polimorfonuclear

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	12
1.1 DEFINIÇÃO DA DOENÇA E EPIDEMIOLOGIA	12
1.2 TRANSMISSÃO DA DOENÇA E CICLO DO PARASITO	13
1.3 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE	15
1.4 <i>Leishmania amazonensis</i> x <i>Leishmania braziliensis</i>	16
1.5 CARACTERÍSTICAS DOS NEUTRÓFILOS	17
1.6 RESPOSTA DE NEUTRÓFILOS APÓS INTERAÇÃO COM <i>Leishmania</i>	19
1.7 INTERAÇÃO ENTRE NEUTRÓFILOS E DCs	20
1.8 RESPOSTA DAS DCs APÓS INTERAÇÃO COM <i>Leishmania</i>	21
1.9 CÉLULAS DENDRÍTICAS, <i>Leishmania</i> e SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA	23
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	25
<b>3 HIPÓTESE</b>	26
<b>4 OBJETIVOS</b>	27
4.1 OBJETIVO GERAL	27
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
<b>5 DESENHO EXPERIMENTAL</b>	28
<b>6 MATERIAL E MÉTODOS</b>	29
6.1 OBTENÇÃO E CULTURA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS	29
6.2 OBTENÇÃO E CULTURA DAS DCs	30
6.3 CULTIVO DE <i>Leishmania</i>	30
6.4 INFECCÃO DE NEUTRÓFILOS <i>in vitro</i>	30
6.5 INFECCÃO DAS DCs OU CO-CULTURA COM NEUTRÓFILOS INFECTADOS	31
6.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA 3'e 5'NT	33
6.7 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	33
6.8 QUANTIFICAÇÃO DE ATP NO SOBRENADANTE DA INTERAÇÃO ENTRE NEUTRÓFILOS E <i>L. amazonensis</i> OU <i>L. braziliensis</i>	34
6.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
<b>7 RESULTADOS</b>	35
7.1 DIFERENTES TAXAS DE INFECCÃO DAS DCs NA PRESENÇA DE NEUTRÓFILOS INFECTADOS POR <i>L. amazonensis</i> OU <i>L. braziliensis</i>	35
7.2 AVALIAÇÃO DA APOPTOSE EM NEUTRÓFILOS EXPOSTOS A <i>L. amazonensis</i> OU <i>L. braziliensis</i>	37
7.3 FREQUÊNCIA DOS MARCADORES DE SUPERFÍCIE EM DCs CO-CULTIVADAS COM NEUTRÓFILOS (NØ) INFECTADOS POR <i>L. amazonensis</i> OU <i>L. braziliensis</i>	38
7.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS NO SOBRENADANTE DAS DCs CO-CULTIVADAS COM NEUTRÓFILOS INFECTADOS COM <i>L. amazonensis</i> OU <i>L. braziliensis</i>	40
7.5 CONCENTRAÇÃO DE ATP NO SOBRENADANTE DA INTERAÇÃO ENTRE NEUTRÓFILOS E <i>Leishmania amazonensis</i> OU <i>Leishmania braziliensis</i>	41

7.6 AUMENTO NA FREQUÊNCIA DE ECTONUCLEOTIDASES NAS DCS APÓS INFEÇÃO POR <i>L. amazonensis</i> MAS NÃO POR <i>L. braziliensis</i> -----	42
7.7 INFEÇÃO DE NEUTRÓFILOS POR <i>L. amazonensis</i> OU <i>L. braziliensis</i> AUMENTA A EXPRESSÃO DE CD39-----	43
7.8 ECTONUCLEOTIDASES DAS DCS MODULAM A CARGA PARASITÁRIA-----	44
7.9 INIBIÇÃO DE CD39 DE NEUTRÓFILOS COM POM-1 ANTES DA INFEÇÃO POR <i>L. amazonensis</i> REDUZ A CARGA PARASITÁRIA NAS DCS-----	46
7.10 INIBIÇÃO DE CD39 EM NEUTRÓFILOS COM POM-1 REDUZ A CARGA PARASITÁRIA-----	48
7.11 ANTAGONISTA DO RECEPTOR A <sub>2B</sub> DE ADENOSINA (MRS1754) REDUZ A CARGA PARASITÁRIA EM DCS INFECTADAS POR <i>L. amazonensis</i> , MAS NÃO POR <i>L. braziliensis</i> -----	50
7.12 ANTAGONISTA DO RECEPTOR A <sub>2A</sub> DE ADENOSINA (SCH58261) REDUZ A CARGA PARASITÁRIA EM DCS INFECTADAS POR <i>L. amazonensis</i> , MAS NÃO POR <i>L. braziliensis</i> -----	52
7.13 ADENOSINA INDUZ AUMENTO DA CARGA PARASITÁRIA NAS DCS INFECTADAS E ESSE EFEITO É REVERTIDO PELOS INIBIDORES DOS RECEPTORES A <sub>2A</sub> (SCH58261) E A <sub>2B</sub> (MRS1754)-----	54
7.14 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA <i>L. amazonensis</i> E <i>L. braziliensis</i> NA PRESENÇA DOS INIBIDORES POM-1, αβ-MAD, SCH58261 e MRS1754-----	56
7.15 INIBIÇÃO DO RECEPTOR A <sub>2A</sub> DE ADENOSINA COM SCH58261 ALTERA A SUA EXPRESSÃO-----	57
7.16 INIBIÇÃO DO RECEPTOR A <sub>2B</sub> DE ADENOSINA COM MRS1754 ALTERA A SUA EXPRESSÃO-----	59
7.17 <i>L. amazonensis</i> EXPRESSA RECEPTORES A <sub>2A</sub> e A <sub>2B</sub> DE ADENOSINA-----	61
7.18 ATIVIDADE DAS ENZIMAS 3'-NU/NT e 5'-NU/NT EM <i>Leishmania amazonensis</i> E <i>Leishmania braziliensis</i> -----	62
<b>8 DISCUSSÃO</b> -----	63
<b>9 SUMÁRIO DE RESULTADOS</b> -----	72
<b>10 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> -----	74
<b>11 REFERÊNCIAS</b> -----	75

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 DEFINIÇÃO DA DOENÇA E EPIDEMIOLOGIA

As leishmanioses compõem um grupo de antropozoonoses transmitidas a seres humanos e outros mamíferos por vetores flebotomíneos (CHAVES *et al.*, 2007). As leishmanioses são endêmicas em 98 países distribuídos nos 5 continentes (KEDZIERSKI, 2011; ALVAR *et al.*, 2012) e podem ser causadas por cerca de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae) (WHO, 2014).

Estima-se que 1 bilhão de pessoas vivam em áreas sob risco de infecção e foi reportado cerca de 1 milhão de novos casos no período compreendido entre 2010-2015 (WHO, 2015). As leishmanioses estão entre as principais doenças tropicais negligenciadas em termos de mortalidade e morbidade, com estimativa de 50.000 mortes ao redor do mundo em 2010 (ALVAR *et al.*, 2012). Foram reportados mais de 58.000 casos anuais de Leishmaniose Visceral e mais de 220.000 casos anuais de Leishmaniose Cutânea no período de 2007 a 2010 (ALVAR *et al.*, 2012). Em 2017, 20.792 dos 22.145 (94%) dos novos casos de Leishmaniose Visceral notificados à Organização Mundial de Saúde ocorreram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Quase 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru (WHO, 2019). Estima-se que cerca de 75% dos casos registrados de leishmaniose tegumentar estejam concentrados em 10 países, dos quais 4 na região das Américas (Brasil, Colômbia, Peru e Nicarágua) (WHO, 2019).

Estudos recentes revelam que a leishmaniose produz uma carga de doença de 2,35 milhões de DALYs (anos de vida perdidos ajustados pela incapacidade), dos quais 2,3% recaem nas Américas, onde casos de leishmaniose foram notificados desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção das ilhas do Caribe, Chile e Uruguai. A cada ano, uma média de 60.000 casos de leishmaniose tegumentar e mucosa e 4.000 casos de leishmaniose visceral são diagnosticados, com uma taxa de mortalidade de 7%. No mundo, a co-infecção *Leishmania* / HIV aumentou a carga da doença devido à maior dificuldade do tratamento clínico. Se não tratada, as formas mucosa e cutânea podem causar deformidades e desfigurações, e a forma visceral pode causar a morte em mais de 90% dos casos não tratados (PAHO, 2019).

O diagnóstico da infecção é essencial para estabelecer um tratamento específico e limitar o progresso da doença. As populações com maior risco de infecção estão concentradas em áreas rurais e de expansão urbana, uma vez que algumas espécies de flebotomíneos têm preferência por habitar o peridomicílio, no entanto, outros fatores econômicos e sociais

também contribuem para o risco de se contrair a doença. As ferramentas de prevenção e controle disponíveis são limitadas, portanto, é importante que as pessoas em risco estejam envolvidas na implementação de medidas para reduzir o contato entre seres humanos e vetores.

## 1.2 TRANSMISSÃO DA DOENÇA E CICLO DO PARASITO

Os principais vetores das leishmanioses pertencem aos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Cães domésticos, roedores e gambás são os principais mamíferos considerados reservatório do parasito (ASHFORD, 1996).

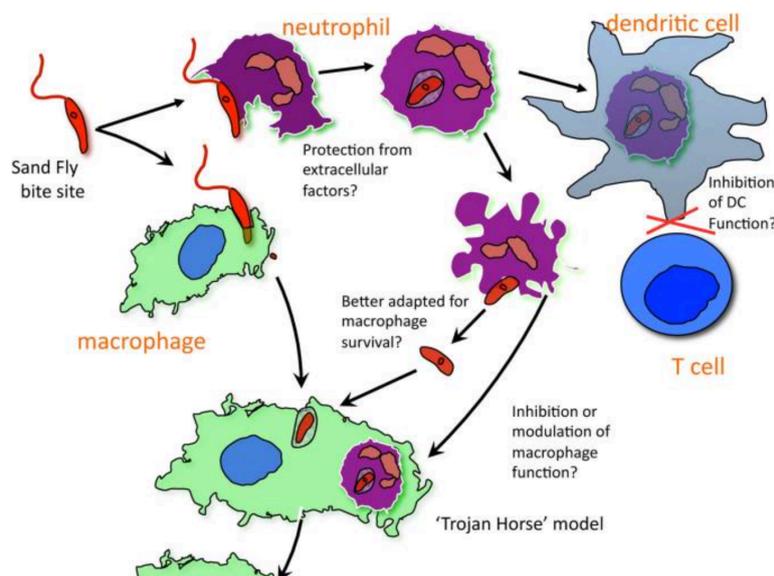
A doença é transmitida quando a fêmea do vetor flebotomíneo introduz sua probóscide na derme do hospedeiro vertebrado e inocula os parasitos (Ruiz; Becker, 2007). A transmissão independente do vetor pode ocorrer através de acidentes de laboratório, transfusão sanguínea (FUKUTANI *et al.*, 2014), transplante de órgãos (OLIVEIRA *et al.*, 2008), transmissão vertical, por meio da passagem de formas amastigotas pela placenta durante o período gestacional em humanos (FIGUEIRÓ-FILHO *et al.*, 2004) e em cães (NAUCKE e LORENTZ, 2012), além da transmissão venérea em cães (RIERA e VALLADARES, 1996).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos intracelulares obrigatórios, digenéticos, que vivem alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores (GONTIJO e CARVALHO, 2003). A forma promastigota é livre e flagelada, sendo encontrada no trato digestório do flebótomo (KAYE e SCOTT, 2011). A forma amastigota encontra-se no interior de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado. A transmissão do parasito ocorre quando a fêmea do vetor infectado, ao realizar seu repasto sanguíneo, inocula junto com a saliva, as formas promastigotas no hospedeiro mamífero. Diversos estudos já foram publicados demonstrando que além da saliva, o vetor também inocula promastigotas junto com um tampão gelatinoso (PSG: do inglês *Promastigote Secretory Gel*) composto principalmente por glicoproteína, produzido pelas próprias promastigotas e que dificulta o repasto sanguíneo. Essa dificuldade faz com que o vetor cometa múltiplas e demoradas tentativas de alimentação no hospedeiro, aumentando as chances de transmissão e auxiliando no estabelecimento da infecção. Já foi visto que esse PSG aumenta tanto a patogenicidade quanto a sobrevivência da *L. mexicana* (ROGERS *et al.*, 2004). Uma vez inoculadas, essas promastigotas podem ser capturadas pelas NETs (do inglês

*Neutrophils Extracellular Traps*), ou fagocitadas pelos neutrófilos, células que são rapidamente recrutadas para o local de infecção (HURREL *et al*, 2016). As promastigotas então podem entrar direta ou indiretamente nos macrófagos, suas células hospedeiras finais. Dentro dos macrófagos, as promastigotas irão se instalar no interior do vacúolo parasitóforo, onde irão se diferenciar em amastigotas, as quais se multiplicam por divisão binária e, após sucessivas divisões, as células se rompem, liberando amastigotas. Outras células fagocíticas, como os neutrófilos, podem novamente fagocitar estas amastigotas, propagando a infecção no hospedeiro vertebrado (GENARO *et al.*, 2000). Os neutrófilos infectados podem aumentar sua expressão de marcadores apoptóticos e liberar parasitos viáveis que podem ser mais bem adaptados para a sobrevivência e crescimento intracelular nos macrófagos. O englobamento de células infectadas, não infectadas ou de corpos apoptóticos por macrófagos pode inibir a ativação dessas células infectadas no sítio da inflamação. A infecção das DCs da derme parece ocorrer principalmente via captura de neutrófilos infectados (figura 1; RIBEIRO-GOMES e SACKS, 2012).

Real e colaboradores (2014) demonstraram *in vitro* um mecanismo de escape da *Leishmania amazonensis* em que as amastigotas são transferidas de um macrófago a outro sem que haja ruptura da célula. Nesse modelo, o macrófago infectado entra num processo de iminência de apoptose e é então fagocitado por outro macrófago, transferindo assim o vacúolo parasitóforo íntegro, contendo amastigotas. Durante outro repasto sanguíneo, o vetor adquire células infectadas, dando continuidade ao ciclo.

No interior do trato digestório do inseto, os macrófagos se rompem liberando as formas amastigotas, as quais sofrem divisões, multiplicam-se e se transformam em promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes (ALEXANDER; SATOSKAR e RUSSELL, 1999).



**Figura 1. O papel imunomodulador dos neutrófilos no local da transmissão de *Leishmania* pela picada de flebotomíneos.** Promastigotas metacíclicas depositadas na pele por flebotomíneos infectados são internalizadas principalmente por neutrófilos. Esses neutrófilos infectados entram em apoptose e liberam parasitas viáveis que podem ser mais bem adaptados para a sobrevivência e crescimento intracelular após sua fagocitose pelos macrófagos. O englobamento de células infectadas, não infectadas ou corpos apoptóticos por macrófagos pode inibir a ativação de macrófagos infectados no sítio inflamatório. A infecção inicial das DCs parece ocorrer principalmente por captura de neutrófilos parasitados. Este encontro reduz fortemente sua capacidade de *priming* e, conseqüentemente, retarda a resposta imune contra o parasita até que a resposta neutrofílica aguda seja resolvida (RIBEIRO-GOMES e SACKS, 2012).

### 1.3 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE

As leishmanioses apresentam duas formas clínicas principais: a Leishmaniose Visceral (LV) e a Leishmaniose Tegumentar (LT). A LV é uma forma grave e pode ser fatal se não tratada, que consiste em uma infecção generalizada envolvendo baço, fígado, medula óssea e linfonodos (BITTENCOURT e BARRAL-NETO, 1995; CHAPPUIS *et al.*, 2007). A Leishmaniose Tegumentar é subdividida em quatro grupos, a depender das manifestações clínicas: Leishmaniose Cutânea Disseminada (LCD), onde se encontram várias lesões formadas pela disseminação do parasito por vias hematogênica ou linfática, provocada principalmente por *L. braziliensis*; Leishmaniose Cutânea Mucosa (LCM), causada principalmente por *L. braziliensis*, essa forma clínica é caracterizada por uma resposta imune exacerbada com acometimento das mucosas, principalmente nasofaringe, onde são encontradas lesões destrutivas. A necrose do tecido da mucosa está associada com uma resposta imune intensa, mediada por linfócitos T e altos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , refletida por uma hipersensibilidade do tipo tardio exacerbada a antígenos de *Leishmania* (BACELLAR *et al.*, 2002). O aumento de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e níveis baixos de IL-10 contribuem para o desenvolvimento da lesão ulcerada (BACELLAR *et al.*, 2002). Enquanto a LCM representa o polo de hipersensibilidade das células T, associada a forte resposta imune espécie-específica contra *L. braziliensis*, a Leishmaniose Difusa representa o polo oposto, caracterizada pela presença de linfócitos T antígeno-específicos não responsivos e alta produção de IL-4, IL-10 e TGB- $\beta$  (SILVEIRA *et al.*, 2009). Essa deficiência na resposta imune celular específica aos antígenos de *Leishmania*, justifica a anergia ao teste intradérmico de Montenegro (BARRAL *et al.*, 1995). Essa forma clínica é associada a lesões difusas não ulceradas com carga parasitária alta e predomínio de macrófagos altamente parasitados, causada principalmente por *L. amazonensis* e *L. pifanoi* (SILVEIRA *et al.*, 2009).

Leishmaniose Cutâneo-Localizada (LCL), é a forma clínica mais frequente, no Brasil ocasionada principalmente pelas espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (SILVEIRA *et al.*, 2008). A LCL tem como principal característica uma lesão ulcerada que se desenvolve, geralmente, nos membros inferiores, no local de inoculação do parasito pelo vetor. A apresentação mais comum da lesão ulcerada é de fundo granuloso, com bordas bem delimitadas, elevadas e eritematosas, geralmente indolor (MARSDEN, 1986). Alguns casos de LCL podem evoluir para a cura espontânea (COSTA *et al.*, 1990; MARSDEN *et al.*, 1984), entretanto, a maioria requer tratamento com fármacos leishmanicidas.

A ocorrência de diferentes manifestações clínicas da leishmaniose depende de complexas interações que abrangem desde a característica infecciosa da espécie de *Leishmania* até o estado imunológico do hospedeiro humano (PEARSON e SOUSA, 1996).

#### 1.4 *Leishmania amazonensis* x *Leishmania braziliensis*

No Brasil, *L. braziliensis* (subgênero *Viannia*) e *L. amazonensis* (subgênero *Leishmania*) são consideradas as principais espécies patogênicas causadoras da Leishmaniose Cutânea em humanos (CARVALHO *et al.*, 2012). A Leishmaniose Cutânea causada por essas duas espécies de *Leishmania* apresenta um espectro clínico-imunológico no qual a *L. amazonensis* caracteriza a infecção pelo pólo anérgico de resposta imune celular, enquanto que a infecção por *L. braziliensis* representa o pólo de hipersensibilidade da resposta imune celular do hospedeiro (SILVEIRA *et al.*, 2008). A diversidade de manifestações clínicas tem sido principalmente associada a diferenças antigênicas das diferentes espécies de parasitas (SILVEIRA *et al.*, 2009), mas também ao contexto imuno-genético do hospedeiro.

Carvalho e colaboradores (2012) fizeram um estudo comparativo entre DCs murinas infectadas por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* e observaram que as espécies de *Leishmania* também podem ser um fator crucial na ativação das DCs para modular uma resposta imune Th1 ou Th2. O grupo observou que camundongos infectados com *L. amazonensis* desenvolveram uma infecção grave, com aumento do tamanho da lesão, alto parasitismo tecidual e processo patológico na pele associado à destruição tecidual, enquanto que os animais infectados com *L. braziliensis* apresentaram lesões cutâneas mínimas, parasitismo escasso e eventos patológicos leves nos sítio da infecção, demonstrando que apesar dos camundongos infectados por *L. amazonensis* apresentarem uma resposta inicial mais intensa, com aumento da densidade celular nas subpopulações de DCs avaliadas e alta expressão de células T CD4<sup>+</sup> 4 semanas após a infecção, eles permanecem incapazes de

controlar a infecção. Por sua vez, na oitava semana pós-infecção, o grupo observou um aumento na densidade das subpopulações das DCs dos camundongos infectados por *L. braziliensis*, ao mesmo tempo em que observaram regressão da infecção e aumento no número de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no local da lesão. Estas diferenças experimentais observadas entre os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* parecem confirmar diferenças prévias observadas nos aspectos clínico-imunopatológicos dos pacientes com Leishmaniose Cutânea (SILVEIRA *et al*, 2009).

Já foi visto também que *L. amazonensis* prejudica a diferenciação de DCs humanas, comprometendo a expressão de moléculas co-estimulatórias e produção de citocinas, com consequente atraso na resposta imune, o que pode favorecer o estabelecimento da infecção em humanos (FAVALI *et al*, 2007).

Outro estudo mostrou que as DCs derivadas de camundongos infectados com *L. amazonensis* falharam na ativação de DCs CD11c<sup>+</sup> produtoras de IL-12, ativando preferencialmente células T CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$  low e IL-10 high (XIN e SOONG, 2007). Além disso, DCs infectadas com amastigotas de *L. amazonensis* apresentam menor expressão de moléculas co-estimulatórias, menor produção de IL-12, mais IL-10 e menor capacidade de induzir células TCD4<sup>+</sup> com relação àquelas infectadas com as promastigotas, sugerindo que a forma intracelular parece ter desenvolvido uma estratégia reguladora até mais eficiente, resultando em uma inativação tanto das DCs quanto da resposta Th1 (XIN e SOONG, 2008). Por sua vez, Vargas-Inchaustegui e colaboradores (2008) observaram que DCs infectadas por promastigotas de *L. braziliensis* são capazes de produzir IL-12 e TNF- $\alpha$ . No entanto, nem todas as DCs na cultura foram infectadas e a análise das DCs infectadas e não infectadas demonstrou que a produção de IL-12 ocorre principalmente pelas DCs não infectadas, além de serem células mais eficientes na apresentação de antígenos. A infecção por amastigotas de *L. braziliensis* desencadeia uma resposta imune mais eficiente em DCs, auxiliando na iniciação da resposta imune adaptativa para a eliminação do parasito, pois apresentam um fenótipo mais ativado quando comparadas com aquelas infectadas com promastigotas.

## 1.5 CARACTERÍSTICAS DOS NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos formam a primeira linha de defesa contra infecções e sua capacidade de fagocitar e eliminar patógenos são essenciais para a defesa do organismo. Os neutrófilos podem reconhecer diretamente os patógenos pela interação entre os Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), que são moléculas presentes nos

microorganismos e ausentes em organismos superiores. Essas moléculas são reconhecidas pelos PRRs (Receptores de Reconhecimento Padrão), entre eles, receptores do tipo toll (SABROE e WHYTE, 2007).

Os neutrófilos são componentes do sistema imune celular inato e são caracterizados por possuírem núcleo multilobulado e muitos grânulos no citoplasma. Essas células atuam nas fases iniciais da resposta inflamatória, migrando para o local da inflamação em poucas horas (CHARMOY *et al.*, 2010a). A migração dessas células ocorre através de estímulos produzidos localmente, como mediadores inflamatórios, que induzem a expressão de P-selectina pelas células do tecido vascular adjacente (BORREGAARD, 2010). Estas selectinas reconhecem seu ligante na superfície dos neutrófilos com baixa afinidade, promovendo o rolamento dessas células sobre o endotélio (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). Iniciam-se então diversas mudanças na biologia dos neutrófilos, levando à sua firme adesão ao endotélio, que é mediada por integrinas como a Mac-1, expressa na superfície dos neutrófilos em seu estado ativado (LEY *et al.*, 2007). Uma vez aderido, o neutrófilo inicia a transmigração através do endotélio e membrana basal (SHESHACHALAM *et al.*, 2014). Esse processo é feito através da liberação de proteases presentes nos grânulos terciários, como a metaloproteinase-9 (MMP-9) (FAURSCHOU e BORREGAARD, 2003), responsável por degradar constituintes da membrana basal. No espaço intersticial, o neutrófilo segue em direção ao local da infecção, onde irá iniciar suas atividades microbidas (CHARMOY *et al.*, 2010a) e secretar quimiocinas que irão recrutar outras células (AMULIC *et al.*, 2012).

A atividade microbida dos neutrófilos ocorre através da fagocitose, atividade das enzimas presentes nos seus grânulos e por ativação da sua resposta oxidativa (Pham, 2006). Após a ativação, os neutrófilos geram espécies reativas de oxigênio (ROS) por um processo conhecido como explosão respiratória. Em neutrófilos estimulados, ROS são gerados quase exclusivamente por NADPH oxidase (LEE; HARRISON e GRINSTEIN, 2003; ROCHAEL *et al.*, 2015), cujo produto de reação, o superóxido, pode ser convertido em outros metabólitos, incluindo peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso, que servem como agentes antimicrobianos eficazes (LEE; HARRISON e GRINSTEIN, 2003; MAYER-SCHOLL, 2004).

Outro mecanismo de controle de patógenos, ocorre com a liberação para o meio extracelular da cromatina dos neutrófilos decorada por proteínas citoplasmáticas e granulares em forma de rede, as redes extracelulares de neutrófilos, "NETs" (do inglês *Neutrophils*

*Extracellular Traps*), que prendem e matam microorganismos (BRINKMANN *et al.*, 2004). Diferentes espécies de *Leishmania* induzem a liberação de NETs (GUIMARAES *et al.*, 2009).

#### 1.6 RESPOSTA DE NEUTRÓFILOS APÓS INTERAÇÃO COM *Leishmania*

Na infecção por *Leishmania*, proteção é mediada principalmente por células T da resposta imune adaptativa e as interações iniciais que ocorrem após a entrada do parasita podem ser determinantes para o curso da resposta efetora. Um intenso recrutamento de neutrófilos nos momentos iniciais da infecção por *Leishmania* foi demonstrado no local da picada do inseto vetor através de microscopia intravital (PETERS e SACKS, 2009).

Já foi demonstrado *in vitro* que neutrófilos internalizam *Leishmania major*, podendo levar à eliminação do parasito. Verificou-se, entretanto, que estes parasitos podem retardar o processo de apoptose destas células, mantendo sua viabilidade no interior dos neutrófilos (LAUFS *et al.*, 2002; SARKAR *et al.*, 2013). Posteriormente, após a fagocitose destes neutrófilos por macrófagos os parasitos proliferam no interior destas últimas células (CHARMOY *et al.*, 2010a). De fato, um estudo com células humanas demonstrou que corpos apoptóticos de neutrófilos contendo parasitos podem ser fagocitados por macrófagos, resultando na transferência de parasitos diretamente para vacúolos de macrófagos, onde se replicarão (ZANDBERGEN *et al.*, 2004). A fagocitose de corpos apoptóticos induz uma resposta anti-inflamatória e supressora associada à produção de TGF- $\beta$  e PGE<sub>2</sub> pelos macrófagos (FADOK *et al.*, 1998). Este mecanismo de escape do parasito foi denominado “Cavalo de Tróia” (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003). Posteriormente, foi sugerida a hipótese denominada “Coelho de Troia” em que a *Leishmania* escapa dos neutrófilos antes destes entrarem em apoptose. Neste mecanismo o parasito se aproveita do ambiente supressor gerado após a fagocitose do neutrófilo apoptótico e infecta os macrófagos de forma silenciosa (RITTER; FRISCHKNECHT e VAN ZANDBERGEN, 2009).

A apoptose é um processo intensamente controlado de morte celular, que tem importantes implicações na defesa do hospedeiro e regulação da resposta imune (SAVILL *et al.*, 2002). As células apoptóticas que não são removidas pelos fagócitos entram em necrose secundária. Os macrófagos que fagocitam células nesse estado liberam mediadores pró-inflamatórios (SAVILL *et al.*, 2002). Afonso e colaboradores (2008) demonstraram que macrófagos infectados em contato com neutrófilos apoptóticos apresentaram um aumento da carga parasitária, por um mecanismo dependente de TGF- $\beta$  e PGE<sub>2</sub>, enquanto a interação dos macrófagos infectados com neutrófilos necróticos induziu a morte do parasita, com liberação

de TNF- $\alpha$  e elastase neutrofílica. Por outro lado, neutrófilos viáveis apresentaram um efeito protetor contra *L. braziliensis*, ativando a capacidade microbicida de macrófagos, pela produção de TNF- $\alpha$  *in vivo* e *in vitro*. (NOVAIS *et al.*, 2009).

Um crescente número de trabalhos demonstra que os neutrófilos são capazes de influenciar na resposta imune ao cooperar com outros tipos celulares e produzir citocinas e quimiocinas, atuando desse modo na interface entre a resposta imune inata e adaptativa (APPELBERG, 2007). Neutrófilos são capazes de interagir com células dendríticas (DCs), macrófagos e linfócitos T. Além de interagir, os neutrófilos são capazes de influenciar na diferenciação dos linfócitos T através da secreção de IL-12 e IFN- $\gamma$ , citocinas envolvidas no perfil de resposta Th<sub>1</sub> (ETHUIN *et al.*, 2004).

### 1.7 INTERAÇÃO ENTRE NEUTRÓFILOS E DCs

As DCs são células apresentadoras de antígenos especializadas na captura e processamento de antígenos. Estas células estão distribuídas nos tecidos periféricos no seu estado imaturo, onde capturam microorganismos, células necróticas e/ou apoptóticas. Essa captura induz a ativação dessas células, que irão migrar para os órgãos linfoides secundários e iniciar a ativação dos linfócitos T naive (MEGIOVANNI; GLUCKMAN e BOUDALY, 2006). Uma vez ativados pelas DCs, os linfócitos T estabelecem a resposta imune interagindo com outras células, como as células B para produção de anticorpos, com os macrófagos para induzir a liberação de citocinas ou induzir a lise celular (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998).

Já foi demonstrado que os neutrófilos e as DCs interagem fisicamente através da ligação do Mac-1 dos neutrófilos e DC-SIGN das DCs (Van Gisbergen *et al.*, 2005). Induzida pela secreção do TNF- $\alpha$  dos neutrófilos, essa ligação induz a maturação das DCs, com consequente aumento da expressão de MHC-II e das moléculas co-estimulatórias CD80, CD86, CD54 e CD40, diminuição da capacidade fagocítica e aumento da secreção de citocinas e expressão de diferentes receptores de quimiocinas (BANCHEREAU *et al.*, 2000). Essas características de ativação, em conjunto, favorecem a capacidade destas células em ativar os linfócitos (MEGIOVANNI; GLUCKMAN e BOUDALY, 2006).

Além dessa interação dependente de contato, os neutrófilos secretam fatores que induzem a maturação e quimiotaxia das DCs. Benounna e colaboradores (2003) demonstraram que o sobrenadante da cultura dos neutrófilos estimulados com *Toxoplasma*

*gondii* induz a secreção de TNF- $\alpha$  e IL-12 pelas DCs, assim como o aumento da expressão de CD40.

Ribeiro-Gomes e colaboradores (2012) demonstraram que os neutrófilos infectados com *L. major* expressam marcadores apoptóticos e são preferencialmente capturados pelas DCs, indicando que estas células adquirem parasitos preferencialmente via captura de neutrófilos infectados. Essa captura induz uma resposta imune supressora, que inibe a ativação dos linfócitos T CD4+ (RIBEIRO-GOMES *et al*, 2012).

A interação entre as células da resposta imune inata é fundamental para o direcionamento da resposta imune adaptativa, responsável pela eliminação do parasito e manutenção da memória imunológica. Sendo assim, é de fundamental importância investigar se a interação dos neutrófilos com as DCs favorece o desenvolvimento de uma resposta inflamatória capaz de eliminar a *Leishmania*.

#### 1.8 RESPOSTA DAS DCs APÓS INTERAÇÃO COM *Leishmania*

As DCs desempenham um importante papel na resistência à leishmaniose, tanto por ativar as células T CD4+ quanto por induzir a sua diferenciação em células Th1 através da secreção de IL-12. Paradigmas atuais do envolvimento de subtipos de células T são baseados nos resultados de estudos sobre resistência e suscetibilidade à *L. major* em camundongos: BALB/c respondem à infecção com produção de citocinas do tipo Th2 (IL-4 e IL-10), associadas à progressão da doença e susceptibilidade à *L. major*, enquanto C57BL/6, uma linhagem mais resistente, é capaz de polarizar uma resposta do tipo Th1, resultando na ativação de macrófagos e morte dos parasitos (SUZUE *et al*, 2008). Diversos estudos têm sido conduzidos com as diferentes espécies de *Leishmania* e DCs, no entanto, os resultados ainda permanecem controversos. Diferenças no estágio do parasito, espécie ou cepa e a fonte das DCs podem explicar as divergências desses estudos (GHOSH e BANDYOPADHYAY, 2004).

Já foi demonstrado que as DCs murinas infectadas com *L. braziliensis* aumentam a expressão de marcadores de superfície, tais como o CD86 e secretam IL-12 e TNF- $\alpha$  (CARVALHO; PEARCE e SCOTT, 2008). No entanto, as DCs em cultura que entraram em contato com a *L. braziliensis*, mas não foram infectadas (*bystander*), apresentaram maior expressão de CD80, CD86 e MHC-II e produção de IL-12 quando comparadas com as células infectadas. Além disso, as células *bystander* também demonstraram maior capacidade em ativar células T CD4 quando comparadas com a capacidade de apresentação de antígenos das

células infectadas (CARVALHO; PEARCE e SCOTT, 2008; VARGAS-INCHAUSTEGUI e XIN; SOONG, 2008). Resende e colaboradores (2013) observaram resultados semelhantes com *L. infantum*: DCs não infectadas apresentaram níveis mais altos de IL-12 e de moléculas co-estimulatórias, enquanto as DCs infectadas expressaram níveis mais baixos de moléculas co-estimulatórias e níveis mais altos de IL -10. Esses achados corroboram a hipótese de que DC não infectadas e infectadas por *Leishmania* podem agir conjuntamente para promover uma resposta imune contra o parasita: enquanto DCs não infectadas podem levar a ativação de células T, a produção de TNF- $\alpha$  por DCs infectadas pode contribuir com o controle da proliferação de parasitas no local da infecção (visto em TIBURCIO *et al*, 2019).

Por sua vez, a infecção das DCs pela *L. amazonensis* inibe sua maturação, com consequente redução da expressão de CD1a e CD80 na superfície e redução na secreção de IL-6, causando um atraso na resposta imune, o que pode favorecer a sobrevivência do parasito (FAVALI *et al.*, 2007). Sendo assim, a modulação da ativação das DCs pela *Leishmania* parece ser espécie-específica (GHOSH e BANDYOPADHYAY, 2004).

DCs expressam ampla variedade de PRRs (Receptores de Reconhecimento Padrão) que reconhecem os patógenos através dos PAMPs (Padres Moleculares Associados a Patógenos), que podem variar entre as espécies de *Leishmania*. Já foi visto que camundongos *knock-out* para MyD88 são mais susceptíveis à infecção por *L. major* (DE VEER *et al*, 2003) e *L. braziliensis* (VARGAS-INCHAUSTEGUI *et al*, 2009). A neutralização de TLR2 e TLR4 *in vivo* reduz a expressão de moléculas co-estimulatórias nas DCs infectadas por *L. major* (KOMAI-KOMA, M. *et al*, 2014), enquanto a falta de TLR2 nos camundongos infectados por *L. braziliensis* pode resultar na ativação das DCs, com aumento da produção de IL-12 e maior capacidade em estimular células T CD4+ *in vitro* (VARGAS-INCHAUSTEGUI *et al*, 2009). Já foi visto também que TLR9 é importante para a liberação de IL-12 pelas DCs expostas *in vitro* a *L. major* e *L. braziliensis* e *in vivo* por *L. major* (LIESE *et al*, 2007; SCHLEICHER *et al*, 2007).

Sabe-se que a *Leishmania* pode interferir em diversas vias de sinalização de macrófagos e DCs dependentes de Ca<sup>2+</sup> intracelular, PKC, NF- $\kappa$ B, JNK e MAPK (OLIVIER *et al*, 2005). A *Leishmania* é capaz de inibir a fosforilação de JAK1, JAK2 e STAT1 nos macrófagos, comprometendo assim sua capacidade de produzir de IFN- $\gamma$  (NANDAN e REINER, 1995). Trabalhos feitos com amastigota de *L. amazonensis* (MARTINY *et al*, 1999) e de *L. donovani* (NANDAN; LO e REINER, 1999) mostraram que esses parasitos são capazes de interferir na fosforilação de ERK1/2 MAP kinase, também comprometendo a

produção de IFN- $\gamma$  e geração de NO (OLIVIER *et al*, 2005). Além disso, a *Leishmania* pode ativar moléculas que inibem as cascatas de sinalização intracelular, além de interferir também na concentração de cálcio intracelular e ativação de PKC (OLIVIER *et al*, 2005). Monócitos humanos infectados por *L. donovani* apresentaram atividade reduzida de PKC, o que se mostrou importante para a sobrevivência do parasito e cronicidade da infecção (OLIVIER, BROWNSEY e REINER, 1992). Figueiredo e colaboradores (2017) demonstraram que a inibição de DCs murinas pela *L. amazonensis* é dependente da ativação do receptor A<sub>2B</sub> de adenosina, produção de AMPc, ativação de PI3K e fosforilação de ERK1/2.

### 1.9 CÉLULAS DENDRÍTICAS, *Leishmania* E SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA

Células dendríticas expressam na sua superfície ectonucleotidases e receptores para ATP e adenosina (ADDI *et al*, 2008; NOVITSKIY *et al*, 2008; WILSON *et al*, 2009) e, conseqüentemente, são sensíveis aos nucleotídeos e nucleosídeos presentes no meio extracelular.

ATP extracelular é secretado em situações de dano celular e/ou tecidual e induz uma resposta inflamatória caracterizada pela produção de IL-12 e TNF (LA SALA *et al*, 2003). Uma vez secretado, esse nucleotídeo estimula a adesão, migração e ativação dos neutrófilos e macrófagos (BOURS *et al*, 2006), maturação de DCs com perfil de resposta Th1 (BOURS *et al*, 2006; LA SALA *et al*, 2003), bem como ativação e proliferação de linfócitos (Bours *et al*, 2006). O produto final do catabolismo do ATP é a adenosina, uma molécula imunomodulatória que inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias e induz a secreção de IL-10 (BOURS *et al*, 2006; DEAGLIO *et al*, 2007; KUMAR e SHARMA, 2009)

As concentrações extracelulares de ATP e adenosina são controladas pelas enzimas ENTPDase (do ingles *Ecto-Nucleotide Diphosphohydrolases*), que compõem um grupo de 8 enzimas, dentre as quais, 4 são ancoradas à membrana e possuem sítio catalítico voltado para a face extracelular (NTPDase 1, 2, 3 e 8). A NTPDase 1 (ou CD39) catalisa o processo metabólico extracelular de conversão do ATP em ADP (adenosina difosfato) e posteriormente em AMP (adenosina monofosfato). O AMP é então degradado em adenosina pela ação da enzima 5'-nucleotidase (CD73) (MARKO e SIRPA, 2005; SITKOVSKY, 1998). A ação combinada do CD39 e CD73 é essencial para controlar os níveis extracelulares de ATP e adenosina (KUMAR e SHARMA, 2009). Tanto a ENTPDase quanto a 5'-nucleotidase estão presentes em diversos tipos celulares. O CD39 é expresso nos linfócitos B e T, células de Langherans, células endoteliais, monócitos e macrófagos (SALMI, e JALKANEN, 2005). O

CD73 é expresso em altos níveis pelas células endoteliais e linfócitos (SALMI e JALKANEN, 2005). mas não é expresso pelos monócitos e granulócitos (AIRAS, L. *et al.*, 1993; AIRAS, L. *et al.*, 1995).

O ATP extracelular age nas células através da ativação de receptores purinérgicos conhecidos como receptores P2. Esses receptores são subdivididos em dois subgrupos: P2X (associados a canais iônicos) e P2Y [acoplados à proteína G (GPCR)] (ABBRACCHIO e BURNSTOCK, 1994; BURNSTOCK e KENNEDY, 1985). Dos 7 receptores P2X descritos, destaca-se o P2X7 porque além de sinalizar a presença de ATP extracelular, é capaz de mediar a secreção dessa molécula (BOURS *et al.*, 2006; BURNSTOCK, 2007). O produto final do catabolismo do ATP é a adenosina, que age nas células através da ativação de 4 subtipos de receptores: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>, que variam na afinidade, função e distribuição celular. Os receptores A<sub>2</sub> são responsáveis pela resposta anti-inflamatória da adenosina, enquanto os receptores A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub> parecem regular a ação dos receptores A<sub>2</sub> para prevenir excesso de inibição das células. Os receptores A<sub>2A</sub> têm maior afinidade pela adenosina que os receptores A<sub>2B</sub>, sugerindo que eles podem ser recrutados sequencialmente, dependendo do acúmulo de adenosina no sítio da inflamação (ABBRACCHIO e CERUTI, 2007). Ambos são acoplados à proteína G.

Além da atividade celular, já foi demonstrado que as ecto-nucleotidases também estão presentes na *L. amazonensis*, *L. tropica* e *L. infantum* (VASCONCELLOS, *et al.*, 2014; MEYER-FERNANDES *et al.*, 1997; BERREDO-PINHO, *et al.*, 2001). Peres e colaboradores (2018) demonstraram que a atividade das ectonucleotidases na *L. infantum* está diretamente associada com a infectividade dos macrófagos humanos. Freitas-Mesquita e colaboradores (2016) observaram que *L. amazonensis* possui uma enzima chamada 3'-nucleotidase / nuclease (3'NT / NU), que é capaz de hidrolisar nucleosídeos extracelulares e desempenha um papel importante na geração de adenosina extracelular e estabelecimento da infecção parasitária.

## 2. JUSTIFICATIVA

A infecção por *Leishmania* causa diferentes manifestações clínicas que dependem da espécie do parasito e resposta imune do hospedeiro. No Brasil, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* são as duas responsáveis pelas formas mais graves de leishmaniose tegumentar (difusa e mucocutânea, respectivamente) e novos estudos envolvendo essas espécies em interação com células humanas são necessários para o entendimento da doença e suas respectivas manifestações clínicas. A perspectiva de controle desta doença depende do conhecimento sobre os fenômenos que ocorrem durante a resposta imune contra a *Leishmania*. As promastigotas depositadas na pele por flebotomíneos são internalizadas também por neutrófilos, que são as células recrutadas nos momentos iniciais da infecção e essas células interagem com outras, tais como as DCs, que adquirem parasitos preferencialmente via captura de neutrófilos infectados. Essas interações celulares são cruciais para a resposta imune do hospedeiro. Sabe-se que em situações de dano celular ou tecidual, o ATP acumulado no meio extracelular desempenha funções pró-inflamatórias, mas a adenosina, que é o produto final do seu catabolismo (mediado por ectonucleotidases) possui atividade anti-inflamatória. Diante disso, buscamos avaliar a interação dos neutrófilos humanos infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* e as DCs, investigando também a participação da adenosina nesse contexto.

### **3. HIPÓTESE**

Neutrófilos infectados por *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* interagem com as DCs, podendo modular diferentemente essas células.

## 4. OBJETIVOS

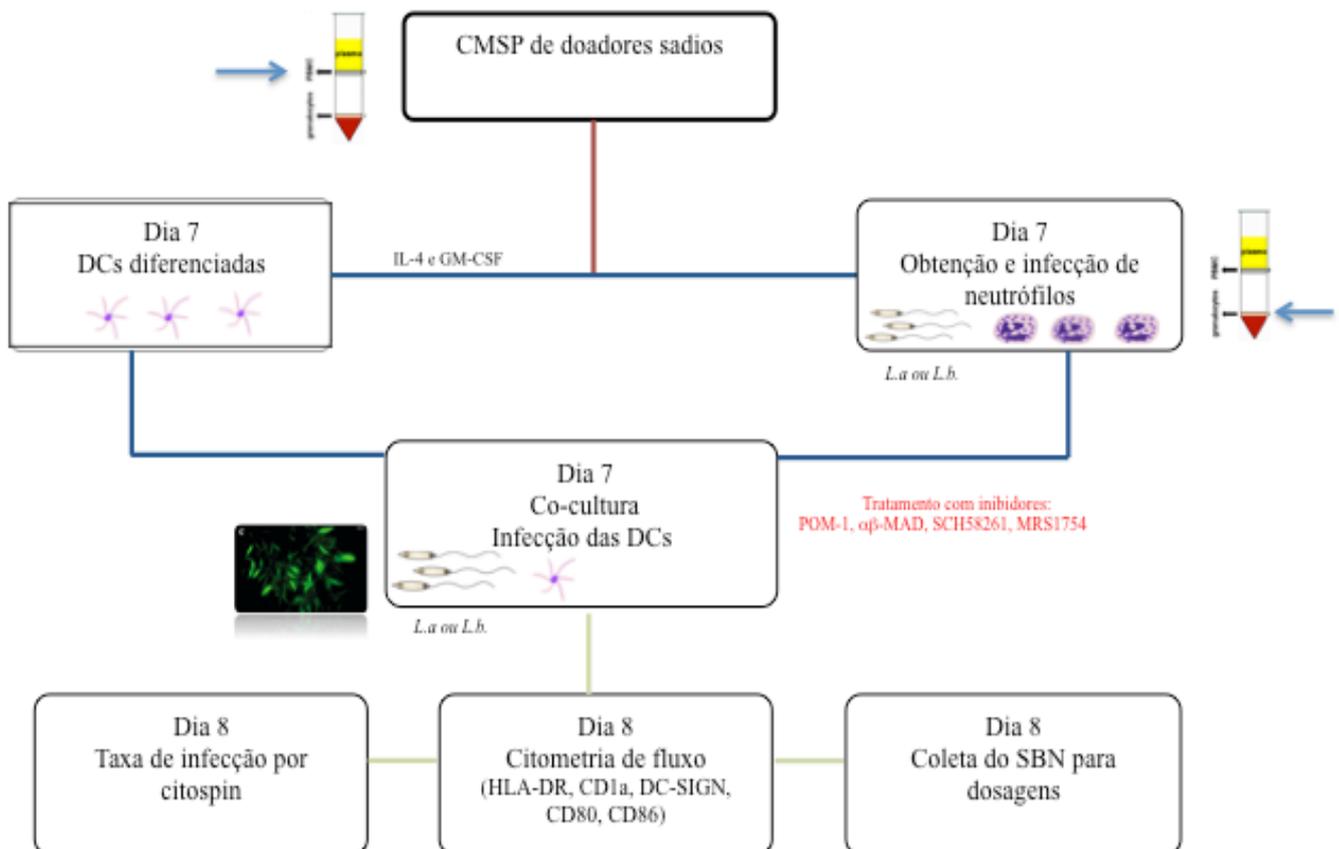
### 4.1 GERAL

Avaliar *in vitro* a resposta das DCs co-cultivadas com neutrófilos humanos infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* e a influência da adenosina nessa interação.

### 4.2 ESPECÍFICOS

- 1- Comparar a taxa de infecção das DCs infectadas diretamente com os parasitos com aquelas que os adquiriram após co-cultura com neutrófilos infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*.
- 2- Avaliar a ativação das DCs infectadas diretamente com os parasitos ou aquelas que os adquiriram após co-cultura com neutrófilos infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* através da expressão das moléculas de superfície e produção de citocinas
- 3- Comparar a expressão e atividade das ectonucleotidases e receptores de adenosina nas DCs infectadas diretamente e aquelas infectadas após co-cultura com neutrófilos infectados
- 4- Avaliar o papel das ectonucleotidases e receptores de adenosina na superfície das DCs sobre a carga parasitária das DCs
- 5- Avaliar a expressão dos receptores de adenosina após infecção por *Leishmania*
- 6- Avaliar a atividade da 3' e 5' nucleotidase dos parasitos *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

## 5. DESENHO EXPERIMENTAL

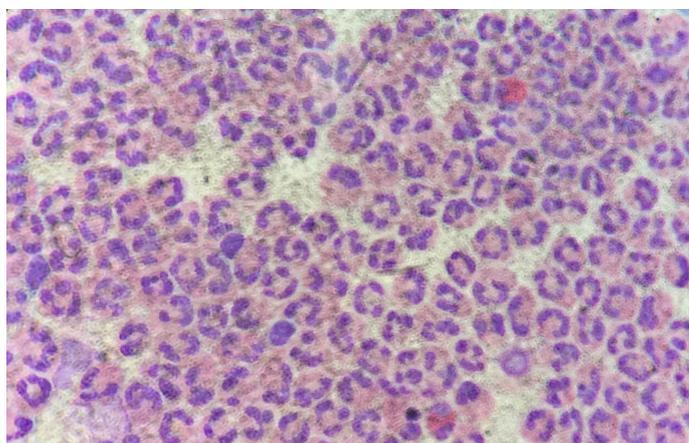


## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 OBTENÇÃO E CULTURA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS

Este projeto foi submetido ao comitê de ética do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA sendo aprovado sob a licença 100/2006, protocolo 201, sem prazo de vigência. Os neutrófilos foram obtidos a partir do sangue periférico de doadores saudáveis do Hemocentro do Estado da Bahia (HEMOBA). O sangue foi processado utilizando-se o gradiente de separação Polymorphprep, conforme instruções do fabricante (Axis-Shield Poc AS, Oslo, Noruega). Em resumo, o sangue e o gradiente foram centrifugados por 45 min a 400g a temperatura ambiente. Após a centrifugação, duas regiões são observadas: a primeira (mais superficial), constituída por células mononucleares e a segunda formada por polimorfonucleares, principalmente neutrófilos. Em seguida, os neutrófilos foram coletados e lavados três vezes com salina (NaCl a 0.9%) a 4°C por 10 min a 200g. Após a lavagem, foi feita a contagem das células em câmara de Neubauer, com uma diluição final de 100x no corante Turk. Esse método de separação permite a obtenção de uma população com cerca de 95% de neutrófilos viáveis (Figura 1).

As células foram ressuspensas na concentração de  $5 \times 10^5$ /mL e mantidas a 37°C, em 5% de CO<sub>2</sub>, em meio RPMI-1640 (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 10% de SBF, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µl/mL de estreptomicina (meio completo) (Gibco Invitrogen Corporation) para cultivo em placa de 96 poços (Corning Incorporation, Costar, NY, USA).



**Figura 2. Morfologia dos neutrófilos de doadores saudáveis após purificação.** Lâmina preparada por citospin, contendo os neutrófilos obtidos a partir do sangue periférico de doadores sadios seguindo a metodologia previamente descrita.

## 6.2 OBTENÇÃO E CULTURA DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCs)

Os monócitos foram obtidos a partir do sangue periférico de doadores saudáveis do Hemocentro do Estado da Bahia (HEMOBA). O sangue foi processado utilizando-se o gradiente de separação Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) centrifugado a 400g por 30 min em temperatura ambiente. Após a centrifugação, forma-se um anel composto por células mononucleares que foi coletado e lavado 3 vezes com salina a 4°C em 200g. Para diferenciação em DCs, as células mononucleares passaram por coluna de separação magnética para isolamento de células CD14<sup>+</sup> (monócitos), que foram cultivadas por 7 dias na concentração de  $1 \times 10^6$ /mL em meio completo na presença de IL-4 (400ng/mL) e GM-CSF (200ng/mL; ambos da PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) em placa de 24 poços. A cada 3 dias de cultura, 250 µL deste meio contendo as citocinas foi repostado. Ao final a diferenciação, as células são retiradas das placas através de lavagem com salina, contadas em câmara de Neubauer e a co-cultura realizada em placa de 96 poços, em uma proporção de 1 DC ( $10^5$ ) para cada 5 neutrófilos ( $5 \times 10^5$ ).

## 6.3 CULTIVO DE *Leishmania*

Promastigotas de *Leishmania amazonensis*-GFP (MHOM/BR/87/BA125) e *L. braziliensis*-GFP (MHOM/BR/00/BA788) expressando a proteína fluorescente verde (GFP do inglês *Green Fluorescent Protein*), foram mantidas em meio de cultura Schneider (Sigma®), suplementado com 10 % de soro bovino fetal (Cripion), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma®), em estufa a 24 °C. Após 5-7 dias de cultura as formas promastigotas foram contadas na câmara de Neubauer, com uma diluição de 100x em salina. Em todos os experimentos foram utilizados parasitos em fase estacionária (enriquecido em promastigotas metacíclicas) do cultivo.

## 6.4 INFECCÃO DE NEUTRÓFILOS *in vitro*

Os neutrófilos foram infectados em placas de 96 poços com promastigotas de *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* em fase estacionária, por 3 h com uma proporção de 5 ou 10

parasitos (respectivamente) para cada célula em meio de cultura completo a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as células foram coletadas e centrifugadas com salina a 100 g para remoção dos parasitos não internalizados. Em alguns experimentos foram preparadas lâminas por citocentrifugação, que foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para determinação de alguns parâmetros, tais como avaliação da quantidade de parasitos dentro das células e aspecto celular. Com os resultados obtidos, foi possível avaliar o número de neutrófilos infectados, que foi determinado pela proporção de células infectadas em 100 neutrófilos e a carga parasitária, número total de parasitos encontrados nas 100 células contadas. Para definirmos a quantidade de parasitos por célula, inicialmente fizemos um ensaio de padronização e observamos que as taxas de 5:1 (5 *L. braziliensis* : 1 neutrófilo) e 10:1 (10 *L. amazonensis* : 1 neutrófilo) resultavam em aproximadamente 60% de neutrófilos infectados. Seguimos os experimentos mantendo essa mesma relação. Para as DCs, utilizamos a proporção de 10:1 para as duas espécies, seguindo dados da literatura (FAVALI *et al*, 2007; CARVALHO *et al*, 2008; FIGUEIREDO *et al*, 2012). Em alguns experimentos os neutrófilos foram tratados com POM-1 (5 µM; Tocris) ou αβ-MAD (5 µM; Sigma-Aldrich) por 30 min antes da infecção para bloqueio das enzimas CD39 ou CD73, respectivamente.

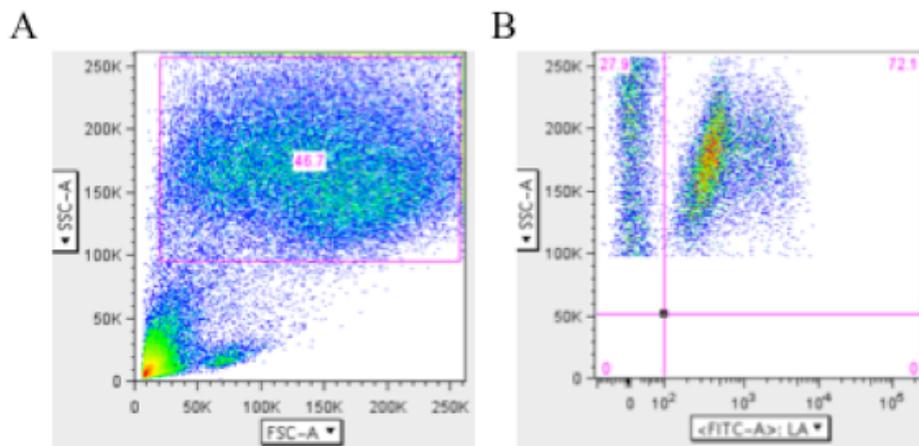
Para comparar a porcentagem de neutrófilos apoptóticos após exposição por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* após 3 h de interação, essas células foram incubadas com os marcadores Anexina-V-PE e PI (kit de detecção para apoptose, BD Bioscience) para análise por citometria de fluxo (FACSCalibur). Para cada condição foram adquiridos 100.000 eventos dentro do gate da população de neutrófilos.

Para avaliar a expressão das enzimas, após 3 h de infecção por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, os neutrófilos foram coletados e marcados com anticorpos anti-CD39 e anti-CD73 (1:100) (ambos da eBioscience, San Diego, CA, USA) e avaliados por citometria de fluxo.

## 6.5 INFECÇÃO DAS DCs OU CO-CULTURA COM NEUTRÓFILOS INFECTADOS

Após a infecção dos neutrófilos por 3 h, essas células foram lavadas e ressuspensas em um novo meio contendo as DCs (5 neutrófilos: 1 DC) por 24 h a 37° C, com 5% de CO<sub>2</sub>. Além disso, DCs diferenciadas também foram infectadas diretamente com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* por 24 h para compararmos com os efeitos da infecção após co-cultura. Após o período de infecção, as DCs foram avaliadas para sua expressão de marcadores de superfície, tais como DC-SIGN, CD1a, HLA-DR, e CD80 e CD86 (anticorpos conjugados à ficoeritrina,

adquiridos da BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) ou CD39 e CD73 (ambos da eBioscience, San Diego, CA, USA) por citometria de fluxo. Inicialmente, a população de DCs foi identificada por um *gate* (Figura 3 A), depois selecionamos as células vivas (não marcadas pelo anticorpo Live/Dead) e dentro dessa população separamos as células GFP+ (que correspondem às células que foram infectadas pela *Leishmania* que expressa a proteína fluorescente verde; Figura 3 B). As compensações para determinação das populações positivas e negativas foram feitas através das marcações com beads. Citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, e TNF- $\alpha$  foram avaliadas nos sobrenadantes dos cultivos por *Cytometric Bead Array* (CBA) após 24 h de infecção das DCs ou cocultivo com neutrófilos infectados. Em alguns experimentos foram adicionados os antagonistas SCH58261 (1 ou 5  $\mu$ M; Sigma-Aldrich) ou MRS1754 (de 1 a 5  $\mu$ M; Sigma-Aldrich) dos receptores A<sub>2A</sub> ou A<sub>2B</sub> de adenosina, respectivamente, na presença ou não da adenosina. Em outros experimentos, utilizamos os inibidores POM-1 (5  $\mu$ m; Tocris) e  $\alpha\beta$ -MAD (5  $\mu$ M; Sigma-Aldrich) para bloqueio das enzimas CD39 e CD73, respectivamente. Para avaliação da taxa de infecção e carga parasitária das DCs infectadas diretamente *versus* co-cultivadas com neutrófilos infectados foi feita a citocentrifugação e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina. A contagem de 100 células por cada lâmina foi feita manualmente em microscópio óptico.



**Figura 3. Estratégia de *gate* para análise das moléculas co-estimulatórias nas DCs.** As DCs obtidas a partir de monócitos do sangue periférico de doadores saudáveis foram infectadas ou cultivadas com neutrófilos infectados e após 24h de incubação as células foram analisadas por citometria de fluxo. A população de DCs foi isolada pelo *gate* representado na figura A e a população de células infectadas (GFP+) foi isolada como representado na figura B.

## 6.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA 3' e 5'NUCLEOTIDASE

A atividade da 3'nucleotidase foi determinada medindo a taxa de produção de fosfato inorgânico (Pi) utilizando 3'-AMP como substrato, seguindo o protocolo de Freitas-Mesquita *et al*, 2016. Promastigotas intactas de *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* ( $1,0 \times 10^7$  células / mL) foram incubadas a 25°C por 1h em 0,5 mL de uma mistura contendo 116,0 mM de NaCl, 5,4 mM de KCl, 5,5 mM de D-glicose, tampão HEPES 50,0 mM (pH 7,4) e 3,0 mM do 3'-AMP como substrato. As reações foram interrompidas pela adição de 1,0 mL de carvão ativo em HCl 0,1N. Para descartar a contaminação por Pi, a suspensão de carvão foi lavada pelo menos 20 vezes com HCl 0,1N antes de ser usada. Os tubos foram então centrifugados (1500xg, por 20 min, a 4°C) e alíquotas de 0,1 mL do sobrenadante foram adicionadas a 0,1 mL do reagente de Fiske & Subbarow (1925). A concentração de Pi produzida na hidrólise de 3'-AMP foi medida espectrofotometricamente a 650 nm, usando KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> como padrão de Pi. A atividade 3'-nucleotidásica foi calculada a partir da subtração da hidrólise de 3'-AMP não-específica, medida na ausência de células. As atividades da 5'NT foram avaliadas sob as mesmas condições experimentais usadas para determinar a atividade da 3'NT, exceto pela substituição de 3'-AMP por 5'-AMP. (FREITAS-MESQUITA *et al*, 2016).

## 6.7 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

DCs foram infectadas com *L. amazonensis* ou co-cultivadas com neutrófilos infectados por esse parasito, conforme descrito anteriormente. Alternativamente, DCs foram incubadas com MRS1754 5 µM ou SCH58261 5 µM. Resumidamente, após o período de infecção, as células foram fixadas com formaldeído 4%, permeabilizadas com PBS pH 7,2 / 0,2% Triton X-100 e incubadas com solução de bloqueio (PBS pH 7,2 / 3% BSA / 5% soro humano). Foram então expostas aos dois anticorpos de interesse: anticorpo de cobaia anti-receptor de adenosina A<sub>2A</sub> ou anticorpo de coelho anti-receptor de adenosina A<sub>2B</sub> (ambos da Alomone Labs, Jerusalém, Israel) (ambos na proporção 1:100). Após essa marcação, foram incubadas com o anticorpo secundário (AF-546-Life Technologies) e posteriormente com DAPI para marcação do núcleo das células. As laminulas com as células foram montadas com ProLong (Labeling & Detection- Invitrogen) e examinadas ao microscópio de fluorescência Leica DMi8. A microscopia confocal foi realizada na Fundação Oswaldo Cruz (Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, IOC, RJ), e as imagens foram analisadas utilizando o programa de imagens

LAS AF.

## 6.8 QUANTIFICAÇÃO DE ATP NO SOBRENADANTE DA INTERAÇÃO ENTRE NEUTRÓFILOS E *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis*

Neutrófilos foram expostos a *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* durante 3 horas. Após esse período, o sobrenadante dessas culturas foi coletado e o ATP foi quantificado usando o kit “Adenosine 5'-triphosphate (ATP) bioluminescent somatic cell assay” (Sigma-Aldrich). Resumidamente, 20 µL dos sobrenadantes foram transferidos para tubos MTS-11C (Axygen) contendo 20 µL de “ATP assay mix” e misturadas por 10 segundos. A quantidade total de luz emitida foi medida pelo sistema de detecção Glomax Multi JR (PROMEGA). A quantificação total de ATP extracelular foi calculada usando uma curva padrão de ATP diluído em meio RPMI e analisada em cada experimento

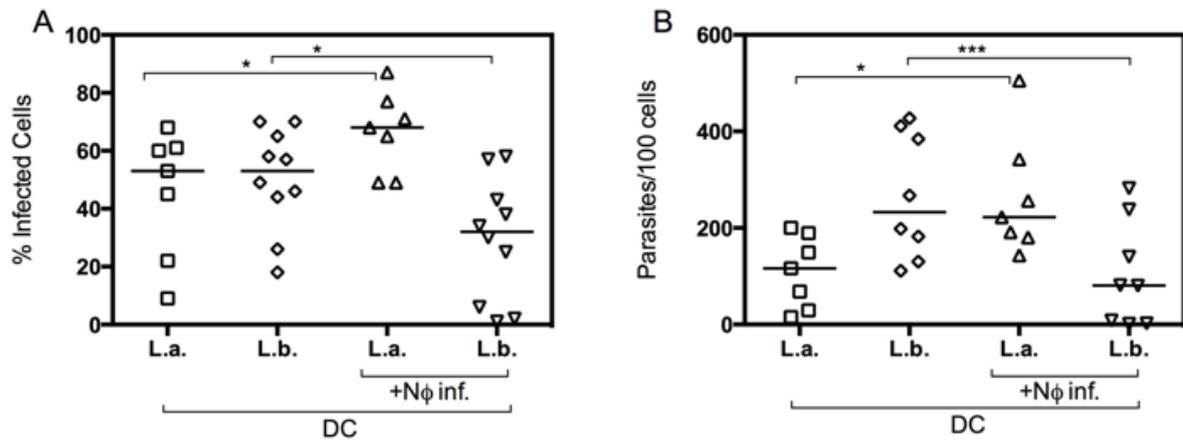
## 6.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa Prism versão 5.0 (GraphPad Software®). Os dados representam as medianas obtidas em cada condição. As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando o teste não paramétrico One-way ANOVA Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para as análises de mais de 2 amostras e o teste t não paramétrico de Mann-Whitney para as outras comparações entre 2 amostras. Todos os experimentos foram realizados com pelo menos três repetições e valor de  $p < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 DIFERENTES TAXAS DE INFECÇÃO DAS DCs NA PRESENÇA DE NEUTRÓFILOS INFECTADOS POR *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*

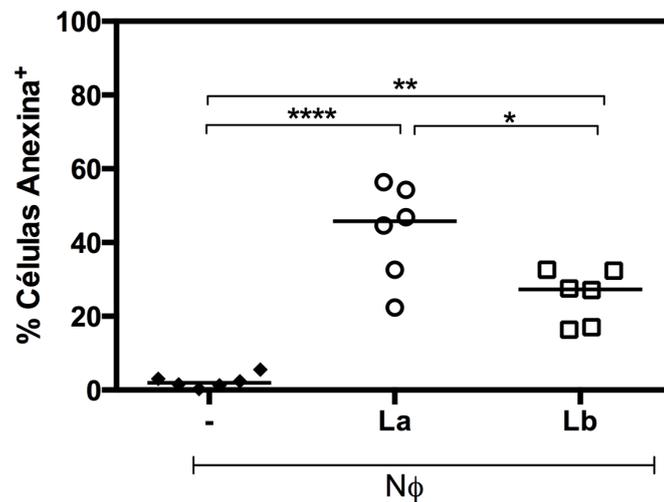
DCs diferenciadas com IL-4 e GM-CSF foram infectadas com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* (10 parasitos por DC) no 7º dia de cultivo. Neutrófilos foram isolados e infectados com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* durante 3 h e estas células foram co-cultivadas com DCs não infectadas (DC 1: 5 neutrófilos) por 24h. No dia seguinte, as células foram coletadas e as lâminas preparadas por citospin para avaliação da taxa de infecção. Assim, observamos que a taxa média de infecção das DCs por ambas as espécies de parasitos é de cerca de 50% (Figura 4 A). Além disso, na presença de neutrófilos infectados por *L. braziliensis*, a taxa média de infecção das DCs é reduzida para aproximadamente 30% (Figura 4 A), enquanto que na presença de neutrófilos infectados por *L. amazonensis*, esta mediana aumentou para aproximadamente 70% (Figura 4 A). O número de amastigotas nas DCs foi significativamente reduzido na presença de neutrófilos infectados por *L. braziliensis* (Figura 4 B) e significativamente maior na presença de neutrófilos infectados por *L. amazonensis* (Figura 4 B). Importante ressaltar que esses neutrófilos tinham o mesmo percentual de infecção e número de parasitos/célula, bem como o mesmo perfil de ativação (secreção de MPO, MMP-9, LTB4, ROS, citocinas e expressão de moléculas co-estimulatórias) (dados não mostrados). Previamente, caracterizamos a ativação dos neutrófilos humanos diante da infecção por *L. braziliensis* (Dissertação Martha Suarez, 2015- não publicada) e obtivemos perfil de ativação e taxa de infecção semelhantes aos neutrófilos expostos a *L. amazonensis*, como visto por Tavares e colaboradores (2014). Seguimos os experimentos mantendo as mesmas proporções parasito:célula utilizados nesses trabalhos, para assegurar que os neutrófilos co-cultivados com as DCs tinham o mesmo perfil de ativação e percentual de infecção.



**Figura 4. Diferentes taxas de infecção das DCs na presença de neutrófilos infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*.** DCs cultivadas por 7 dias na presença de IL-4 e GM-CSF foram infectadas com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* (ambas com 10 parasitos / célula) ou cultivadas na presença de neutrófilos infectados com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* (5 neutrófilos: 1 DC). A taxa de infecção (A) e o número de parasitas / 100 células (B) foram avaliados em lâminas preparadas por citospin após 24h de cultivo. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  pelo teste t não paramétrico de Mann-Whitney.

## 7.2 AVALIAÇÃO DA APOPTOSE EM NEUTRÓFILOS EXPOSTOS A *L. amazonensis* OU *L. braziliensis*

Para comparar a porcentagem de células apoptóticas após exposição por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* após 3 h de interação, essas células foram incubadas com os marcadores Anexina-V-PE e PI para análise por citometria de fluxo. Observamos um aumento significativo na porcentagem de neutrófilos apoptóticos quando expostos a *L. amazonensis* em relação ao controle (neutrófilos sem infecção) e aqueles expostos a *L. braziliensis*, sugerindo que *L. amazonensis* induz uma maior porcentagem de células apoptóticas em relação a *L. braziliensis*. Não houve diferença significativa quando avaliamos a porcentagem de células necróticas (PI) (dados não mostrados).



**Figura 5. Avaliação da apoptose em neutrófilos infectados por *L. amazonensis* (La) ou *L. braziliensis* (Lb).** Neutrófilos foram infectados com La ou Lb durante 3 h e a morte celular foi avaliada pela marcação com Anexina V por citometria de fluxo. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  teste t não paramétrico de Mann-Whitney. (-) Neutrófilos mantidos nas mesmas condições, porém não infectados.

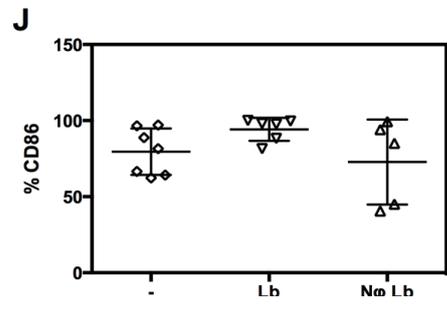
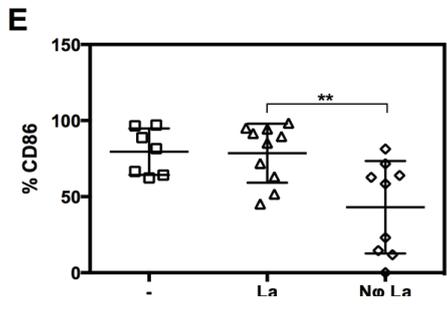
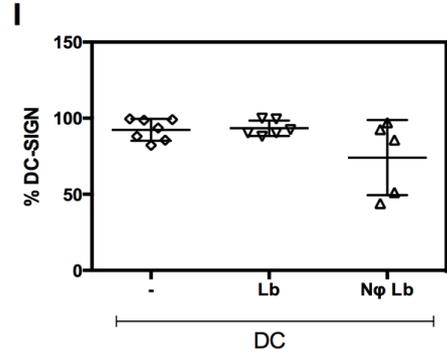
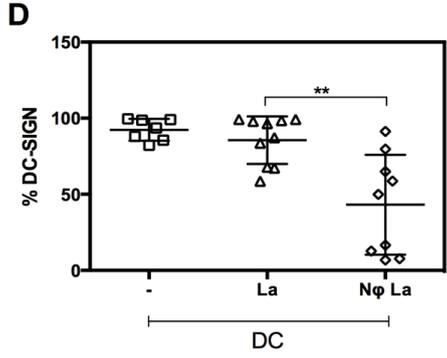
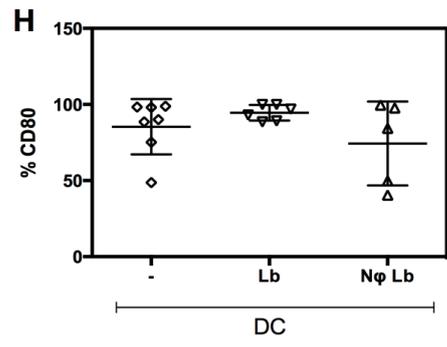
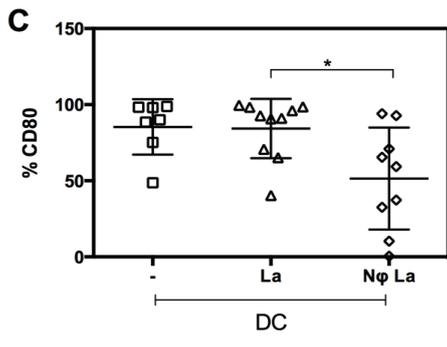
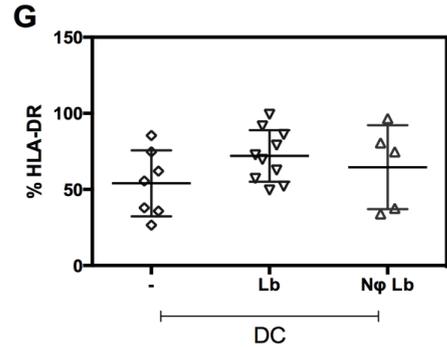
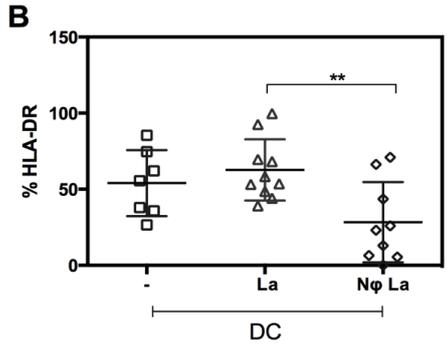
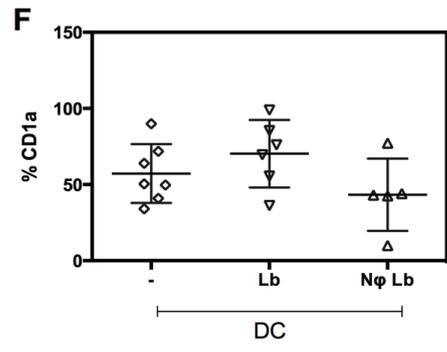
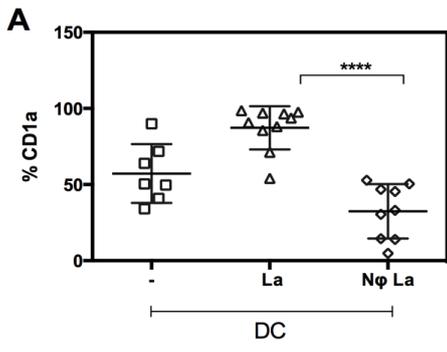
### 7.3 FREQUÊNCIA DOS MARCADORES DE SUPERFÍCIE EM DCs CO-CULTIVADAS COM NEUTRÓFILOS (NØ) HUMANOS INFECTADOS POR *L. amazonensis* (La) OU *L. braziliensis* (Lb)

A frequência de marcadores de superfície foi avaliada por citometria de fluxo em DCs infectadas com *L. amazonensis-GFP* ou *L. braziliensis-GFP* ou co-cultivadas com neutrófilos infectados por ambos os parasitos. Inicialmente, a população de DCs foi isolada por tamanho e granulosidade e todas as análises feitas dentro da população GFP+ (células infectadas, como representado na figura 3). Assim, foi observada uma redução significativa na expressão de CD1a, HLA-DR, DC-SIGN, CD80 e CD86 (Figura 6 A-E) nas DCs co-cultivadas com neutrófilos infectados por *L. amazonensis*, mas não infectadas por neutrófilos contendo *L. braziliensis* (Figura 6 F-J), em comparação com DCs infectadas diretamente com os respectivos parasitos.

Figura na próxima página

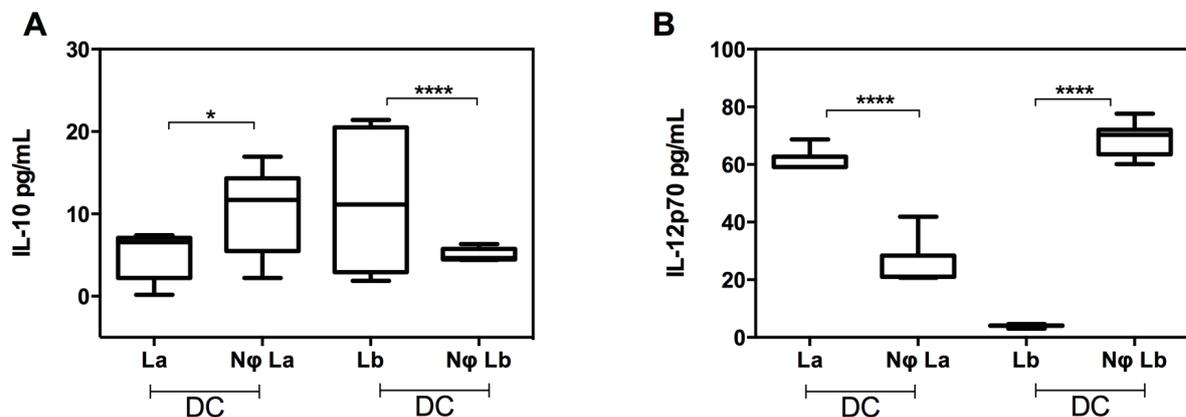
---

**Figura 6. Frequência dos marcadores de superfície em DCs co-cultivadas com neutrófilos (NØ) infectados por *L. amazonensis* (La) ou *L. braziliensis* (Lb).** DCs infectadas por La ou Lb ou cultivadas com neutrófilos infectados por esses parasitos foram avaliadas quanto à expressão de CD1a (A), HLA-DR (B), DC-SIGN (C), CD80 (D) e CD86 (E) por citometria de fluxo no oitavo dia de cultivo. \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001 pelo teste t não paramétrico de Mann-Whitney. (-) DCs mantidas nas mesmas condições, porém não infectadas.



#### 7.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS NO SOBRENADANTE DAS DCS CO-CULTIVADAS COM NEUTRÓFILOS INFECTADOS.

Os sobrenadantes das co-culturas descritas acima foram avaliados para a produção das citocinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$  por CBA. Nossos resultados mostram que houve um aumento significativo na produção de IL-10 nas DCs co-cultivadas com neutrófilos infectados por *L. amazonensis* (DC + N $\phi$  La) comparado com as DCs infectadas diretamente por *L. amazonensis* (DC La) (Figura 7 A) e uma redução significativa na produção dessa citocina na cocultura das DCs com neutrófilos infectados por *L. braziliensis* (DC + N $\phi$  Lb) comparado com as DCs infectadas diretamente por esse parasito (DC Lb) (Figura 7 A). Por outro lado, observamos uma redução significativa na produção de IL-12 na cultura das DCs com neutrófilos infectados por *L. amazonensis* em comparação com as DCs infectadas diretamente com esse parasito (Figura 7 B), enquanto nas DCs co-cultivadas com neutrófilos infectados por *L. braziliensis*, observamos aumento significativo na produção de IL-12 comparado com DCs infectadas diretamente por *L. braziliensis* (Figura 7 B). Neutrófilos infectados com *La* ou *Lb* apresentaram níveis indetectáveis de IL-10 e IL-12p70 [dados não mostrados]. As demais citocinas não apresentaram valores detectáveis.



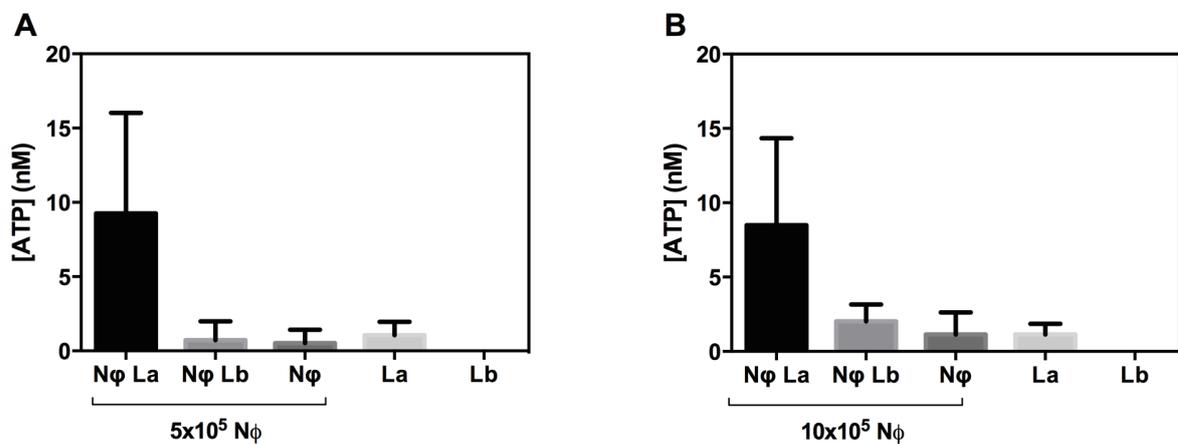
**Figura 7. Avaliação da produção de citocinas no sobrenadante das DCs co-cultivadas com neutrófilos (N $\phi$ ) infectados com *L. amazonensis* (La) ou *L. braziliensis* (Lb). O sobrenadante das culturas das DCs infectadas por La ou Lb ou cocultivadas com neutrófilos infectados por esses parasitos foi avaliado quanto a produção de IL-10 (A) e IL-12 (B) por *Cytometric Bead Array*. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001 pelo teste t não paramétrico de Mann-Whitney.**

## 7.5 CONCENTRAÇÃO DE ATP NO SOBRENADANTE DA INTERAÇÃO ENTRE NEUTRÓFILOS E *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis*

Além das citocinas, avaliamos também no sobrenadante a concentração de ATP após 3 horas de interação dos neutrófilos com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* conforme descrito na metodologia.

Sabe-se que o aumento da concentração de ATP extracelular é considerado como um sinal de perigo e funciona como um estímulo para desencadear a resposta imune celular (Gorini *et al*, 2013).

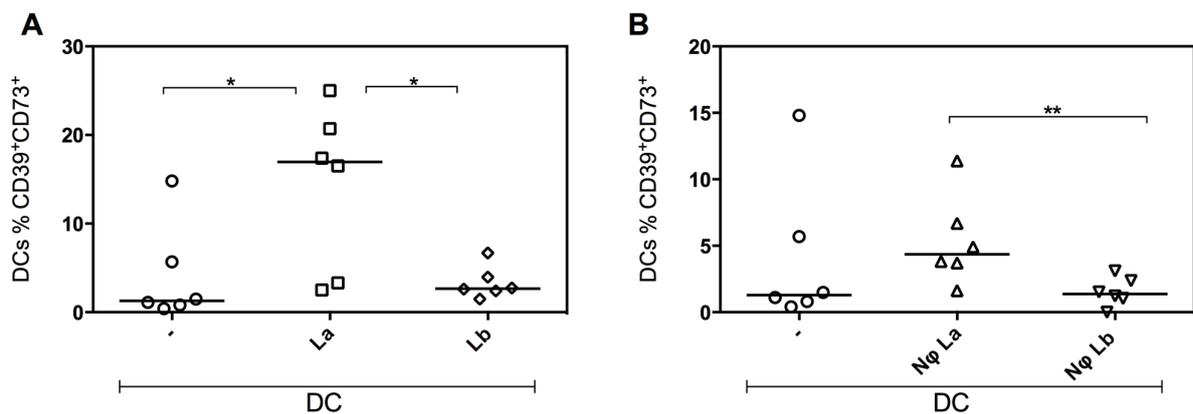
Assim, comparamos a concentração de ATP no sobrenadante dos neutrófilos expostos a *L. amazonensis* com aqueles expostos a *L. braziliensis* e observamos que aqueles expostos a *L. amazonensis* aparentemente apresentam uma concentração maior de ATP com relação aos expostos por *L. braziliensis* nas duas concentrações de neutrófilos avaliadas (Figura 8 A e B) e com relação aos controles. Esses gráficos representam a média de 3 doadores.



**Figura 8. Concentração de ATP no sobrenadante da interação entre neutrófilos e *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis*.** O sobrenadante da cultura dos neutrófilos com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* foi coletado após 3 horas de interação para avaliação da concentração de ATP, conforme descrito na metodologia. Nφ La = neutrófilos infectados por *L. amazonensis*; Nφ Lb = neutrófilos infectados por *L. braziliensis*; Nφ = neutrófilos sem estímulo; La = *L. amazonensis*; Lb = *L. braziliensis*. n=3.

## 7.6 AUMENTO NA FREQUÊNCIA DE ECTONUCLEOTIDASES NAS DCs APÓS INFECÇÃO POR *Leishmania amazonensis* MAS NÃO POR *Leishmania braziliensis*

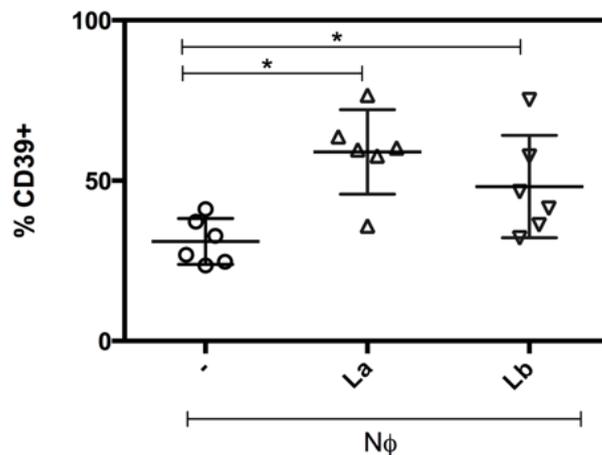
Com base nas observações de que as DCs expressam ectonucleotidases em sua superfície, (BERCHTOLD *et al.* 1999), avaliamos a expressão de CD39 e CD73 nas DCs infectadas diretamente (A) ou infectadas via co-cultura com neutrófilos infectados (B). Nossos resultados mostram que a coexpressão de CD39 e CD73 foi significativamente aumentada em DCs infectadas por *L. amazonensis* em comparação com DCs não infectadas ou aquelas infectadas por *L. braziliensis* (Figura 8 A) e também significativamente maior nas DCs co-cultivadas com neutrófilos infectados por *L. amazonensis* em comparação com aquelas co-cultivadas com neutrófilos infectados por *L. braziliensis* (Figura 8 B).



**Figura 9. Aumento na frequência de ectonucleotidases nas DCs após infecção por *L. amazonensis* (La), mas não por *L. braziliensis* (Lb).** Após 7 dias de diferenciação, as DCs foram infectadas ou cocultivadas com neutrófilos infectados e após 24 h foram coletadas e avaliadas quanto à coexpressão de CD39 / CD73 por citometria de fluxo \* p <0,05; \*\* p <0,01; por teste t não paramétrico de Mann-Whitney.

### 7.7 INFECÇÃO DE NEUTRÓFILOS POR *L. amazonensis* (La) OU *L. braziliensis* (Lb) AUMENTA A FREQUÊNCIA DE CD39.

A NTPDase1 (CD39) é uma das principais ectonucleotidases expressas na superfície dos neutrófilos (CORRIDEN *et al*, 2008; KUKULSKI *et al*, 2011), mesmo em condições de repouso (PULTE *et al*, 2007). Aqui, avaliamos se a infecção por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* modula a expressão de CD39 em neutrófilos humanos. Nossos resultados mostram que neutrófilos em repouso expressam aproximadamente 30% de CD39 em sua superfície e a infecção por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* aumenta a mediana dessa expressão para aproximadamente 60% e 50%, respectivamente (Figura 9). Também avaliamos a frequência de CD73 e a mediana foi muito baixa (aproximadamente 4%), sem diferença entre neutrófilos em repouso ou infectados (dados não mostrados).



**Figura 10. Infecção de neutrófilos por *L. amazonensis* (La) ou *L. braziliensis* (Lb) aumenta a expressão de CD39.** Neutrófilos obtidos a partir do sangue periférico de doadores saudáveis foram infectados durante 3 h com *La* ou *Lb* e após esse período a expressão de CD39 foi avaliada por citometria de fluxo, dentro da população GFP+ (neutrófilos infectados). (-) Neutrófilo sem estímulo. \*  $p < 0,05$  pelo teste t não paramétrico de Mann-Whitney.

## 7.8 ECTONUCLEOTIDASES DAS DCs MODULAM A CARGA PARASITÁRIA.

As concentrações extracelulares de ATP e adenosina são controladas por enzimas como a ENTPDase (CD39), que hidrolisa o ATP ao AMP e a 5'-nucleotidase (CD73), que hidrolisa o AMP à adenosina. Ambas as enzimas estão presentes em várias populações de células, incluindo DCs (KUMAR e SHARMA, 2009).

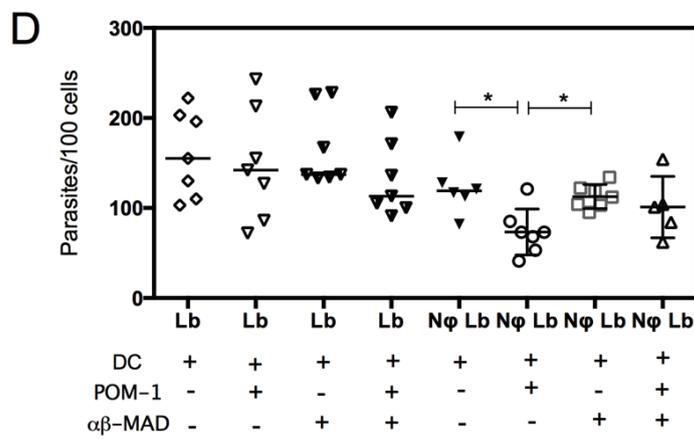
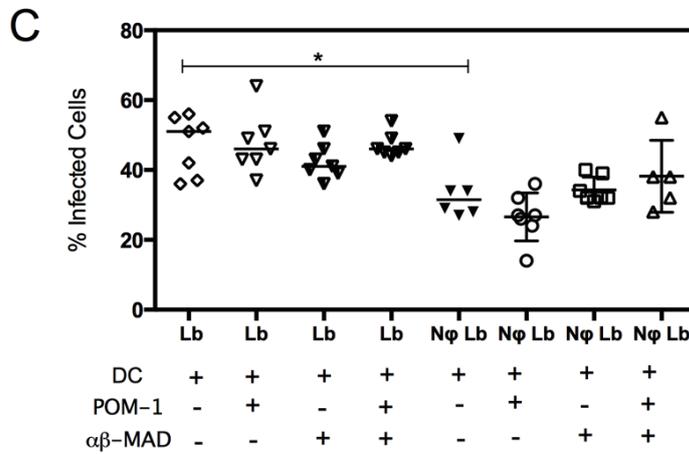
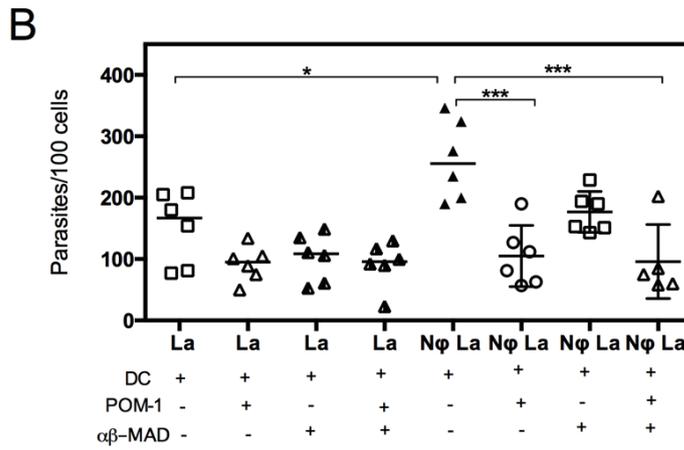
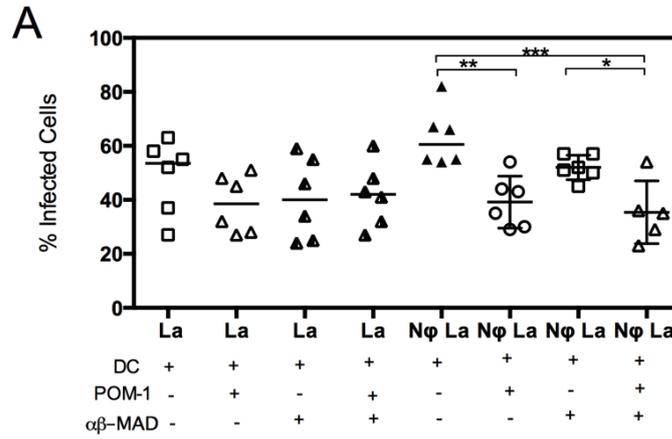
Após mostrar que a *L. amazonensis*, mas não a *L. braziliensis*, aumenta a expressão da ectonucleotidase em DCs, decidimos avaliar se o bloqueio dessas enzimas poderia reduzir a carga parasitária nas DCs. Para isso, as DCs foram tratadas com inibidor de CD39 (POM-1) ou inibidor de CD73 ( $\alpha\beta$ -MAD) durante 30 min antes da infecção com os parasitos ou cocultura com neutrófilos infectados.

Nossos resultados mostram que o bloqueio do CD39 (POM-1) nas DCs induz uma diminuição na taxa de infecção nessas células (Figura 10 A) bem como na carga parasitária (Figura 10 B), mas apenas na presença de neutrófilos infectados por *L. amazonensis*. A inibição de CD39 não afetou a taxa de infecção por *L. braziliensis* nas mesmas condições (Figura 10 C). No entanto, o tratamento com POM-1 reduziu a carga parasitária nas DCs co-cultivadas com neutrófilos infectados por *L. braziliensis*. (Figura 10 D). Não foi observada nenhuma alteração na carga parasitária após a inibição da CD73 com  $\alpha\beta$ -MAD.

Figura na próxima página

---

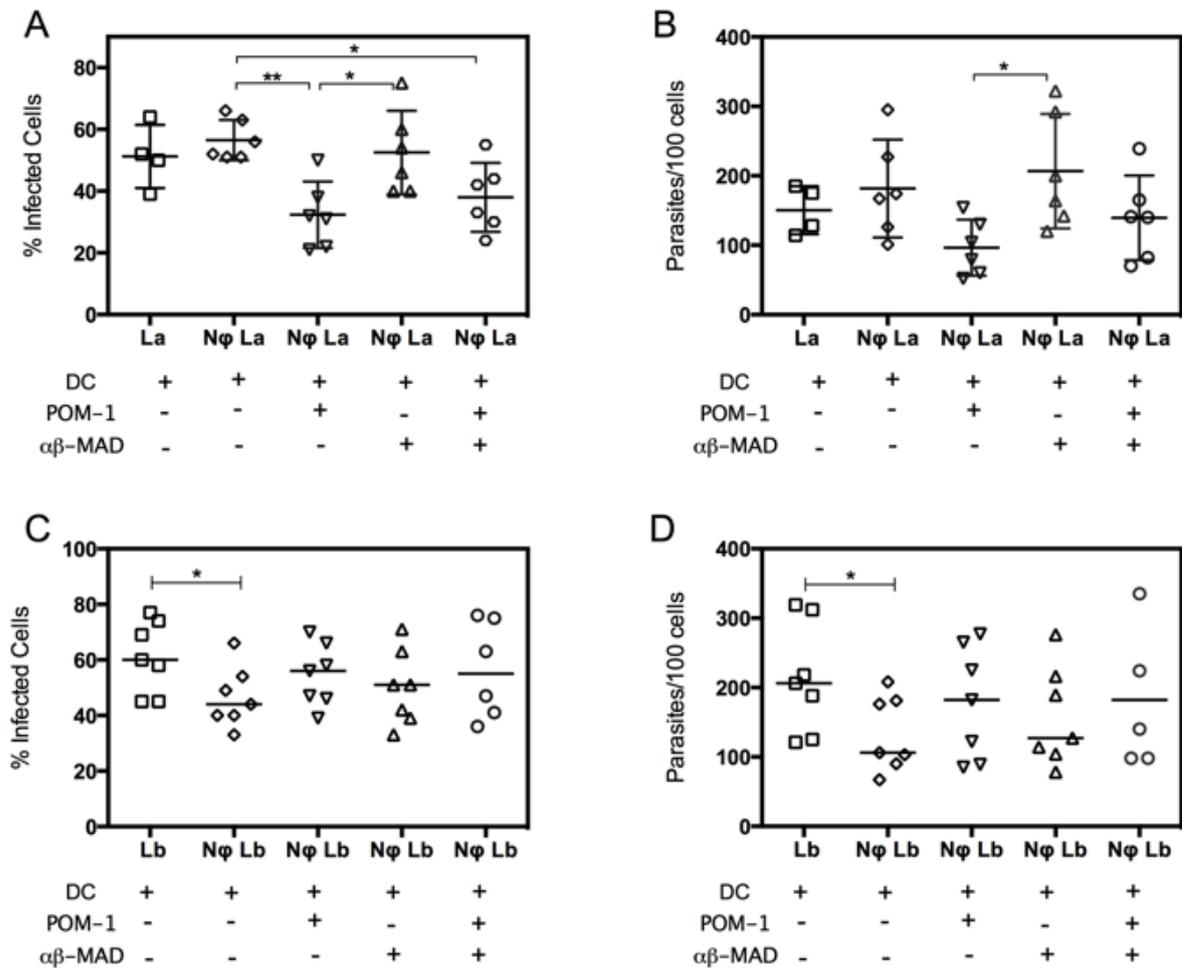
**Figura 11. Ectonucleotidases das DCs modulam a carga parasitária.** DCs foram tratadas com POM-1 ou  $\alpha\beta$ -MAD por 30 min antes da infecção com os parasitos ou co-cultura com neutrófilos infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*. A taxa de infecção (A e C) e o número de parasitos / 100 células (B e D) foram avaliados por lâminas preparadas por citospin das culturas. \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001 por one-way ANOVA com pós-teste de Dunn.



### 7.9 INIBIÇÃO DE CD39 DE NEUTRÓFILOS COM POM-1 ANTES DA INFECÇÃO POR *L. amazonensis* REDUZ A CARGA PARASITÁRIA NAS DCs.

O ATP presente no meio extracelular age em várias células. Como as enzimas que hidrolisam o ATP também estão presentes nos neutrófilos (KUMAR e SHARMA, 2009), decidimos avaliar se o bloqueio dessas enzimas nos neutrófilos também poderia influenciar a carga parasitária nas DCs após a cocultura.

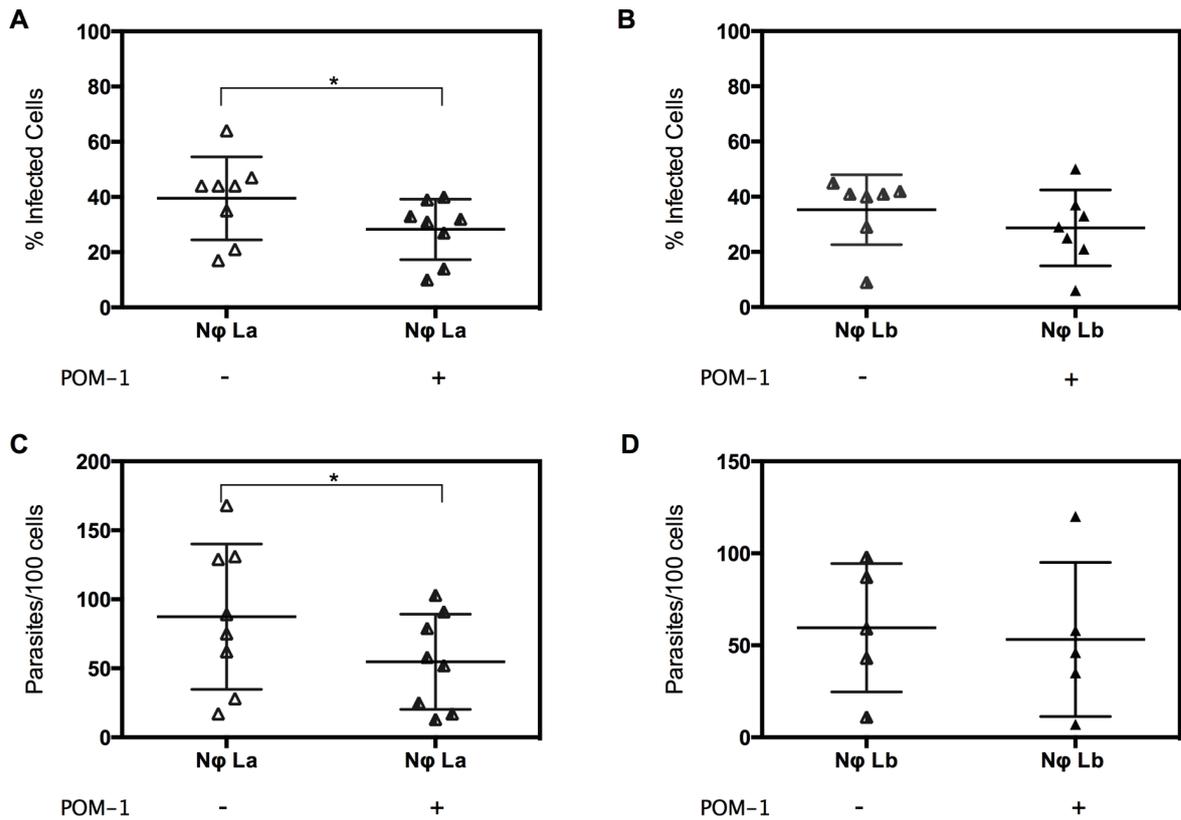
Nossos resultados mostraram que o bloqueio do CD39 (POM-1), mas não do CD73 ( $\alpha\beta$ -MAD) em neutrófilos antes da infecção por *L. amazonensis* induz uma diminuição no número de DCs infectadas (Figura 11 A), bem como na carga parasitária nestas células (Figura 11 B). O mesmo tratamento nos neutrófilos antes da infecção por *L. braziliensis* não afetou nem a taxa de infecção, nem a carga parasitária nas DC (Figuras 11 C e D).



**Figura 12. Inibição de CD39 de neutrófilos com POM-1 antes da infecção por *L. amazonensis* reduz a carga parasitária nas DCs.** Neutrófilos foram tratados com POM-1 ou  $\beta$ -MAD durante 30 min antes da infecção por *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* durante 3 h. DCs foram infectadas com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* ou co-cultivadas com neutrófilos infectados por esses parasitos por 24 h. A taxa de infecção (A e C) e o número de parasitos / 100 células (B e D) foram avaliadas após citospin das culturas. \* P <0,05; \*\* p <0,01 por análise one-way ANOVA com pós-teste de Dunn.

## 7.10 INIBIÇÃO DE CD39 EM NEUTRÓFILOS COM POM-1 REDUZ A CARGA PARASITÁRIA

Para avaliarmos o efeito do POM-1 na infecção dos neutrófilos, essas células foram tratadas com esse inibidor antes da infecção por La ou Lb e após 3 h de interação com os parasitos avaliamos a taxa de infecção e o número de parasitos por 100 células. Assim, observamos uma redução no número de neutrófilos infectados por *L. amazonensis* (Figura 12 A) e parasitos/célula (Figura 12 C), enquanto que o tratamento antes da infecção por *L. braziliensis* não influenciou nem no número de células infectadas (Figura 12 B) e nem no número de parasitos por células (Figura 12 D).



**Figura 13. Inibição de CD39 em neutrófilos com POM-1 reduz a carga parasitária.** Os neutrófilos foram tratados com POM-1 durante 30 min antes da infecção por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* durante 3 h. A taxa de infecção (A e C) e o número de parasitos / 100 células (B e D) foram avaliados por citospin das culturas \*  $P < 0,05$ ; pelo teste t não paramétrico.

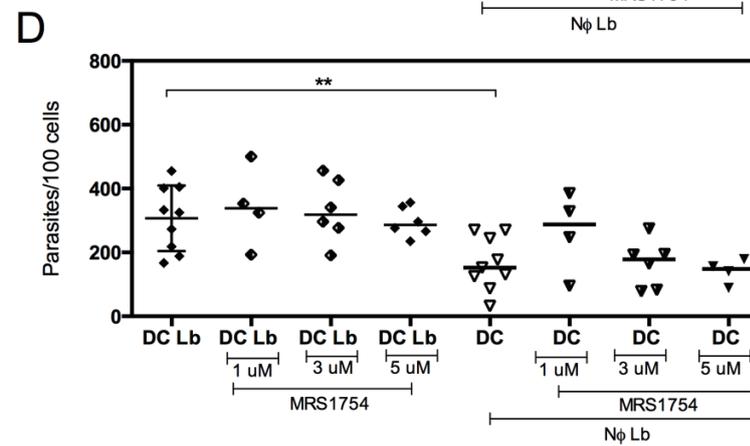
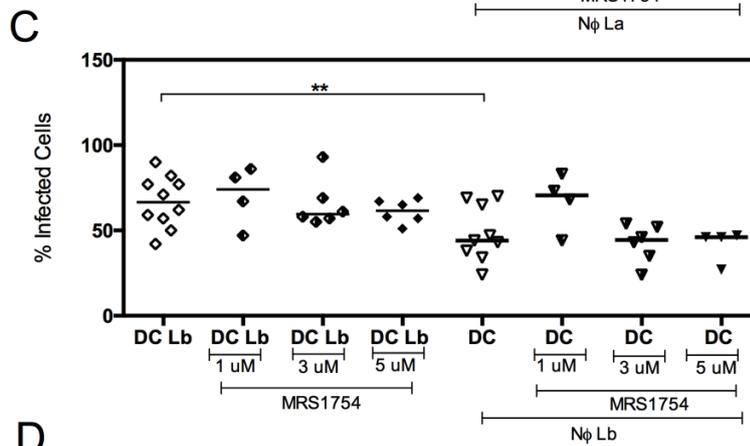
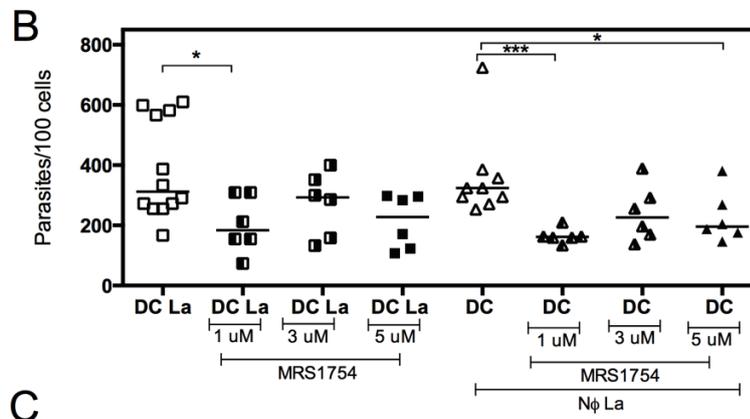
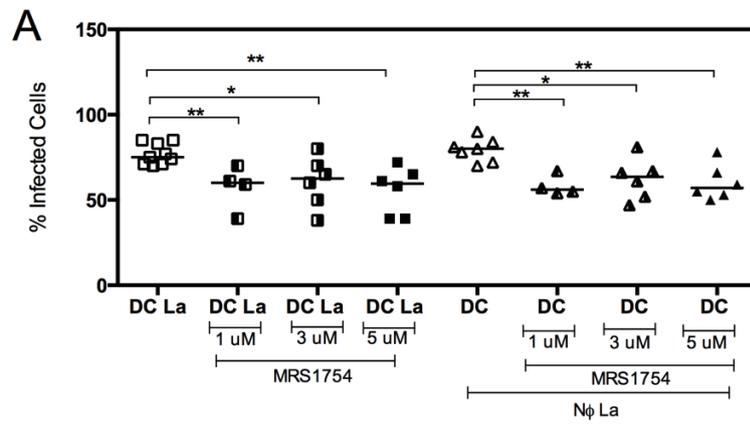
### 7.11 ANTAGONISTA DO RECEPTOR A<sub>2B</sub> DE ADENOSINA (MRS1754) REDUZ A CARGA PARASITÁRIA EM DCs INFECTADAS POR *L. amazonensis*, MAS NÃO POR *L. braziliensis*.

CD39 e CD73 atuam juntos no ATP extracelular, e o produto final dessa ação é a adenosina, que tem ação inibitória nas DCs (NOVITSKIY *et al.*, 2008). A adenosina exerce seus efeitos através de 4 subtipos de receptores, principalmente nos receptores A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub>, (HÁSKO *et al.*, 2008) que têm maior afinidade pela adenosina. Após mostrar a expressão e o efeito de CD39 e CD73 nas DCs, decidimos avaliar o efeito do receptor A<sub>2B</sub> de adenosina nessas células. Para tanto, DCs foram diretamente infectadas com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* ou cocultivadas com neutrófilos infectados, ambas as condições na presença de MRS1754, um potente antagonista do receptor A<sub>2B</sub>. Nossos dados mostraram que a inibição do receptor A<sub>2B</sub> leva à diminuição da taxa de infecção (Figura 13 A) e à carga parasitária (Figura 13 B) em DCs infectadas diretamente ou co-cultivadas com neutrófilos infectados por *L. amazonensis*. Esse mesmo tratamento não alterou a taxa de infecção nem a carga parasitária em DCs co-cultivadas com neutrófilos infectados por *L. braziliensis* (Figuras 13 C e D).

Figura na próxima página

---

**Figura 14. Antagonista do receptor A<sub>2B</sub> de adenosina (MRS1754) reduz a carga parasitária em DCs infectadas por *L. amazonensis* (*La*), mas não por *L. braziliensis* (*Lb*).** Células dendríticas foram tratadas com concentrações crescentes de MRS1754, antagonista do receptor A<sub>2B</sub> de adenosina no mesmo momento da infecção por *La* ou *Lb* ou co-cultura com neutrófilos infectados. A taxa de infecção e carga parasitária das DCs tratadas na presença de *La* (A e B, respectivamente) ou *Lb* (C e D, respectivamente) foram avaliadas no dia seguinte após citospin das culturas. \* p <0,05; \*\* p <0,01 por one-way ANOVA com pós teste de Dunn.



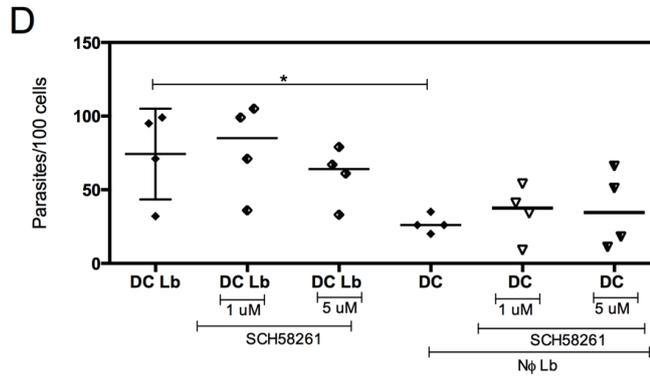
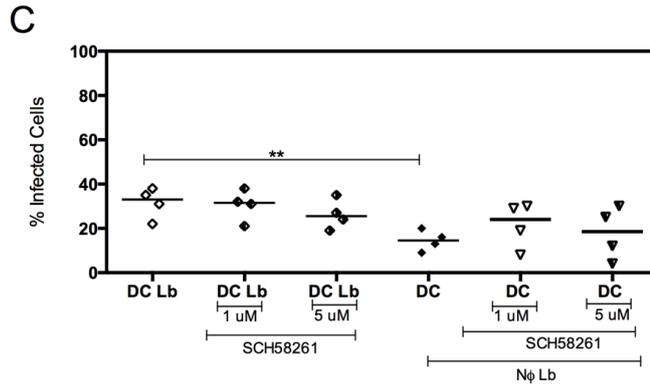
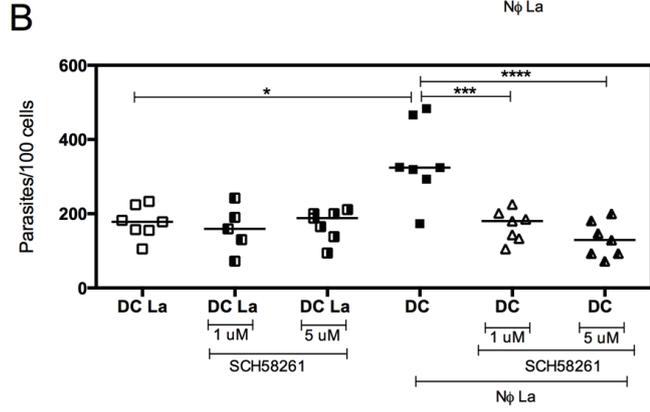
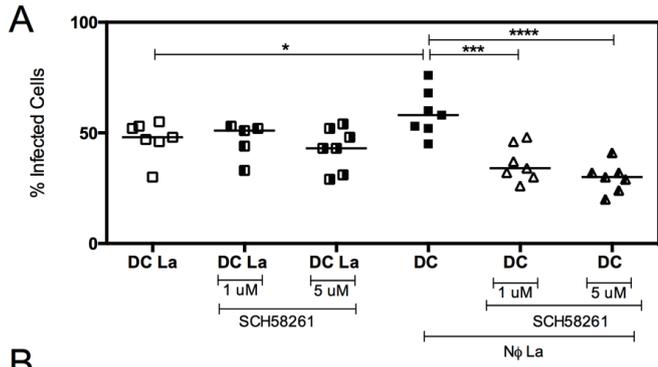
## 7.12 ANTAGONISTA DO RECEPTOR $A_{2A}$ DE ADENOSINA (SCH58261) REDUZ A CARGA PARASITÁRIA EM DCs INFECTADAS POR *L. amazonensis*, MAS NÃO POR *L. braziliensis*.

Aqui avaliamos o efeito do bloqueio do receptor de adenosina  $A_{2A}$  em DCs. Para isso, DCs foram diretamente infectadas com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* ou co-cultivadas com neutrófilos infectados, ambas as condições na presença de SCH58261, um potente antagonista do receptor  $A_{2A}$ . Nossos dados mostraram que a inibição do receptor  $A_{2A}$  leva à diminuição da taxa de infecção (Figura 14 A) e à carga parasitária (Figura 14 B) em DCs co-cultivadas com neutrófilos infectados por *L. amazonensis*. Esse mesmo tratamento não alterou a taxa de infecção nem a carga parasitária em DCs co-cultivadas com neutrófilos infectados por *L. braziliensis* (Figuras 14 C e D).

Figura na próxima página

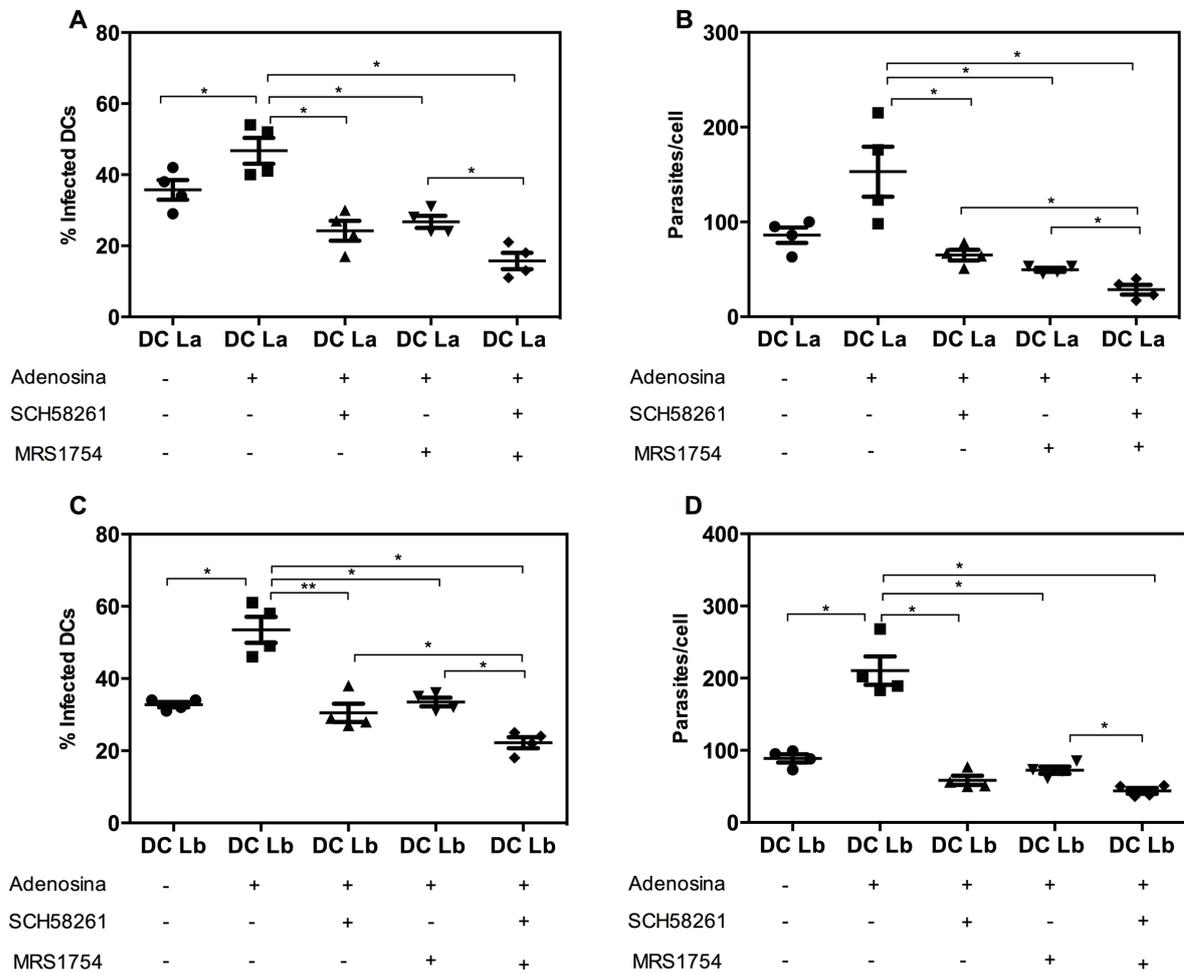
---

**Figura 15. Antagonista do receptor  $A_{2A}$  de adenosina (SCH58261) reduz a carga parasitária em DCs infectadas por *L. amazonensis* (*La*), mas não por *L. braziliensis* (*Lb*).** DCs foram tratadas com concentrações crescentes de SCH58261, antagonista do receptor  $A_{2A}$  de adenosina no mesmo momento da infecção com *La* ou *Lb* ou co-cultura com neutrófilos infectados. A taxa de infecção e carga parasitária das DCs tratadas na presença de *La* (A e B, respectivamente) ou *Lb* (C e D, respectivamente) foram avaliadas no dia seguinte após citospin das culturas. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; ; \*\*\*  $p < 0,001$  por one-way ANOVA com pós teste de Dunn.



### 7.13 ADENOSINA INDUZ AUMENTO DA CARGA PARASITÁRIA NAS DCs INFECTADAS E ESSE EFEITO É REVERTIDO PELOS INIBIDORES DOS RECEPTORES A<sub>2A</sub> (SCH58261) E A<sub>2B</sub> (MRS1754).

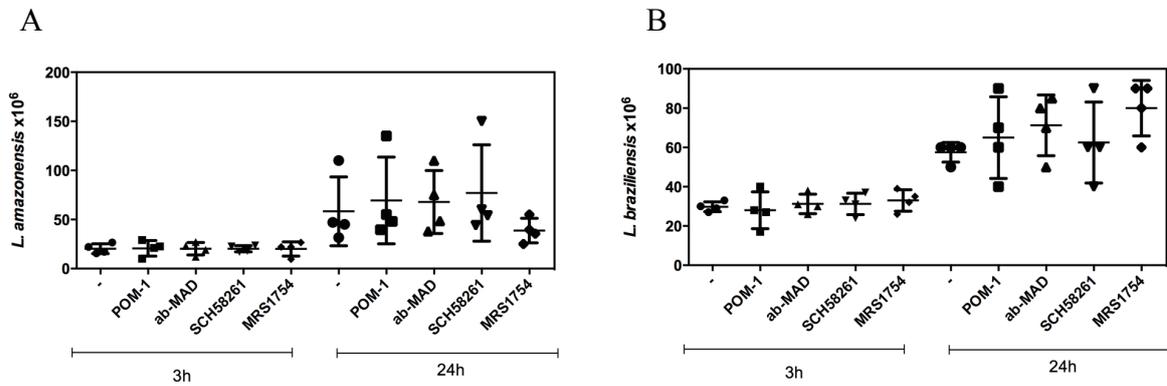
Após avaliar o efeito dos receptores de adenosina nas células, decidimos investigar a carga parasitária nas DCs expostas à adenosina e o efeito dos inibidores nessas condições. Para isso, as DCs foram tratadas com SCH58261 (inibidor do A<sub>2A</sub>) e MRS1754 (inibidor do A<sub>2B</sub>) e infectadas por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* na presença da adenosina. Após 24h de interação, observamos um aumento na carga parasitária das DCs cultivadas na presença da adenosina com relação às DCs que receberam apenas a *Leishmania* e esse aumento é revertido pela presença dos inibidores. Quando os dois inibidores são utilizados juntos, a redução da carga parasitaria das DCs é mais expressiva (Figura 15 A-D).



**Figura 16. Adenosina induz aumento da carga parasitária nas DCs infectadas e esse efeito é revertido pelos inibidores do  $A_{2A}$  (SCH58261) e  $A_{2B}$  (MRS1754).** DCs foram incubadas com 200 $\mu$ M de adenosina, na presença ou não do SCH58261 (antagonista do receptor  $A_{2A}$ ) ou MRS1754 (antagonista do receptor  $A_{2B}$ ) no mesmo momento da infecção com *L. amazonensis*. A taxa de infecção (A e C) e carga parasitária (B e D) das DCs tratadas foram avaliadas no dia seguinte após citospin das culturas. \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001 pelo teste de Mann-Whitney.

### 7.14 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DA *L. amazonensis* e *L. braziliensis* NA PRESENÇA DOS INIBIDORES POM-1, $\alpha\beta$ -MAD, SCH58261 e MRS1754

Para avaliarmos se o efeito dos inibidores também acontece nas *Leishmanias*, tratamos os parasitos em fase estacionária das culturas com os inibidores POM-1,  $\alpha\beta$ -MAD, SCH58261 e MRS1754 e avaliamos a viabilidade após 3 e 24h de tratamento. Não houve diferença significativa entre os parasitos que não receberam tratamento (-) com aqueles tratados com os respectivos inibidores (Figura 16 A e B). Após 24h de tratamento com MRS1754, o inibidor parece fazer efeito na *L. amazonensis* (A), porém, sem diferença significativa.



**Figura 17. Avaliação da viabilidade da *L. amazonensis* e *L. braziliensis* na presença dos inibidores POM-1,  $\alpha\beta$ -MAD, SCH58261 e MRS1754.** *L. amazonensis* e *L. braziliensis* ( $5 \times 10^6$ ) foram tratadas com os devidos inibidores supracitados e a viabilidade dos parasitos avaliado após 3 e 24h de tratamento, através de contagem na câmara de Neubauer.

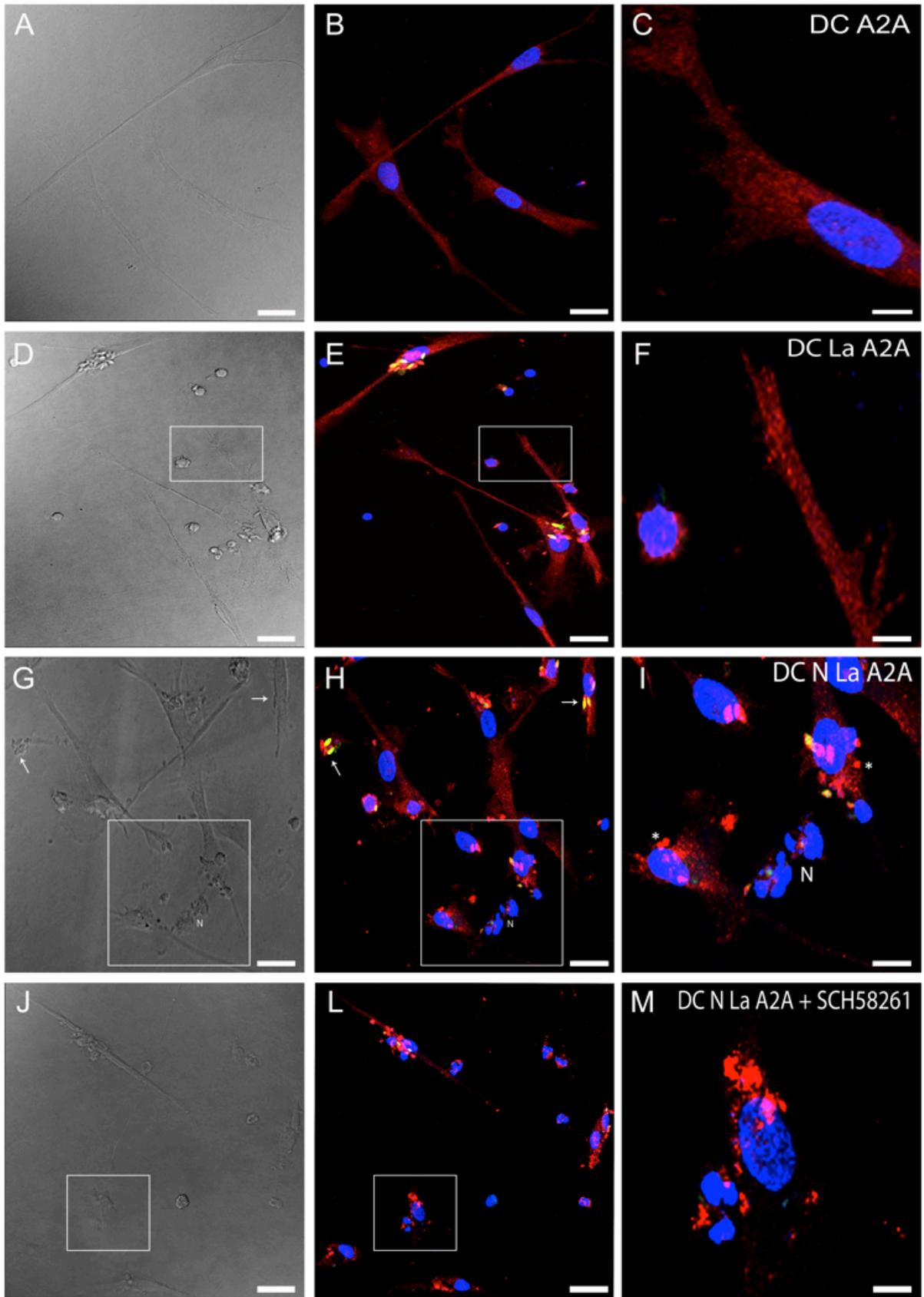
### 7.15 INIBIÇÃO DO RECEPTOR A<sub>2A</sub> DE ADENOSINA COM SCH58261 ALTERA A SUA EXPRESSÃO

Como demonstrado nos nossos resultados, a inibição do receptor A<sub>2A</sub> de adenosina em DCs após tratamento com SCH58261 e expostas aos neutrófilos infectados por *L. amazonensis* leva à diminuição da taxa de infecção dessas células. Decidimos então analisar a expressão desse receptor por microscopia de fluorescência. Nossos dados mostraram que a DC sem estímulo expressa o A<sub>2A</sub> de maneira homogênea, distribuído por toda a célula (Figura 17 A-C). As imagens da coluna da direita representam um aumento das células marcadas na coluna central (Figura 17 C, F I e M). Na presença da *Leishmania* (Figura 17 D-F), a expressão do receptor não parece ser alterada, com expressão semelhante às DCs sem estímulo (Figura 17 A-C). Apenas na presença do neutrófilo infectado por *L. amazonensis*, parece haver a formação de *clusters* (micro-domínios de membrana), que são regiões com maior expressão do receptor em algumas regiões das DCs (Figura 17 I, asteriscos), enquanto que na presença do inibidor, a expressão desse receptor é visivelmente alterada, com *clusters* maiores que parecem não se formar nas extremidades das DCs (Figura 17 L-M). Curiosamente, as *Leishmanias* também apresentam marcação para esse receptor (Figura 17 H). Conforme esperado, as células que foram incubadas apenas com o anticorpo secundário não apresentaram marcação (dados não mostrados), indicando que a marcação em vermelho é exclusiva do A<sub>2A</sub>.

Figura na próxima página

---

**Figura 18. Inibição do receptor A<sub>2A</sub> de adenosina com SCH58261 altera sua expressão.** DCs foram infectadas por *L. amazonensis* como descrito anteriormente. Posteriormente, essas células foram incubadas com anticorpo anti-receptor A<sub>2A</sub> e seu respectivo anticorpo secundário (vermelho) e DAPI (azul). As células foram analisadas ao microscópio de fluorescência. As imagens da coluna da direita representam um aumento das células marcadas na coluna central. Asteriscos em “I”= *clusters* de A<sub>2A</sub>. Barras: 20µM.



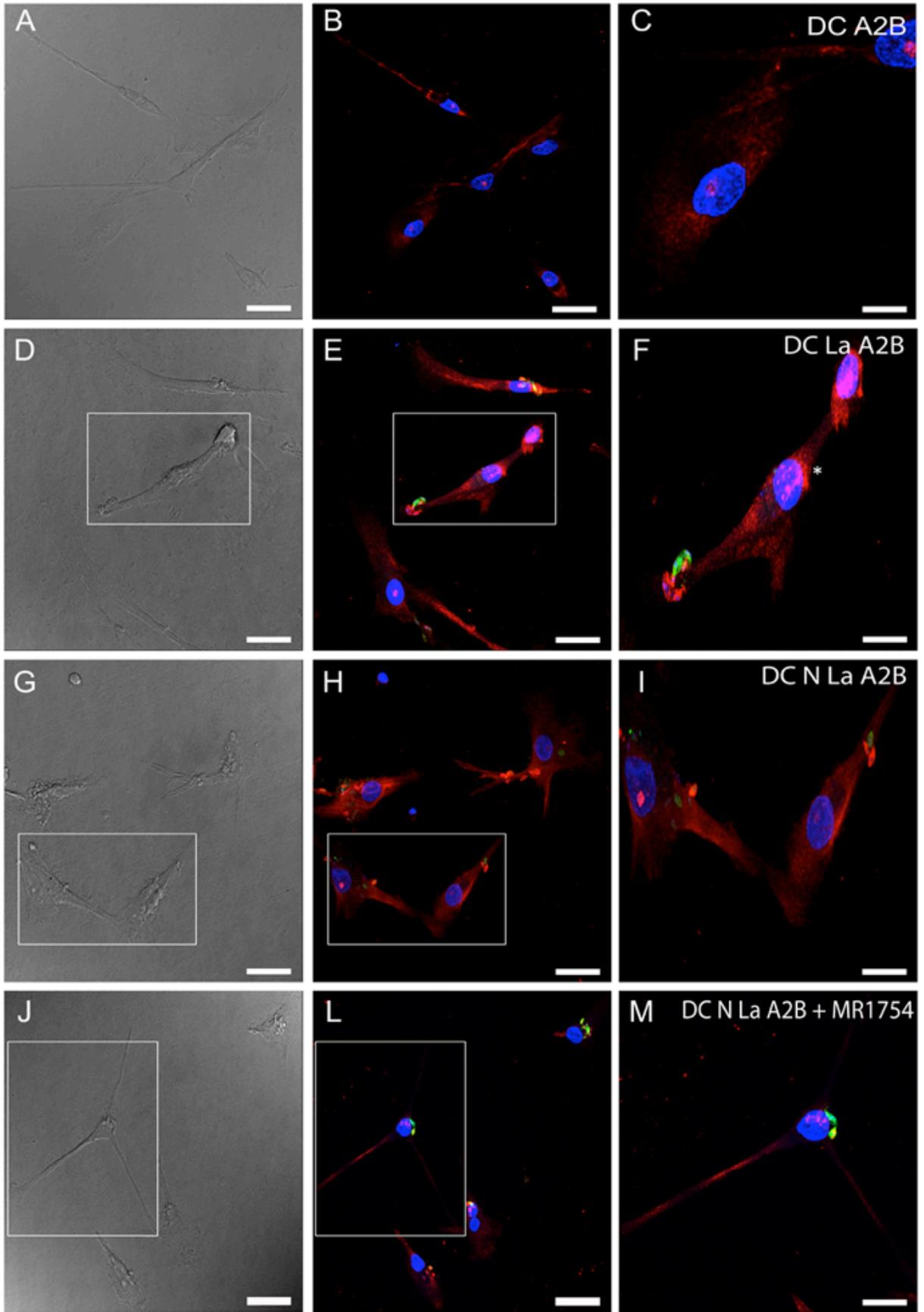
## 7.16 INIBIÇÃO DO RECEPTOR A<sub>2B</sub> DE ADENOSINA COM MRS1754 ALTERA SUA EXPRESSÃO

Como demonstrado nos nossos resultados, a inibição do receptor A<sub>2B</sub> de adenosina após o tratamento com MRS1754 em DCs expostas à *L. amazonensis* ou co-cultivadas com neutrófilos infectados por *L. amazonensis* diminui a taxa de infecção dessas células. Decidimos então analisar a expressão desse receptor por microscopia de fluorescência. As imagens da coluna da direita representam um aumento das células marcadas na coluna central. Nossos dados mostraram que a DC sem estímulo (Figura 18 A-C) apresenta baixa expressão do A<sub>2B</sub>. Na presença da *L. amazonensis* (Figura 18 D-F) ou do neutrófilo infectado por *L. amazonensis* (Figura 18 G-I) A<sub>2B</sub> parece formar *clusters* próximos ao núcleo das DCs (asterisco Fig. 18 F), independente da presença do neutrófilo. Quando essas células foram cultivadas com o inibidor (Figura 18 J-M), parece ocorrer alteração na expressão do receptor, cujo nível de marcação é semelhante ao das DCs sem estímulo (Figura 18 A-C). As *Leishmanias* também parecem apresentar marcação para esse receptor. Não houve marcação quando as células foram incubadas apenas com o anticorpo secundário, indicando que a marcação em vermelho é exclusiva do A<sub>2B</sub> (dados não mostrados).

Figura na próxima página

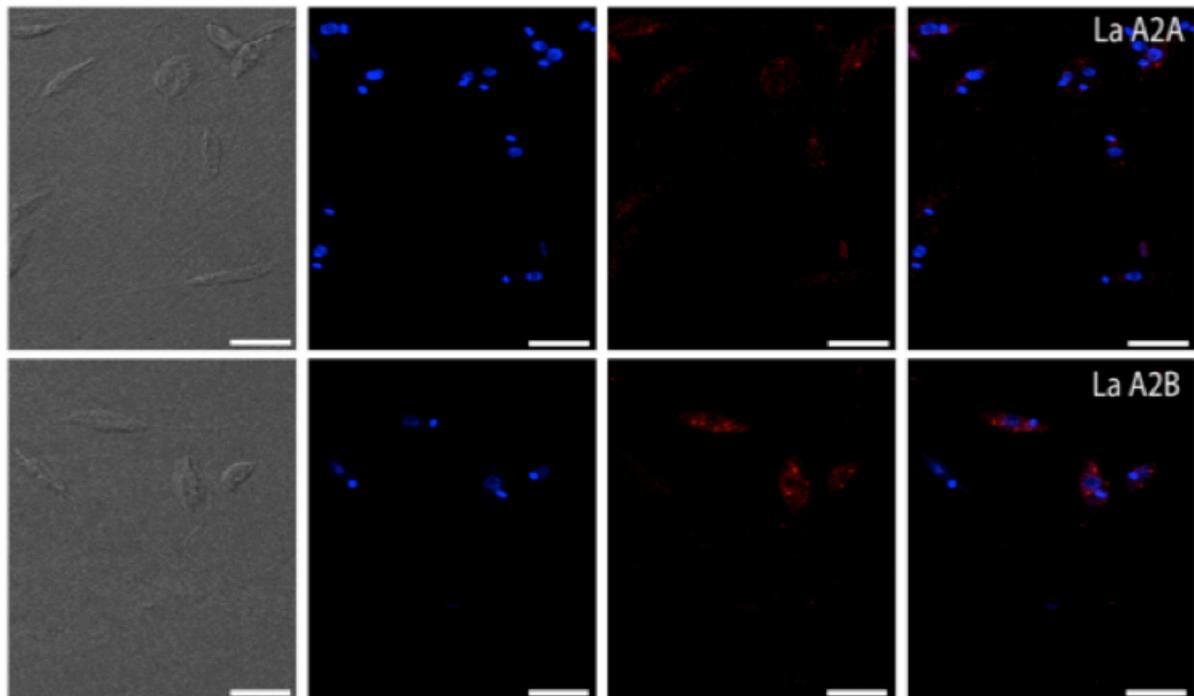
---

**Figura 19. Inibição do receptor A<sub>2B</sub> de adenosina com MRS1754 altera sua expressão.** DCs foram obtidas e infectadas por *L. amazonensis*-GFP (do inglês *Green Fluorescent Protein*) (verde) como descrito anteriormente. Posteriormente, essas células foram incubadas com anticorpo anti-receptor A<sub>2B</sub> e seu respectivo anticorpo secundário (vermelho) e DAPI (azul). As células foram analisadas ao microscópio de fluorescência. Asterisco em “F”= *clusters* de A<sub>2B</sub> próximos ao núcleo. As imagens da coluna da direita representam um aumento das células marcadas na coluna central. Barras: 20µM.



### 7.17 *L. amazonensis* EXPRESSA RECEPTORES $A_{2A}$ E $A_{2B}$ DE ADENOSINA

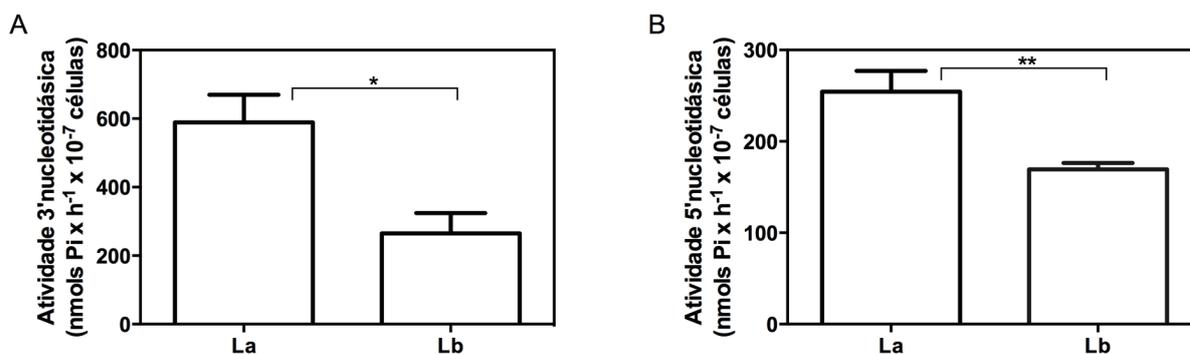
Sabendo da importante participação das ectonucleotidases das *Leishmanias* na geração de adenosina extracelular (PALLETA-SILVA *et al*, 2011) e partindo da observação das nossas imagens de imunofluorescência das DCs, em que as *Leishmanias* apresentaram marcação para  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$ , buscamos avaliar a expressão desses receptores apenas nos parasitos, e assim observamos que a *L. amazonensis* apresenta baixa expressão de  $A_{2A}$  e uma expressão um pouco mais acentuada de  $A_{2B}$ . Não houve marcação para as *Leishmanias* incubadas apenas com o anticorpo secundário, assegurando que a marcação em vermelho é exclusiva do  $A_{2A}$  ou  $A_{2B}$  (dados não mostrados).



**Figura 20. *L. amazonensis* expressa receptores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  de adenosina.** As *L. amazonensis* foram incubadas com anticorpo anti-receptor  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  e seus respectivos anticorpos secundários (vermelho) e DAPI (azul). As células foram analisadas ao microscópio de fluorescência. Barras: 10 $\mu$ M.

### 7.18 ATIVIDADE DAS ENZIMAS 3'-NU/NT E 5' – NU/NT EM *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*

As enzimas 3' nuclease/nucleotidase e 5' nuclease/nucleotidase presentes nas espécies de *Leishmania* desempenham um papel importante na geração de adenosina extracelular (PALLETA-SILVA *et al*, 2011). O mesmo grupo demonstrou que a atividade da ecto-3'-nucleotidase é 60 vezes maior que a da ecto-5'-nucleotidase em *L. amazonensis* e que a atividade da ecto-3'-nucleotidase é duas vezes maior em cepas mais virulentas de *L. amazonensis*. Além disso, a presença de 3'-monofosfato de adenosina (3'AMP) aumenta em 400% a ligação / invasão macrófago-parasita. Acredita-se que a 3'-nucleotidase pode desempenhar um papel significativo na geração de adenosina, o que pode contribuir para o comprometimento da resposta imune do hospedeiro em mamíferos e o estabelecimento da infecção. Diante disso, buscamos comparar suas atividades nas duas espécies estudadas e observamos que a *L. amazonensis* possui atividade significativamente maior dessas enzimas com relação a atividade observada na *L. braziliensis*.



**Figura 21.** Atividade das enzimas 3'-NU/NT e 5' – NU/NT em *Leishmania amazonensis* (La) e *Leishmania braziliensis* (Lb). Promastigotas de ambas as espécies foram avaliados quanto à atividade enzimática, conforme descrito na metodologia. Os valores apresentados como moles de Pi / h / 10<sup>7</sup> parasitas representam a média de 3 experimentos. \* p <0,05; \*\* p <0,01 pelo teste de Mann-Whitney.

## 8. DISCUSSÃO

Durante a infecção por *Leishmania* ocorre uma complexa interação entre o parasito e células do hospedeiro. Apesar de os macrófagos serem as principais células nesse contexto por permitirem sobrevivência e multiplicação quando os parasitos escapam dos mecanismos microbicidas, células dendríticas (DCs) e neutrófilos também são infectados e a interação entre essas células é fundamental para o controle da infecção e direcionamento da resposta imune adaptativa (KAYE e SCOTT, 2011; VAN GISBERGEN *et al.*, 2005). Para avaliar a influência da interação entre neutrófilos e DCs na infecção, inicialmente comparamos a taxa de infecção das DCs diretamente infectadas com os parasitos com aquelas que os adquiriram através da captura de neutrófilos infectados. Assim, observamos que os neutrófilos infectados por *L. amazonensis* induzem um aumento na taxa de infecção (Figura 4 A) e na carga parasitária (Figura 4 B) em DCs quando comparadas com as diretamente infectadas com *L. amazonensis*. Por outro lado, os neutrófilos infectados por *L. braziliensis* induzem redução tanto na taxa de infecção (Figura 4 A) quanto na carga parasitária (Figura 4 B) em DCs quando comparamos com aquelas diretamente infectadas com *L. braziliensis*, sugerindo que neutrófilos infectados por *L. braziliensis* parecem ativar os mecanismos microbicidas das DCs, levando à redução da carga parasitária, enquanto neutrófilos infectados por *L. amazonensis* parecem inibir a ativação das DCs, promovendo a replicação do parasito.

Ribeiro-Gomes e colaboradores (2012) já haviam demonstrado que as DCs adquirem *L. major* preferencialmente via captura de neutrófilos infectados. Os neutrófilos têm uma curta meia-vida e são constitutivamente programados para morte celular por apoptose (SAVILL e FADOK, 2000). Segundo Savill e colaboradores (2002), a remoção dessas células apoptóticas pelas DCs ou pelos macrófagos pode suprimir a inflamação. Afonso e colaboradores (2008) demonstraram que a interação dos macrófagos humanos infectados com *L. amazonensis* e neutrófilos apoptóticos aumentou a carga parasitária nos macrófagos, por um mecanismo dependente de PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$ . Além disso, os macrófagos que ingeriram neutrófilos apoptóticos infectados por *L. major* também tiveram suas funções microbicidas inativadas, permitindo assim sobrevivência e multiplicação do parasito (LASKAY *et al.*, 2003). No nosso trabalho também avaliamos a porcentagem de neutrófilos apoptóticos e observamos que aqueles infectados por *L. amazonensis* apresentam um percentual de apoptose significativamente maior (aproximadamente 40%) que aqueles infectados por *L. braziliensis* (aproximadamente 20%) (Figura 5). Possivelmente, os neutrófilos apoptóticos infectados por *L. amazonensis*, mas não por *L. braziliensis* tenham influenciado a inibição das

DCs, favorecendo um ambiente anti-inflamatório, evidenciado pelo aumento da taxa de infecção e carga parasitária das DCs (Figura 4), aumento de IL-10, redução de IL-12 (Figura 7) e de moléculas co-estimulatórias (Figura 6). Células fagocíticas reconhecem a fosfatidilserina (PS) na superfície de células apoptóticas, que é predominantemente confinada ao folheto interno da membrana plasmática nas células, mas é externalizada para a superfície celular durante a apoptose. A quantidade de PS externalizada é determinante para as células fagocíticas distinguirem as células apoptóticas das não apoptóticas (BORISENKO *et al*, 2003).

Para comparar o perfil fenotípico das DCs infectadas diretamente com os promastigotas com aquelas co-cultivadas com neutrófilos infectados, avaliamos a expressão das moléculas de superfície nas DCs e observamos que tanto a infecção com a *L. braziliensis* quanto com *L. amazonensis* não alteraram a expressão de moléculas de superfície em DCs humanas após 24h (Figura 6 A-E), porém, na presença de neutrófilos infectados por *L. amazonensis*, mas não por *L. braziliensis*, a expressão de CD1a, HLA-DR, DC-SIGN, CD80 e CD86 (Figura 6 A-E) foram significativamente reduzidas. Entretanto, vários estudos já demonstraram que *L. amazonensis* modula negativamente a expressão das moléculas co-estimulatórias durante a diferenciação das DCs humanas (FAVALI *et al*, 2007; FIGUEIREDO *et al.*, 2012; Prina *et al.*, 2004; QI *et al.*, 2001; Vasquez *et al.*, 2008; Xin *et al.*, 2008), enquanto a infecção por *L. braziliensis* induz a ativação de DCs e montagem de uma resposta imune protetora (VARGAS-INCHAUSTEGUI *et al.*, 2008), mesmo mantendo essas células com baixa expressão de marcadores de ativação, porém, com capacidade de produzir TNF- $\alpha$  (CARVALHO *et al.*, 2008). Vale ressaltar que nossas DCs foram avaliadas após o cultivo apenas com os parasitos, sem nenhum indutor de ativação, como por exemplo o LPS, usado por alguns estudos supracitados. De acordo com a literatura, as DCs humanas infectadas por *L. major* e *L. donovani* (REVEST, 2008), assim como *L. braziliensis* e *L. infantum* (FALCÃO *et al*, 2015) induzem uma diminuição na expressão de DC-SIGN, fato que caracteriza a internalização de microrganismos (COLMENARES, 2004). Dessa forma, nossos dados contrastam com alguns dados da literatura, uma vez que não observamos nenhuma diferença na expressão dessa molécula quando essas células foram cultivadas diretamente com parasitos. No entanto, os neutrófilos infectados por *L. amazonensis* induziram redução na expressão do DC-SIGN nas DCs, sugerindo que estes neutrófilos infectados podem se ligar a esta molécula para acessar DCs hospedeiras. Van Gisbergen e colaboradores (2005) demonstraram *in vitro* e *in vivo* que DCs e neutrófilos se associam

através da interação entre o DC-SIGN expresso nas DCs e Mac-1 expresso nos neutrófilos, com dependência da glicosilação específica de Mac-1.

As DCs desempenham um papel importante na promoção da resistência à leishmaniose, ativando células T CD4<sup>+</sup> e promovendo sua diferenciação em células Th1 através da produção de IL-12 (VON STEBUT *et al*, 1998). Vários estudos já foram publicados demonstrando a importância da IL-12, que é secretada principalmente pelas DCs e induz a secreção de IFN- $\gamma$  pelas células T CD4 + (LIU *et al*, 2012). DCs cultivadas com *L. braziliensis* produzem IL-12 e TNF- $\alpha$  (OLIVEIRA, *et al* 2012). DCs humanas infectadas por *L. major* (FAVILA *et al*, 2014) e DCs murinas infectadas por *L. amazonensis* (QI; POPOV; SOONG, 2001) juntamente com CD40L produzem IL-12, no entanto, *L. tropica* não induz a produção desta citocina em DCs murinas (MCDOWELL *et al.*, 2002). Logo, a produção de IL-12 requer dois sinais: um microbiano e outro do hospedeiro.

Assim, avaliamos a produção de IL-12 (citocina pró-inflamatória) e IL-10 (citocina anti-inflamatória) no sobrenadante das DCs cultivadas diretamente com parasitos ou na presença de neutrófilos infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* e observamos uma redução na produção de IL-12 na cocultura de DCs com neutrófilos infectados por *L. amazonensis* e um aumento na produção dessa citocina na co-cultura das DCs com neutrófilos infectados por *L. braziliensis* (Figura 7 B). Por outro lado, também observamos um aumento significativo na produção de IL-10 no sobrenadante da cocultura das DCs com neutrófilos infectados por *L. amazonensis* em comparação com DCs infectadas diretamente ou com neutrófilos infectados com o parasito (Figura 7 A). Além disso, também observamos uma redução significativa na produção de IL-10 no sobrenadante de DCs cultivadas na presença de neutrófilos infectados por *L. braziliensis* em comparação com células cultivadas apenas com estes parasitos (Figura 7 B). Esses dados sugerem que os neutrófilos infectados por *L. amazonensis* inibem a ativação das DCs, levando à redução da produção de IL-12 e ao aumento da produção de IL-10. Resultados opostos são observados nas DCs co-cultivadas com neutrófilos infectados por *L. braziliensis*. A diminuição da produção de IL-12 por DCs é um importante mecanismo de evasão utilizado por *L. amazonensis* por prejudicar o controle da infecção pelo hospedeiro (VASQUEZ *et al.*, 2008; XIN *et al.*, 2008). Carvalho e colaboradores (2008) observaram que DCs infectadas por *L. braziliensis* permanecem imaturas e incapazes de produzir IL-12, porém, capazes de produzir TNF- $\alpha$  após estímulo com LPS. As células *bystander* (que tiveram contato com o parasito, mas permaneceram não

infectadas) aumentam a expressão de moléculas co-estimulatórias, bem como a capacidade de secretar IL-12, apresentar antígenos e induzir um perfil de resposta Th1.

Sabe-se que a *Leishmania* pode interferir em diversas vias de sinalização de macrófagos e DCs dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, PKC, NF- $\kappa$ B, JNK e MAPK (Olivier *et al*, 2005). Recentemente, Figueiredo e colaboradores (2017) demonstraram que a inibição de DCs murinas pela *L. amazonensis* é dependente da ativação do receptor  $\text{A}_{2\text{B}}$  de adenosina, produção de AMPc, ativação de PI3K e fosforilação de ERK1/2. Um crescente número de trabalhos vem demonstrando a influência da expressão das ectonucleotidases no contexto das leishmanioses (FIGUEIREDO *et al*, 2012; FIGUEIREDO *et al*, 2016; FIGUEIREDO *et al*, 2017; LIMA *et al*, 2017; PERES *et al*, 2018). Os nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares podem afetar a ativação das DCs. O ATP extracelular induz a maturação das DCs, enquanto a adenosina inibe sua ativação e produção de citocinas pró-inflamatórias (LA SALA *et al*, 2001). O ATP e o ADP extracelulares são catabolizados por uma cascata de ectoenzimas, compreendendo CD39 (ENTPDase, ectodifosfohidrolase de nucleosídeos trifosfatados), uma enzima que hidrolisa ATP e ADP a AMP, e CD73 (ectofosfohidrolase de nucleosídeos 5'-monofosfatados ou ecto-5' nucleotidase), que converte AMP em adenosina (HASKO *et al*, 2008). Nossos resultados preliminares mostraram que há, aparentemente, uma maior concentração de ATP extracelular no sobrenadante da cultura dos neutrófilos com *L. amazonensis* comparado com aqueles cultivados com *L. braziliensis* (Figura 8 A e B). Nossos resultados mostraram que a co-expressão de CD39 e CD73 foi significativamente aumentada em DCs infectadas por *L. amazonensis* com relação àquelas infectadas por *L. braziliensis* (Figura 9 A) e aumentada também nas DCs cocultivadas com neutrófilos infectados por *L. amazonensis*, com relação àquelas cocultivadas com neutrófilos infectados por *L. braziliensis* (Figura 9 B). Figueiredo e colaboradores (2012) também observaram aumento na coexpressão dessas enzimas nas DCs murinas infectadas por *L. amazonensis*, mas não por *L. braziliensis*. Também avaliamos a expressão de CD39 em neutrófilos infectados e observamos que essas células expressam essa enzima mesmo em repouso (Figura 10), mas *L. amazonensis* e *L. braziliensis* aumentam significativamente essa expressão (Figura 10). Alterações na função do CD39 foram descritas em associação com doenças como isquemia cerebral em modelos animais (PINSKY *et al*, 2002) e várias doenças humanas, como na infecção por HIV (LEAL *et al*, 2005), leucemia linfocítica crônica (PULTE *et al*, 2005) e doença cardíaca (EL-OMAR *et al*, 2005). Dados da literatura indicam que células apoptóticas secretam ATP como sinal de “find-me” para outros fagócitos (Poon *et al*, 2014). Esse ATP extracelular, combinado com o

aumento da expressão de ectonucleotidases na superfície das células infectadas pode ser benéfico para o parasita, pois esse mecanismo garante a produção de adenosina extracelular e a subsequente inibição das DCs.

Avaliamos também a enzima CD73, mas não detectamos expressão nos neutrófilos (dados não mostrados). De acordo com a literatura, CD73 é expressa em altos níveis pelas células endoteliais vasculares e por 5-15% dos linfócitos do sangue periférico, já granulócitos e monócitos não possuem essa enzima (SALMI e JALKANEN, 2005). Na Índia foram encontradas altas concentrações de adenosina no soro de pacientes com leishmaniose visceral, apesar de baixa expressão de CD73 nas células (RAI *et al*, 2011). O grupo propõe a hipótese de que a 5' NU/NT expressa na superfície da *Leishmania* esteja participando do processo de conversão do ATP em adenosina.

Através da ativação dos receptores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  de adenosina na superfície dos neutrófilos, a adenosina funciona como um sinal para a ligação de neutrófilos às células endoteliais microvasculares (SALMI e JALKANEN, 2005). Isso está de acordo com os achados que mostram que as interações neutrófilos-células endoteliais são inibidas por agonistas A2AR e que a inflamação é exacerbada em animais A2AR  $\bar{r}$  e em animais selvagens que foram tratados com um antagonista A2AR (revisto em SALMI e JALKANEN, 2005).

Diante disso, buscamos avaliar também o efeito do bloqueio das enzimas CD39 e CD73 e dos receptores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  que estão envolvidos no processamento e reconhecimento da adenosina pelas células. Inicialmente, bloqueamos CD39 e/ou CD73 em DCs ou em neutrófilos e observamos que o bloqueio do CD39 (POM-1) nas DCs (Figura 11) ou nos neutrófilos (Figura 12) antes da infecção e posterior co-cultura diminui a taxa de infecção das DCs (Figuras 11 e 12 A), bem como a carga parasitária (Figuras 11 e 12 B), mas apenas na presença de neutrófilos infectados por *L. amazonensis*. A taxa de infecção nas mesmas condições não foi alterada por *L. braziliensis* (Figuras 11 e 12). Curiosamente, o tratamento das DCs com POM-1 em DCs antes da infecção reduziu a carga parasitária quando essas células foram co-cultivadas com neutrófilos infectados por *L. braziliensis* (Figura 12 D).

A adenosina age através de 4 tipos de receptores,  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$ , que variam em distribuição, afinidade e função (ABBRACCHIO e CERUTI, 2007). Entre os 4 tipos, o receptor  $A_{2B}$  tem menor afinidade pela adenosina. Portanto, presume-se que o receptor  $A_{2B}$  permaneça silencioso sob condições fisiológicas quando as concentrações de adenosina extracelular são baixas, mas seu papel torna-se importante em condições fisiopatológicas,

quando o nível de adenosina é alto (FREDHOLM *et al*, 2001; NOVITSKY *et al*, 2008). Dados da literatura mostram que o receptor  $A_{2B}$  é o principal receptor envolvido na inibição das DC murinas infectadas por *Leishmania* (WILSON *et al*, 2009; FIGUEIREDO *et al*, 2012, FIGUEIREDO *et al*, 2017). Conhecendo os efeitos inibitórios dos receptores  $A_{2B}$ , decidimos avaliar se o bloqueio poderia reverter a carga parasitária nas DCs. Nossos resultados mostram que o bloqueio desse receptor leva à diminuição da taxa de infecção (Figura 14 A) e carga parasitária (Figura 14 B) em DCs infectadas diretamente por *L. amazonensis* ou na presença de neutrófilos infectados por *L. amazonensis*. Este mesmo tratamento não alterou a taxa de infecção (Figura 14 C) ou a carga parasitária (Figura 14 D) em DCs infectadas diretamente por *L. braziliensis* ou co-cultivadas com neutrófilos infectados por este parasito.

A participação do receptor  $A_{2B}$  foi evidenciada em DCs murinas infectadas por *L. amazonensis*, mas não por *L. braziliensis* (FIGUEIREDO *et al*, 2002). Figueiredo e colaboradores (2017) demonstraram que a infecção das DCs por *L. amazonensis* aumenta a produção de AMPc através da ativação do receptor  $A_{2B}$ , esse aumento, por sua vez, leva a ativação de PI3K e consequentemente fosforilação de ERK1/2. Esse mecanismo (ativação do receptor  $A_{2B}$  – AMPc – PI3K – ERK1/2) é utilizado pela *L. amazonensis* para inibir a resposta imune nas DCs ou inibir a expressão de moléculas co-estimulatórias. Estes resultados sugerem que existe uma diferença na expressão do receptor de adenosina dependendo da espécie do parasito. Por imunofluorescência, observamos que *L. amazonensis* independente da presença dos neutrófilos parece induzir acúmulo de receptor  $A_{2B}$  em algumas áreas da célula, observados em *dots*, sugerindo a ativação e redistribuição desse receptor nas células infectadas. As células que foram tratadas com MRS1754 apresentaram comprometimento da expressão do  $A_{2B}$  na sua superfície, parecendo voltar ao mesmo nível de expressão das DCs sem estímulo (Figura 19). Vijayamahantesh e colaboradores (2016) investigaram a expressão do receptor  $A_{2B}$  em pacientes com LV no pré e pós-tratamento e observaram uma expressão aumentada desse receptor em monócitos de pacientes com LV em comparação com os pacientes com LV tratados e controles saudáveis. Esses dados sugerem que o nível de  $A_{2B}$  está correlacionado com a gravidade da doença: pacientes com LV com carga parasitária alta expressam níveis mais altos do receptor  $A_{2B}$  em suas células do que pacientes com LV com menor nível de infecção.

Também avaliamos os efeitos inibitórios do receptor  $A_{2A}$  e observamos que, apenas na presença de neutrófilos infectados por *L. amazonensis* há redução da taxa de infecção e da

carga parasitária em DCs (Figura 15). Possivelmente, o neutrófilo infectado esteja de alguma forma induzindo a ativação do  $A_{2A}$  nas DCs e quando inibimos esse receptor, conseguimos ver o efeito de redução dos parâmetros avaliados. Esse dado está de acordo com as nossas imagens de imunofluorescência, que demonstram que apenas na presença dos neutrófilos infectados por *L. amazonensis*, o  $A_{2A}$  parece formar *clusters* nas DCs e a expressão desse receptor fica comprometida na presença do SCH58261 (Figura 18). Já foi demonstrado que *L. infantum* explora a sinalização do  $A_{2A}$  para colonizar com sucesso o hospedeiro vertebrado. Na ausência de  $A_{2A}$ , camundongos BALB/c são resistentes à infecção por *L. infantum* através de uma resposta imune Th1 exacerbada (LIMA *et al*, 2017), sugerindo que a inibição ou o bloqueio do  $A_{2A}$  poderia melhorar as funções efetoras do sistema imunológico para tratar infecções. Além disso, vimos que as DCs infectadas por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* na presença da adenosina apresentam taxa de infecção maior que aquelas infectadas na ausência da adenosina, porém esse efeito é revertido na presença dos inibidores do  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$ . Quando as DCs foram tratadas com os dois inibidores em conjunto, o efeito de inibição da carga parasitária foi mais acentuado tanto com *L. amazonensis*, quanto com *L. braziliensis* (Figura 16 A – D). Para nos assegurarmos de que o efeito de inibição estaria acontecendo nas DCs e não nos parasitos, tratamos *L. amazonensis* e *L. braziliensis* com os 4 inibidores utilizados nesse estudo e avaliamos o crescimento dos parasitos após 3 e 24h de tratamento. Observamos então que não houve diferença significativa no crescimento dos parasitos quando utilizamos os inibidores apenas com as *Leishmanias* (Figura 17 A e B), sugerindo que o efeito de inibição ocorre nas células hospedeiras sem afetar os parasitos. Curiosamente, essas *Leishmanias* parecem apresentar marcação para o receptor  $A_{2B}$ , como visto nas imagens obtidas por imunofluorescência (Figura 20). Atualmente não há nada descrito na literatura sobre a expressão dos receptores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  em *L. amazonensis*, sendo assim, nosso estudo é o primeiro a mostrar por imunofluorescência que *L. amazonensis* expressa receptores de adenosina em sua superfície. Não sabemos ainda de que maneira a expressão desses receptores na *Leishmania* pode influenciar no estabelecimento da infecção. Estudos mais aprofundados seriam necessários para avaliar a via de sinalização ativada nas *Leishmanias* e entender qual o papel desses receptores na infecção das células ou sobrevivência dos parasitos.

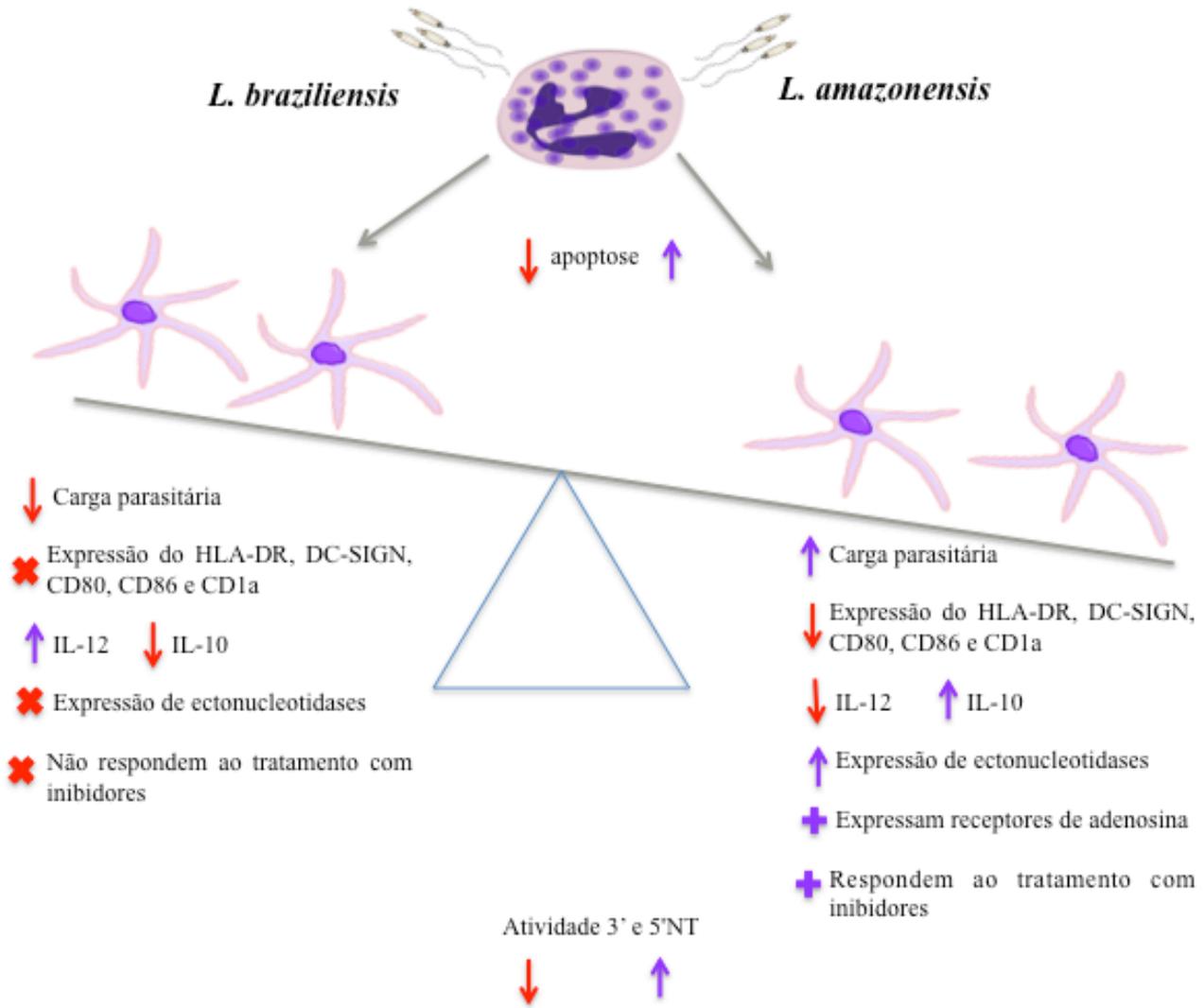
Alguns estudos já demonstraram a expressão de E-NTPDase e a atividade da ecto-5'-nucleotidase na *L. amazonensis* (MARQUES-DA-SILVA *et al*, 2008; Souza *et al*, 2010). Parasitos com maior expressão dessas ectonucleotidasas apresentaram capacidade aumentada

em infectar macrófagos murinos (GOMES *et al*, 2015). Além da ecto-5'-nucleotidase, a enzima 3'NT / NU presente em espécies de *Leishmania* também desempenha um papel importante na geração de adenosina extracelular. Já foi visto que a adenosina pode interagir com receptores purinérgicos presentes nas células, estimulando a liberação de citocinas anti-inflamatórias e inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (DI VIRGILIO, 2007). Assim, a geração de adenosina extracelular pode modular a resposta imune do hospedeiro, facilitando a adesão, invasão e sobrevivência do parasito (PALETTA-SILVA e MEYER-FERNANDES, 2012; FREITAS-MESQUITA e MEYER-FERNANDES, 2014). Diante desses dados, buscamos avaliar a atividade das enzimas 3'-NT e 5'-NT e observamos uma atividade significativamente maior na *L. amazonensis* em relação a *L. braziliensis* (Figura 21 A e B), o que corrobora com os dados encontrados neste trabalho, sugerindo que a alta atividade dessas enzimas na superfície da *L. amazonensis* pode estar contribuindo para a geração de adenosina extracelular, com consequente ativação dos seus receptores e inibição das DCs. Palleta-Silva e colaboradores (2011) demonstraram que a atividade da 3'-NT de *L. amazonensis* está diretamente relacionada à sua virulência e contribui na interação parasito-macrófago, comprometendo a resposta imune do hospedeiro e garantindo o estabelecimento da infecção. Marques-da-Silva e colaboradores (2008) viram que *L. amazonensis* hidrolisa quantidades mais altas de ATP, ADP e AMP que a *L. braziliensis* e *L. major*, provavelmente devido à maior expressão de NTPDase de membrana. Como a 3' não foi detectada em células de mamíferos, ela surge como uma possibilidade de alvo para ação de quimioterápicos mais seletivos (Farajnia *et al*, 2004).

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* infectam e ativam os neutrófilos humanos. A presença desses neutrófilos infectados por *L. amazonensis* induz uma diferença na taxa de infecção das DCs e também modula diferentemente sua ativação como evidenciado pela redução da expressão do HLA-DR, DC-SIGN, CD80, CD86 e CD1a nas DCs co-cultivadas na presença de neutrófilos infectados por *L. amazonensis*, redução da produção de IL-12 e aumento de IL-10. Também observamos que apenas *L. amazonensis* induz aumento da expressão de ectonucleotidases nas DCs, com ativação dos receptores de adenosina. Na presença dos inibidores desses receptores, ocorre redução da carga parasitária nessas células, evidenciando a participação da adenosina no contexto anti-inflamatório. Por sua vez, os neutrófilos infectados por *L. braziliensis* induzem redução na carga parasitária das DCs, aumento da produção de IL-12 e redução de IL-10, apesar de não alterarem a expressão das moléculas de superfície nas DCs. A *L.*

*braziliensis* também não induziu expressão de ectonucleotidases nas DCs e não responderam ao tratamento com os inibidores, sugerindo que esse parasito não age nas DCs através da adenosina. Ao avaliarmos as enzimas nos 2 parasitos, observamos uma atividade significativamente maior da 3' e 5' na *L. amazonensis* com relação a *L. braziliensis*, o que favorece a produção de adenosina extracelular no momento da infecção.

## 9. SUMÁRIO DE RESULTADOS



- DCs co-cultivadas com neutrófilos humanos infectados por *L. amazonensis* apresentam carga parasitária maior, redução na expressão de moléculas co-estimulatórias, redução de IL-12 e aumento de IL-10 com relação às DCs infectadas diretamente com os parasitos;
- Neutrófilos expostos à *L. amazonensis* apresentam mais células apoptóticas com relação àqueles expostos a *L. braziliensis*;
- DCs infectadas por *L. amazonensis* ou DCs co-cultivadas com neutrófilos infectados por *L. amazonensis* apresentam aumento da co-expressão de CD39/CD73;
- Neutrófilos infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* induzem aumento de CD39;
- A inibição de CD39 com POM-1 nas DCs induz redução na carga parasitária;
- A inibição de CD39 com POM-1 nos neutrófilos antes da co-cultura, induz redução na carga parasitária das DCs;
- A inibição dos receptores A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> de adenosina nas DCs induz redução da carga parasitária nessas células independente da presença dos neutrófilos;
- Adenosina induz aumento da carga parasitária nas DCs, porém, esse aumento é revertido na presença dos inibidores dos receptores de adenosina, sobretudo quando estes são usados em conjunto;
- Inibidores do CD39 (POM-1), CD73 ( $\alpha\beta$ -MAD), A<sub>2A</sub> (SCH58261) e A<sub>2B</sub> (MRS1754) não interferem no crescimento da *L. amazonensis* e nem da *L. braziliensis*;
- L. amazonensis* expressa A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> na sua superfície e induz formação de clusters de receptores A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> nas DCs
- L. amazonensis* apresenta maior atividade das enzimas 3'NT e 5'NT com relação a *L. braziliensis*.

## **10. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Nossos resultados mostram que neutrófilos infectados por promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* estimulam a reorganização dos receptores de adenosina nas células dendríticas, sugerindo uma influência dessa molécula e dos seus receptores na infecção, tornando-os importantes alvos para novas propostas terapêuticas para controlar a infecção por *L. amazonensis*, principal agente etiológico da leishmaniose difusa.

## REFERÊNCIAS

- ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol & Therap.*, v. 64, p. 445-475, 1994.
- ABBRACCHIO M. P.; CERUTI, S. P1 receptors and cytokine secretion. *Purinergic Signalling*, v. 3, p. 13–25, 2007.
- ADDI, B., *et al.* Modulation of murine dendritic cell function by adenine nucleotides and adenosine: involvement of the A(2B) receptor. *Eur. J. Immunol.*, v. 38, p. 1610–1620, 2008.
- AFONSO, L. *et al.* Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J. Leuk Biol.*, 84: 389–96, 2008.
- AIRAS, L. *et al* Lymphocyte-vascular adhesion protein-2 is a novel 70-kDa molecule involved in lymphocyte adhesion to vascular endothelium. *J. Immunol.*, v. 151, p. 4228–4238, 1993.
- AIRAS, L. *et al.* CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *J. Exp. Med.*, v. 182, p. 1603–1608, 1995.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species : models of intracellular parasitism. *J Cell Sci.*, v. 3002, p. 2993–3002, 1999.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One*, v. 7, p. 35671, 2012.
- AMULIC, B. *et al.* Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annual Rev of Immun.*, v. 30, p. 459–89, 2012.
- APPELBERG, R. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends in Microb.*, 15: 87–92, 2007.
- ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermat.*, v. 14, p. 523–532, 1996.
- BACELLAR, O. *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect. Immun.*, v. 70, p. 6734–6740, 2002.
- BANCHEREAU J. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 18, p. 767-811, 2000.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, v. 392, p. 245–252, 1998.
- BARRAL A.M. P. *et al.* Polar and subpolar diffuse Cutaneous Leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *International Journal of Dermatology*, v. 34, p. 474-479, 1995.

- BENNOUNA, S. *et al.* Cross-Talk in the Innate Immune System: Neutrophils Instruct Recruitment and Activation of Dendritic Cells during Microbial Infection. *J. Immunol.*, v. 171, p. 6052-6058, 2003.
- BERCHTOLD, S., *et al.* Human monocyte derived dendritic cells express functional P2X and P2Y receptors as well as ecto-nucleotidases. *FEBS Letters*, v. 458, p. 424-428, 1999.
- BERREDO-PINHO, M. *et al.* A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. *Arch Biochem Biophys*, v. 391, p. 16-24, 2001.
- BITTENCOURT, A.L.; BARRAL-NETO, M. Leishmaniasis. In DOERR, W.; SEIFERT, G. **Tropical Pathology**, 8, 2ed. Berlin: Springer Verlag, p. 597-650, 1995.
- BORISENKO, G. G. *et al.* Macrophage recognition of externalized phosphatidylserine and phagocytosis of apoptotic Jurkat cells—existence of a threshold. *Archives of Biochemistry, and Biophysics*. v. 413, p. 41-52, 2003.
- BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity.*, v. 33, p. 657-70, 2010.
- BOURS, M. J., *et al.* Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther.*, v. 112, p. 358-404, 2006.
- BURNSTOCK, G.; KENNEDY, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen. Pharmacol.*, v. 16, p. 433-440, 1985.
- BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cell and Molec Life Sciences.**, v. 64, p. 1471-1483, 2007.
- CARVALHO, L. P.; PEARCE, J.; SCOTT, P. Functional Dichotomy of Dendritic Cells following Interaction with *Leishmania braziliensis*: Infected Cells Produce High Levels of TNF- $\alpha$ , whereas Bystander Dendritic Cells Are Activated to Promote T Cell Responses. *J. Immunol.*, v. 181, p. 6473-6480, 2008.
- CARVALHO, A.K. *et al.* *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* promote differential expression of dendritic cells and cellular immune response in murine model. *Parasit Immunol.*, v. 34, p. 395-403, 2012.
- CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microb.*, v. 5, p. 873-82, 2007.
- CHARMOY, M. *et al.* The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. *J Biomed & Biotech.*, 719361, 2010.
- CHAVES, L. F. *et al.* Sources and sinks: revisiting the criteria for identifying reservoirs for American cutaneous leishmaniasis. *Trends in Parasit.*, v. 23, p. 311-6, 2007.
- COLMENARES, M. *et al.* The dendritic cell receptor DC-SIGN discriminates among species and life cycle forms of *Leishmania*. *J. Immunol.*, v. 172, p. 1186-90, 2004.

- CORRIDEN, R. *et al.* Ecto-nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 1 (E-NTPDase1/CD39) Regulates Neutrophil Chemotaxis by Hydrolyzing Released ATP to Adenosine. ***J Biologic Chemist.***, v. 283, p. 28480–28486, 2008.
- COSTA, J.M. *et al.* Spontaneous healing of leishmaniasis caused by *Leishmania viannia braziliensis* in cutaneous lesions. ***Rev da Soc Bra de Med Trop.***, v. 23, p. 205-208, 1990.
- DEAGLIO, S., *et al.*, Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. ***J. Exp. Med.***, v. 204, p. 1257–1265, 2007.
- DE VEER, J. M. *et al.* MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. ***European J of Immun.***, v. 33, p. 2822–2831, 2003.
- DI VIRGILIO, F. Purinergic signalling in the immune system. A brief update. ***Purinergic Signal.***, v. 3, p. 1-3, 2007.
- EL-OMAR M.M., *et al.* The ratio of ADP-to ATP-ectonucleotidase activity is reduced in patients with coronary artery disease. ***Thromb Res.***, v. 116, p. 199–206, 2005.
- ETHUIN, F. *et al.* Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12. ***Lab Invest: a journal of tech meth and pathol.***, v. 84, p. 1363–71, 2004.
- FADOK, V. A. *et al.* Macrophages That Have Ingested Apoptotic Cells In Vitro Inhibit Proinflammatory Cytokine Production Through Autocrine / Paracrine Mechanisms Involving TGF-beta, PGE<sub>2</sub> and PAF. ***The American Soc for Clinic Invest.***, v. 101, p. 890-898, 1998.
- FALCÃO, S. A. C. *et al.* Exposure to *Leishmania braziliensis* Triggers Neutrophil Activation and Apoptosis. ***PLoS Negl Trop Dis.***, v.9, 2015.
- FARAJNIA, S. *et al.* Molecular characterization of a novel amastigote stage Class I nuclease from *Leishmania major*. ***Int J for Parasit.***, v. 34, p. 899-908, 2004.
- FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. ***Microb and Infec.***, v. 5, p. 1317–1327, 2003.
- FAVALI, C. *et al.* *Leishmania amazonensis* infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. ***J Leuk Biol.***, v. 82, p. 1401–6, 2007.
- FAVILA, M.A. *et al.* Human dendritic cells exhibit a pronounced type I IFN signature following *Leishmania major* infection that is required for IL-12 induction. 2014. ***J Immunol.***, v. 192, p. 5863-72, 2014.
- FIGUEIREDO, A. B. *et al.* *Leishmania amazonensis* impairs DC function by inhibiting CD40 expression via A2B adenosine receptor activation. ***European J Immunol.***, v. 42, p. 1203-1215, 2012.
- FIGUEIREDO, A.B., SOUZA-TESTASICCA, M. C.; CROCCO, L. A. Purinergic signaling and infection by *Leishmania*: A new approach to evasion of the immune response. ***Biomed J.***, v. 39, p. 244-250, 2016.

- FIGUEIREDO, A.B. *et al.* *Leishmania amazonensis*-Induced cAMP Triggered by Adenosine A<sub>2B</sub> Receptor Is Important to Inhibit Dendritic Cell Activation and Evade Immune Response in Infected Mice. **Front. Immunol.**, v. 8, p. 849, 2017.
- FIGUEIRÓ-FILHO, E. A. *et al.* Visceral leishmaniasis (kala-azar) and pregnancy. **Infecti Dis in Obstet and Gynec.**, v. 12, p. 31–40, 2004.
- FREITAS-MESQUITA, A.L.; MEYER-FERNANDES, J.R. Ecto-nucleotidases and ecto-phosphatases from *Leishmania* and trypanosoma parasites. **Subcell Biochem.**, v. 74, p. 217-252, 2014.
- FREITAS-MESQUITA, A.L. *et al.* Inhibitory effects promoted by 5-nucleotides on the ecto-3- nucleotidase activity of *Leishmania amazonensis*. **Exp Parasit.**, v. 169, p. 111 - 118, 2016.
- FREDHOLM, B.B. *et al.* Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 61, p. 443– 448, 2001.
- FUKUTANI, K. F. *et al.* Serological survey of *Leishmania* infection in blood donors in Salvador, Northeastern Brazil. **BMC Infect Dis.**, v. 14, 422, 2014.
- GENARO, O. *et al.* Leishmaniose Tegumentar Americana. **Parasitologia Humana**, 10 ed. São Paulo: Atheneu. 36-53, 2000.
- GHOSH, M.; BANDYOPADHYAY, S. Interaction of *Leishmania* parasites with dendritic cells and its functional consequences. **Immunobiology**, v. 209, p. 173–7, 2004.
- GOMES R.S., *et al.* E-NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) of *Leishmania amazonensis* inhibits macrophage activation. **Microb Infect**, v. 17, p. 295-303, 2015.
- GONTIJO B., CARVALHO M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Rev da Soc Bras de Med Trop**, v. 36, p. 71-80, 2003.
- GORINI, S. *et al.* Regulation of innate immunity by extracellular nucleotides. **Am J Blood Res**, v. 1, p. 14-28, 2013.
- GUIMARAES-COSTA, A. B. *et al.* *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **PNAS**, v. 106, 2009.
- HASKÓ, G., *et al.* Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. **Nature Rev. Drug Discov**, v. 7, p. 759–770, 2008.
- HURREL, B. P., REGLI, I. B.,; TACCHINI-COTTIER, F. Different *Leishmania* Species Drive Distinct Neutrophil Functions. **Trends in Parasit**, v. 32, p. 392–401, 2016.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microb**, v. 9, p. 604–15, 2011.
- KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis. **Human vaccine**, v. 7, p. 1204–14, 2011.

KOMAI-KOMA, M. *et al.* Anti- Toll-like receptor 2 and 4 antibodies suppress inflammatory response in mice. *Immunology*, v. 143, p. 354–362, 2014.

KUKULSKI, F. *et al.* NTPDase1 Controls IL-8 Production by Human Neutrophils. *J Immunol*, v. 187, p. 644-653, 2011.

KUMAR, V.; SHARMA, A., Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 616, p. 7–15, 2009.

LA SALA, A. *et al.* Extracellular ATP induces a distorted maturation of dendritic cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses. *J Immunol.*, v. 166, p. 1611- 1617, 2001.

LA SALA, A. *et al.* Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J Leuk Biol.*, v. 73, p. 339-343, 2003.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends in Microb.*, v. 11, p. 210–214, 2003.

LAUFS, H. *et al.* Intracellular Survival of *Leishmania major* in Neutrophil Granulocytes after Uptake in the Absence of Heat-Labile Serum Factors. *Infec and Immun.*, v. 70, 2002.

LEAL, D. B. *et al.* Characterization of NTPDase (NTPDase1; ectoapyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1721: 9–15, 2005.

LEY, K. *et al.* Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immun.*, v. 7, p. 678–89, 2007.

LIESE, J.; SCHLEICHER, U. AND BOGDAN, C. TLR9 signaling is essential for the innate NK cell response in murine cutaneous leishmaniasis. *Europ J of Immun.*, v. 37, p. 3424–343, 2007.

LIMA, M.H.F. *et al.* *Leishmania infantum* Parasites Subvert the Host Inflammatory Response through the Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor to Promote the Establishment of Infection. *Front. Immunol.*, v. 8, p. 815, 2017.

LIU, D.; UZONNA, J. E.; BENGOCHEA, J. A. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infec Microb.*, v. 2, p. 1–8. 2012.

MARKO S; SIRPA J. Cell surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nat Rev Immunol.*, v. 5, p. 760–771, 2005.

MARQUES-DA-SILVA E.A. *et al.* Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. *Microb Infect.*, v. 10, p. 850-7, 2008.

MARSDEN, P.D. Mucosal leishmaniasis. *Transact of the Royal Soc of Trop Med and Hyg.*, v. 80, p. 859-876, 1986.

MARSDEN, P.D. et al. Spontaneous healing of *Leishmania braziliensis* skin ulcers. *Transact of the Royal Soc of Trop Med and Hyg.*, v. 78, p. 561-562, 1984.

MARTINY, A., J. R. MEYER-FERNANDES, W. S.,; VANNIER- SANTOS. M. A. Altered tyrosine phosphorylation of ERK1 MAP kinase and other macrophage molecules caused by *Leishmania* amastigotes. *Mol. Bio- chem. Parasitol.*, v. 102, p. 1–12, 1999.

MAYER-SCHOLL, A.; AVERHOFF, P.; ZYCHLINSKY, A. How do neutrophils and pathogens interact? *Current Opinion in Microb.*, v. 7, p. 62–6, 2004.

MEGIOVANNI, A. M.; GLUCKMAN, J. C.; BOUDALY, S. Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells : a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. *J Leuk Biol.*, v. 79, p. 977-988, 2006.

MEYER-FERNANDES JR. et al. Mg-dependent ecto-ATPase activity in *Leishmania tropica*. *Arch Biochem Biophys.*, v. 341, p. 40–6, 1997.

NANDAN, D.,; REINER, N. E.. Attenuation of gamma-interferon- induced tyrosine phosphorylation in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania donovani*: selective inhibition of signaling through Janus kinases and Stat1. *Infect. Immun.*, v. 63, p. 4495–4500, 1995.

NANDAN, D., LO, R.; REINER, N. E.. Activation of phosphotyrosine phosphatase activity attenuates mitogen-activated protein kinase signaling and inhibits c-FOS and nitric oxide synthase expression in macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infect. Immun.*, v. 67, p. 4055–4063, 1999.

NAUCKE, T.J.; LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniasis from naturally infected dogs in Germany. *Parasites & Vectors.*, v. 5, p. 67, 2012.

NOVAIS, F. O. et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *J Immunol.*, v. 183, p. 8088–98, 2009

NOVITSKIY, S. V. et al. Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood*, v. 112, p. 1822–1831, 2008.

OLIVEIRA, C. I. DE; BRODSKY, C. I.; SAMMONS-JACKSON, W. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Front in Immunol.*, v. 3, p. 1–9, 2012.

OLIVEIRA, R. A et al. Visceral leishmaniasis after renal transplantation: report of 4 cases in northeastern Brazil. *Transplant Infec Dis: an Official J of the Transp Society*, v. 10, p. 364–8, 2008.

OLIVEIRA, F. et al. Sand flies, *Leishmania*, and transcriptome-borne solutions. *Parasitol Int.*, v.1, p. 1-5, 2009.

OLIVIER, M., BROWNSEY, R. W.; REINER, N. E. Defective stimulus- response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein-kinase-c. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA. v. 89, p. 7481–7485,

1992.

OLIVIER, M., GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clinic Microb Reviews.*, v. 18, p. 293-305, 2005.

PALETTA-SILVA, R., *et al.* *Leishmania amazonensis*: characterization of an ecto-3'-nucleotidase activity and its possible role in virulence. *Exp. Parasitol.*, v. 129, p. 277-283, 2011.

PALETTA-SILVA, R., MEYER-FERNANDES, J.R. Adenosine and immune imbalance in visceral leishmaniasis: the possible role of ectonucleotidases. *J. Trop. Med.*, 650874, 2012.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Información general: Leishmaniasis, 2019.

PEARSON, R.D.; SOUSA, A.Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis.*, v. 22, p. 1-13, 1996.

PERES, N.T.A. *et al.* Infection of Human Macrophages by *Leishmania infantum* Is Influenced by Ecto-Nucleotidases. *Front in Immunol.*, v. 8, p. 1954, 2018.

PETERS, N. C.; SACKS, D. L. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol.*, v. 11, 1290–6, 2009.

PHAM, C. T. N. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immun.*, v. 6, p. 541–50, 2006.

PINSKY, D.J. *et al.* Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. *J Clin Invest.*, v. 109, p. 1031–1040, 2002.

POON, I.K.H. *et al.* Unexpected link between an antibiotic, pannexin channels and apoptosis. *Nature*, v. 507, p. 329–334, 2014.

PRINA, E., *et al.* Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. *J Cell Sci*, v. 117, p. 315-325, 2004.

PULTE E.D., *et al.* Function of CD39 (NTPDase-1) in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, v. 106, p. 11–6, 2005.

PULTE, E. D. *et al.* CD39/NTPDase-1 activity and expression in normal leukocytes. *Thrombosis Research*, v. 121, p. 309–317, 2007.

QI, H.; POPOV, V.; SOONG, L. *Leishmania amazonensis* -Dendritic Cell Interactions In Vitro and the Priming of Parasite-Specific CD4<sup>+</sup> T Cells In Vivo. *J Immunol*, v. 167, p. 4534–4542, 2001.

RAI, A. K. *et al.* High concentration of adenosine in human visceral leishmaniasis despite increased ADA and decreased CD73. *Parasit Immunol*, v. 33, p. 632–636, 2011

- REAL, F. *et al.* Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. *Cell Microb*, v. 16, p. 1549–64, 2014.
- RESENDE, M. *et al.* Leishmania-infected MHC Class II high dendritic cells polarize CD4+ T cells toward a nonprotective T-bet+ IFN- + IL-10+ phenotype. *J Immunol*, v. 191, p. 262–73, 2013.
- RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. *Front in Cell and Infec Microb*, v. 2, p. 59, 2012.
- RIERA, C.; VALLADARES, J.E. Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs. *Parasit Today*, v. 12, p. 412, 1996.
- RITTER, U.; FRISCHKNECHT, F.; VAN ZANDBERGEN, G. Are neutrophils important host cells for Leishmania parasites? *Trends in Parasit*, v. 25, p. 505–10, 2009.
- ROGERS, M. E. *et al.* Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*, v. 430, p. 463–467, 2004.
- RUIZ, J. H.; BECKER, I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*, México. v. 29, p. 671-678, 2007.
- SABROE, I.; WHYTE, M. K. B. Toll-like receptor ( TLR ) -based networks regulate neutrophilic inflammation in respiratory disease. *Bioch Soc Transac*, v. 35, p. 1492–1495, 2007.
- SAITOH, T. *et al.* Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host & Microb*, v. 12, p. 109–16, 2012.
- SALMI, M.; JALKANEN, S. Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nat Rev*, v. 5, p. 760-771, 2005
- SAVILL, J. *et al.* A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immun*, v. 2, p. 965–75, 2002.
- SARKAR, A. *et al.* Infection of neutrophil granulocytes with *Leishmania major* activates ERK 1/2 and modulates multiple apoptotic pathways to inhibit apoptosis. *Medical Microb and Immun*, v. 202, p. 25–35, 2013.
- SAVILL, J.; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, v. 407, 2000.
- SCHLEICHER, U *et al.* NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL- 12, but is independent of plasmacytoid DCs. *The J of Exp Med.*, v. 204, p. 893–906, 2007.
- SHESHACHALAM, A. *et al.* Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils. *Front Immunol.*, v. 5, p. 448, 2014.

SILVA, F. L. *et al.* Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasit.*, v. 160, p. 55–9, 2009.

SILVEIRA, F. T. *et al.* Reviewing the role of the dendritic Langerhans cells in the immunopathogenesis of American cutaneous leishmaniasis. *Transact of the Royal Soc of Trop Med and Hyg.*, v.102, p. 1075–8, 2008.

SILVEIRA, F. T. *et al.* Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.*, v. 31, p. 423–431, 2009.

SITKOVSKY MV. Extracellular purines and their receptors in immunoregulation. Review of recent advances. *Nippon Ika Daigaku Zasshi.*, v. 65, p. 351–357, 1998.

SOONG, L. Modulation of Dendritic Cell Function by *Leishmania* Parasites. *J Immunol.*, v. 180, p. 4355–4360, 2008.

SOUZA M.C., *et al.* The influence of ecto-nucleotidases on *Leishmania amazonensis* infection and immune response in C57B/6 mice. *Acta Trop.*, v. 115, p. 262–9, 2010.

SUZUE, K. *et al.* Critical role of dendritic cells in determining the Th1/Th2 balance upon *Leishmania major* infection. *Int.Immunol.*, v. 20, p. 337–343, 2008.

TIBURCIO, R. *et al.* Molecular Aspects of Dendritic Cell Activation in Leishmaniasis: An Immunobiological View. *Front in Immun.*, v. 10, p. 27, 2019.

VAN GISBERGEN, K. P. J. M. *et al.* Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J Exp Med.*, v. 201, p. 1281–92, 2005.

VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A.; XIN, L.; SOONG, L. *Leishmania braziliensis* Infection Induces Dendritic Cell Activation, ISG15 Transcription, and the Generation of Protective Immune Responses. *J. Immunol.*, v. 180, p. 7537–7545, 2008.

VASCONCELLOS R. de S. *et al.* *Leishmania infantum* ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is an apyrase involved in macrophage infection and expressed in infected dogs. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 8, p. 3309, 2014.

VASQUEZ, R. E., XIN, L.; SOONG, L. Effects of CXCL10 on dendritic cell and CD4+ T-cell functions during *Leishmania amazonensis* infection. *Infection and Immunity*, v. 76, p. 161–169, 2008.

VIJAYAMAHANTESH *et al.* Up regulation of A<sub>2B</sub> adenosine receptor on monocytes are crucially required for immune pathogenicity in Indian patients exposed to *Leishmania donovani*. *Cytokine*, v. 79, p. 38–44., 2016.

VON STEBUT, *et al.* Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti- *Leishmania* immunity. *J. Exp. Med.*, v. 188, p. 1547–1552, 1998.

WILSON, J. M. *et al.* The A2B adenosine receptor impairs the maturation and immunogenicity of dendritic cells. *J. Immunol.*, v. 182, p. 4616–4623, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Department of Control of Neglected Tropical Diseases. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. *Wkly. Epidemiol. Rec.*, v. 22, p. 285–296, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis: Epidemiological Situation, 2019.

XIN L, LI Y; SOONG. L. Role of Interleukin- 1b in activating the CD11c<sup>high</sup> CD45RB-dendritic cell subset and priming *Leishmania amazonensis*-specific C4<sup>+</sup> T cells *in vitro* and *in vivo*. *Infect. Immun.*, v. 75, p. 5018–5026, 2007.

XIN, L., LI, K.; SOONG, L. Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Molec. Immunol.*, v. 45, p. 3371- 3382, 2008.

ZANDBERGEN, G. VAN *et al.* Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages. *J. Immunol.*, 2004.