



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE IMUNOPARASITOLOGIA



VICTOR JOSÉ BRÁZ DE SOUZA

**PAPEL DA CAFEÍNA EM MODELO DE INFECÇÃO *in vitro* DE CÉLULAS J774A.1
POR *LEISHMANIA MAJOR***

OURO PRETO – MG

2019



VICTOR JOSÉ BRÁZ DE SOUZA



**PAPEL DA CAFEÍNA EM MODELO DE INFECÇÃO *in vitro* DE CÉLULAS J774A.1
POR *LEISHMANIA MAJOR***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Nutrição, da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial para obtenção do título de Nutricionista.

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso - Departamento de Ciências Biológicas – NUPEB/UFOP.

Coorientador: Msc. Flávio Pignataro Oshiro – Imunobiologia de Protozoários

OURO PRETO – MG

2019

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S729p Souza, Victor Jose Braz De .

Papel da cafeína em modelo de infecção in vitro de células J774A.1 por Leishmania major. [manuscrito] / Victor Jose Braz De Souza. - 2019. 66 f.: il.: color., gráf..

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso. Coorientador: Me. Flávio Pignataro Oshiro.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Graduação em Nutrição .

1. Cafeína - Efeito fisiológico. 2. Adenosina - Trifosfato. 3. Imunologia. I. Afonso, Luís Carlos Crocco. II. Oshiro, Flávio Pignataro. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

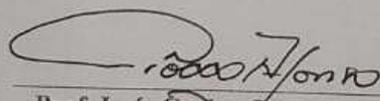
Bibliotecário(a) Responsável: Sônia Marcelino - CRB6-2247

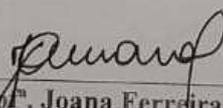


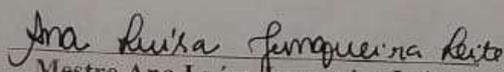
**Ata da Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado:
"Papel da cafeína em modelo infecção in vitro de células J774A.1 por Leishmania major".**

Aos 18 dias do mês de dezembro de 2019, no Auditório do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB) do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (ICEB) da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Banca Examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso do estudante **Victor José Bráz de Souza**, orientado pelo Prof. Luís Carlos Crocco Afonso. A defesa iniciou-se pela apresentação oral feita pelo estudante, seguida da arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVATE o estudante.

Membros da Banca Examinadora:


Prof. Luís Carlos Crocco Afonso
Presidente (DECBI/ICEB/UFOP)


Prof. Joana Ferreira do Amaral
Examinadora (DENCIS/ENUT/UFOP)


Mestre Ana Luísa Junqueira Leite
Examinadora (DECBI/ICEB/UFOP)

DEDICATÓRIA

Ao meu grande amigo Nelson Vieira (*in memoriam*), que de um modo muito especial e inesperado me mostrou o valor de uma grande e verdadeira amizade!

"Um presente de Deus para que aprendêssemos a generosidade nos foi dado pelo nome de Nelson. Cada um de nós cumpre sua missão de uma forma, durante essa trajetória denominada vida. Seu Nelson fez de sua caminhada um ato de espalhar amor. Carregou em seus passos a alegria de cada gesto. Distribuiu doses diárias de sorrisos, abraços e afetos."

Marianna Carvalho Gontijo

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria e José, por serem o meu maior exemplo de amor, dedicação e persistência. O apoio de vocês foi o maior impulso em minha caminhada.

Às minhas irmãs, Erica e Enara, e aos meus sobrinhos, Gabriel e Ana Júlia por serem família em todos os momentos e caminharem sempre junto de mim. Ao Marley, por me contagiar de alegria, apesar da minha constante ausência. *Ohana!*

De modo muito especial agradeço ao meu orientador, Luís Carlos Crocco Afonso, por ser meu maior exemplo de pesquisador. Muito obrigado pela confiança e pela oportunidade de ser seu orientando. Sua paciência, dedicação e os valiosos ensinamentos foram essenciais não apenas na construção desse trabalho, mas na minha formação profissional.

Ao melhor coorientador no mundo da pesquisa, Flávio Pignataro Oshiro, pela imensa ajuda na realização desse trabalho e por todos os ensinamentos científicos. Sem você (com toda sua paciência) a construção desse material não seria possível. Agradeço, especialmente, pelo carinho manifestado em formas de chocolates que surgiam quando o desânimo batia à porta.

À melhor equipe de laboratório pela agradável convivência e pelos momentos de lazer. Aos Lipanos, Marcorélio, Leandro, Ive, Luana, Pierre, Renata, Samantha e Bárbara, a minha eterna gratidão pelos momentos de lazer, pelas conversas e momentos de risadas, pelos cafés e confraternizações, pelos ensinamentos e colaboração. Em especial, agradeço à Fernanda por compartilhar comigo o sofrimento dos experimentos falhos e pela ajuda nos experimentos bem-sucedidos.

Aos laboratórios colaboradores: Laboratório Multiusuário de Microscopia do NUPEB, Laboratório Multiusuário Cipharma da EFAR, Laboratório de Biomateriais e Patologia Experimental (LBPE) e Laboratório de Epidemiologia Molecular (LEM).

Às grandes amigas que fiz ao longo do curso de Nutrição. De modo especial, Karina e Letícia, por sofrerem comigo em quase todos os trabalhos e pela amizade sincera. Aos que foram o meu primeiro grupo de amigos, Aline, Lara, Jéssica e João Marcos (que me acompanha há muito mais tempo), por tornarem a caminhada mais divertida. Aos que me conquistaram depois, Priscila (e o meu agregado preferido, Dudu), Laísa, Brenda, Isabela, Rapha, Mariane, Marianna, Gabriela, Catharina e Samantha, por tornarem meus dias mais leves. Obrigado por dividirem os momentos de estresse, os rocks, almoços e cervejadas, mas acima de tudo obrigado pela

presença constante e fraterna. Não posso esquecer as amizades que marcaram a minha caminhada, mas buscaram outros rumos, Thamires e Karol, vocês foram luz e alegria em minha vida.

Aos meus amigos de longa data, mas que permanecem em minha vida e marcam a minha história de diversas formas. De maneira especial aos *Los Compadres* Amanda, Ramon, Luísa, Narrian e Thaís. À minha grande companheira, Nayara, com quem dividi momentos mais que especiais.

À essa pessoa sensacional que entrou em minha vida e tornou meus dias mais divertidos e leves. Mauro, obrigado por se fazer sempre presente, mesmo à distância. Obrigado também por ser meu apoio na realização dos meus sonhos e pela sua amizade, compreensão e carinho.

Aos professores, do ciclo básico e profissionalizante, por todo ensinamento que contribuíram para minha formação e para a conclusão deste trabalho. De modo muito especial, agradeço à tríade de professoras por quem cultivei grande carinho ao longo do curso: Silvana, Simone (minha querida mamãe) e Tereza, obrigado pela convivência e por serem muito além de educadoras. À professora Ana Lúcia por ser minha inspiração e meu modelo de competência.

Às professoras que me permitiram a experiência de participar de projetos de extensão, Marília Alfenas, quem me deu a primeira oportunidade, e Fernanda Drummond, que me agraciou com a melhor experiência e me ajudou na descoberta daquilo que gosto: Nutrição Esportiva.

À professora Joana Amaral e à mestre Ana Luísa Junqueira, que tão prontamente aceitaram avaliar e contribuir para a formação desse material.

À acolhedora Escola de Nutrição (ENUT), por proporcionar toda estrutura para a capacitação profissional de seus alunos. Seus corredores abrigam grandes histórias.

À Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) pelo ensino de qualidade.

Ao CNPQ e FAPEMIG pelo financiamento do trabalho.

Enfim, agradeço a todos que fizeram parte dessa história!

*A felicidade pode ser encontrada inclusive nos momentos mais escuros;
só é preciso se lembrar de acender a luz.*

Alvo Percival Wulfrico Brian Dumbledore

RESUMO

A cafeína é a substância psicoativa mais consumida no mundo e exerce suas ações por antagonizar os quatro tipos de receptores de adenosina. A sinalização purinérgica tem como principal molécula sinalizadora o ATP extracelular que é um potente estimulador da resposta inflamatória. A resposta induzida pelo ATP é regulada principalmente pela ação das ectonucleotidases que são responsáveis pela hidrólise do ATP a adenosina. A adenosina (ADO) é um importante nucleosídeo que possui diversos efeitos imunomoduladores, induzindo o estabelecimento de respostas anti-inflamatórias. A hidrólise da ADO é realizada pela enzima adenosina desaminase (ADA) que promove a desaminação hidrolítica da ADO até inosina. A expressão de ectonucleotidases e a produção de ADO é uma das vias exploradas por parasitos do gênero *Leishmania* para evadir do sistema imunológico. Considerando as ações da cafeína, o objetivo deste estudo foi avaliar seu efeito na resposta das células J774A.1 (linhagem monocítica) durante a infecção por *Leishmania major*. Investigamos o efeito citotóxico da cafeína pela viabilidade celular (MTT), no qual células J774A.1 foram incubadas em meio enriquecido com cafeína. Foi realizada uma curva de crescimento dos parasitos tratados com cafeína em diferentes concentrações durante sete dias. Para investigar os efeitos da cafeína na degradação de adenosina, determinamos a atividade da ADA em células J774A.1 expostas à cafeína. Em relação à infecção, células J774A.1 foram infectadas por *L. major* e tratadas com 10 μ M de cafeína em diferentes momentos. Foi determinada a taxa de infecção e a produção de NO, IL-10 e TNF. Os resultados demonstraram que a concentração de cafeína é capaz de interferir no crescimento de células J774A.1 e *Leishmania*, especialmente em concentrações e tempos de exposição elevados. Não foi observado nenhuma alteração significativa na atividade da ADA decorrente do tratamento com cafeína em células J774A.1. No contexto da infecção, o tratamento com cafeína antes da infecção reduziu a produção de NO e manteve elevada as taxas de infecção em células estimuladas com LPS e IFN- γ . Os tratamentos realizados durante a infecção não alteraram a produção de NO. A produção das citocinas TNF e IL-10 não foram modificadas pelo tratamento com cafeína. Apesar dos efeitos da cafeína sobre o sistema imune, descritos na literatura, não foram observados efeitos significativos no contexto da infecção de macrófagos da linhagem J774A.1 por *L. major* para as doses de cafeína administradas.

PALAVRAS-CHAVE: cafeína, *Leishmania major*, sinalização purinérgica, adenosina.

ABSTRACT

Caffeine is the most consumed psychoactive substance in the world and acts by antagonizing the four types of adenosine receptors. Purinergic signaling has as its main signaling molecule the extracellular ATP, which is a potent stimulant of the inflammatory response. The ATP-induced response is mainly regulated by the action of ectonucleotidases that are responsible for ATP hydrolysis to adenosine. Adenosine (ADO) is an important nucleoside which contains several immunomodulatory effects, inducing the establishment of anti-inflammatory responses. The ADO's hydrolysis is performed by the enzyme adenosine deaminase (ADA) which promotes hydrolytic deamination of the ADO to inosine. The ectonucleotidases expression and ADO's production are pathways explored by the *Leishmania* genus parasites to evade the immune system. Considering the caffeine's actions, the objective of this study was to evaluate its effect on the J774A.1 (monocytic lineage) cell's response during *Leishmania major* infection. We analyzed the caffeine's cytotoxic effect through cellular viability (MTT), in which J774A.1 cells were incubated in caffeine-enriched medium. A growth curve of the caffeine-treated parasites at different concentrations was performed for seven days. To investigate the effects of caffeine on adenosine degradation, we determined ADA activity on caffeine-exposed J774A.1 cells. Regarding infection, J774A.1 cells were infected by *L. major* and treated with 10 μ M of caffeine at different times. The infection rate and production of NO, IL-10 and TNF were then determined. The results demonstrate that caffeine concentration is capable of interfering with J774A.1 cells and *Leishmania* growth, especially at high concentrations and exposure time. No significant change in ADA activity was observed due to caffeine treatment in J774A.1 cells. In the regards of infection, treatment prior to infection reduced NO production and maintained high infection rates in LPS/IFN- γ -stimulated cells. Treatments performed during infection did not change NO production. The production of TNF and IL-10 cytokines were not modified by caffeine treatment. Despite caffeine's effects on the immune system, described in the literature, no significant effects were observed in the regards of infection of J774A.1 macrophage by *L. major* for the caffeine doses administered.

KEYWORD: caffeine, *Leishmania major*, purinergic signaling, adenosine.

FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001; do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Sua identificação na FAPEMIG é CBB APQ 01237-15.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Fórmula química estrutural da cafeína..... | 21 |
| Figura 2: Fórmulas químicas estruturais da adenosina e cafeína..... | 22 |
| Figura 3: Efeitos moduladores da cafeína no sistema imune..... | 24 |
| Figura 4: Mecanismo e efeitos moduladores da cafeína no sistema imune..... | 25 |
| Figura 5: Componentes da sinalização purinérgica..... | 26 |
| Figura 6: Fases da sinalização purinérgica após injúria tecidual..... | 28 |
| Figura 7: Estágio do ciclo de vida do parasito no hospedeiro invertebrado..... | 30 |
| Figura 8: Papel do tratamento com cafeína no perfil de crescimento de <i>L. major</i> | 41 |
| Figura 9: Crescimento de células J774A.1 tratadas com cafeína ao longo do tempo..... | 42 |
| Figura 10: Atividade da adenosina desaminase de células J774A.1 tratadas com cafeína e estimuladas com LPS e IFN- γ | 44 |
| Figura 11: Taxa de infecção de <i>L. major</i> em células J774A.1 tratadas com cafeína 10 μ M e estimuladas com LPS e IFN- γ | 45 |
| Figura 12: Produção de óxido nítrico em células J774A.1 tratadas com cafeína 10 μ M e estimuladas com LPS e IFN- γ | 46 |
| Figura 13: Produção de óxido nítrico em células J774A.1 infectadas com <i>L. major</i> e tratadas com cafeína 10 μ M..... | 47 |
| Figura 14: Produção de óxido nítrico em células J774A.1 infectadas ou não com <i>L. major</i> e tratadas com cafeína 10 μ M..... | 48 |
| Figura 15: Produção de IL-10 em células J774A.1 expostas a 10 μ M de cafeína e estimuladas com LPS e IFN- γ | 49 |
| Figura 16: Produção de IL-10 em células J774A.1 infectadas com <i>L. major</i> expostas a 10 μ M de cafeína e estimuladas com LPS e IFN- γ | 50 |
| Figura 17: Produção de TNF em células J774A.1 expostas a 10 μ M de cafeína e estimuladas com LPS e IFN- γ | 51 |

Figura 18: Produção de TNF em células J774A.1 infectadas com *L. major* expostas a 10 μ M de cafeína e estimuladas com LPS e IFN- γ52

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA – adenosina desaminase

ADO - adenosina

ADP – adenosina difosfato

AMP – adenosina monofosfato

AMPC – adenosina monofosfato cíclico

ATP – trifosfato de adenosina

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

ELISA – *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

HEPES – Ácido Hidroxi-Etil-Piperazina-Etano-Sulfônico

IFN- γ – interferon gama

IL – interleucina

iNOS – óxido nítrico sintase

LPS – lipopolissacarídeo

mRNA – RNA mensageiro

MTT – 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromidefor / brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)]- 2,5-difeniltetrazólio

NETs – *neutrophil extracellular traps*

NF- κ B – fator de transcrição nuclear kappa B

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS - *phosphate buffered saline*

PKA - *protein kinase A*

ROS – *reactive oxygen species*

SDS – *sodium dodecyl sulfate*

TCR – *T-cell receptor*

Th – *T helper*

TNF – fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 18 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO..... | 21 |
| 2.1. Cafeína | 21 |
| 2.2. Cafeína e sistema imune | 23 |
| 2.3. Sinalização Purinérgica | 26 |
| 2.4. Sinalização purinérgica e sistema imune..... | 27 |
| 2.5. <i>Leishmania</i> e leishmaniose..... | 29 |
| 2.6. <i>Leishmania</i> e sistema imune | 31 |
| 2.7. <i>Leishmania</i> e sinalização purinérgica..... | 32 |
| 3. JUSTIFICATIVA..... | 34 |
| 4. OBJETIVOS..... | 35 |
| 4.1. Objetivo geral | 35 |
| 4.2. Objetivos específicos | 35 |
| 5. METODOLOGIA | 36 |
| 5.1. Crescimento de <i>L. major</i> em meio enriquecido com cafeína | 36 |
| 5.2. Viabilidade de células J774A.1 tratadas com cafeína | 36 |
| 5.3. Atividade da adenosina desaminase de células J44A.1 tratadas com cafeína..... | 37 |
| 5.4. Infecção experimental de células J774A.1 por <i>L. major</i> | 38 |
| 5.5. Análise estatística dos dados..... | 39 |
| 6. RESULTADOS..... | 41 |
| 6.1. Cafeína altera o perfil de crescimento de <i>L. major</i> | 41 |
| 6.2. Cafeína é capaz de reduzir o crescimento de células J774A.1..... | 42 |
| 6.3. Cafeína não altera a atividade da enzima adenosina desaminase..... | 44 |
| 6.4. O tratamento com cafeína antes da infecção reverte a redução da taxa de infecção mediada pelo LPS e IFN- γ em células J774A.1 | 45 |
| 6.5. Tratamento com cafeína antes da infecção com <i>L. major</i> reduz a produção de óxido nítrico por células J774A.1 | 46 |
| 6.6. Células J774A.1 infectadas com <i>L. major</i> tem maior produção de NO quando tratadas com cafeína após 3 horas de infecção | 48 |
| 6.7. Tratamento com cafeína não altera a produção de IL-10 por células J774A.1..... | 49 |
| 6.8. O tratamento com cafeína não altera a produção de TNF em células J774A.1 infectadas ou não com <i>L. major</i> | 51 |
| 7. DISCUSSÃO..... | 53 |

| | |
|--|----|
| 8. SUMÁRIO DE RESULTADOS | 59 |
| 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO | 60 |
| 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 61 |

1. INTRODUÇÃO

A cafeína é uma substância psicoativa que, apesar de não possuir qualquer valor nutricional, é amplamente consumida no mundo todo. Ela está presente em diversos produtos alimentícios, como por exemplo, cafés, chás, refrigerantes e chocolates. Além disso, a cafeína também pode ser encontrada em alguns medicamentos. Esse alcaloide da família das xantinas é conhecido pelas suas propriedades estimulantes do sistema nervoso central e do metabolismo (AL REEF; GHANEM, 2018a; BARCELOS et al., 2014; CUNHA, 2012). Estudos tem demonstrado que, além dos efeitos no sistema nervoso central, a cafeína também atua sobre o sistema imune, por meio da inibição de fosfodiesterases, do bloqueio dos receptores de adenosina, dentre outros mecanismos (HORRIGAN; KELLY; CONNOR, 2006; VIEIRA et al., 2018).

Por ser capaz de interagir com os receptores de adenosina, a cafeína pode também influenciar um importante sistema de sinalização celular amplamente distribuído em células do sistema imunológico, o sistema purinérgico. A sinalização purinérgica envolve vias de comunicação celular, que tem como principal molécula sinalizadora, o ATP. Essa molécula, presente, geralmente, no meio intracelular está envolvida na regulação de processos fisiopatológicos e no fornecimento de energia para as células. Em situações onde há injúria celular ou infecção, o ATP pode ser liberado em quantidades significativas no meio extracelular, ativando a via de sinalização purinérgica, podendo favorecer o estabelecimento de uma resposta pró-inflamatória. O ATP extracelular e vários outros nucleotídeos ativam os receptores celulares P2X ou P2Y para estimular a inflamação (ALTENHOFEN, 2013; SALLES, 2011; ZIMMERMANN, 2011).

A resposta pró-inflamatória desencadeada pelo ATP no meio extracelular é regulada principalmente pela ação conjunta das ectonucleotidases, enzimas de membrana que hidrolisam ATP a adenosina. As principais ectonucleotidases são a ecto-NTPDase (CD39), responsável por hidrolisar ATP a ADP e, posteriormente, a AMP; e a ecto-5'-nucleotidase (CD73), que hidrolisa o AMP a adenosina (LINDEN; KOCH-NOLTE; DAHL, 2019). Esta molécula, por sua vez, exerce seus efeitos através de receptores do tipo P1, que resultam na inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias e na indução da liberação de interleucina-10 (IL-10) (ANTONIOLI et al., 2014; CRONSTEIN, 1994).

Esse acúmulo de adenosina é controlado pela ação da enzima adenosina desaminase (ADA). Outra enzima envolvida no metabolismo de purinas, a adenosina desaminase regula os

níveis extracelulares de adenosina convertendo essa molécula em inosina. A deficiência de ADA ou uma baixa atividade dessa enzima leva a imunodeficiência e resulta em acúmulo de adenosina (PASSOS et al., 2018). Portanto, a atividade da enzima adenosina desaminase é fundamental para reverter os efeitos anti-inflamatórios estimulados pela adenosina.

A expressão de ectonucleotidases e a produção de adenosina é uma das vias exploradas por muitos agentes infecciosos para evadir do sistema imunológico, garantindo sua sobrevivência na célula hospedeira (FRASSON, 2015; SANTOS, 2008; TONIN, 2014). Parasitos do gênero *Leishmania* são um exemplo de protozoário que explora essa via de sobrevivência (DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA et al., 2008).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são responsáveis por causar as leishmanioses, um complexo de doenças negligenciadas presentes em todos os continentes. O estabelecimento da leishmaniose visceral ou da leishmaniose cutânea é dependente da espécie do parasito e da interação entre este com seus hospedeiros. Além disso, a leishmaniose tegumentar pode se manifestar sob diferentes formas clínicas, como por exemplo, a leishmaniose cutânea, leishmaniose cutânea difusa e a leishmaniose mucocutânea, sendo as diferentes formas também dependentes da espécie do parasito (STEBUT, 2014).

A transmissão do parasito para o hospedeiro vertebrado ocorre por meio da inoculação das formas promastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos. Após a inoculação dos parasitos, neutrófilos e macrófagos são recrutados para o local da infecção com o objetivo de fagocitar as promastigotas e combater o tripanosomatídeo. Apesar de *Leishmania* poder infectar neutrófilos e outras células do sistema imune, como monócitos e células dendríticas, os macrófagos são as principais células nas quais esses parasitos vivem e se multiplicam, exercendo, portanto, um importante papel para o estabelecimento da infecção e persistência do parasito. Para sobreviver no interior dos macrófagos, *Leishmania* desenvolveu estratégias para evitar os efeitos microbicidas dessa célula e a montagem de uma resposta imune efetiva (DESCOTEAUX; PODINOVSKAIA, 2015).

Muitos componentes da resposta imune inata constituem uma linha de defesa contra os protozoários. Contudo, esses parasitos apresentam fatores de virulência e mecanismos de manipulação do sistema imune que possibilitam a sua sobrevivência dentro das células hospedeiras. Esses mecanismos incluem, dentre outros efeitos, a produção de citocinas anti-inflamatórias, além da inibição da produção de óxido nítrico pelos macrófagos (BOGDAN et

al., 1996; BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998; LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2008; ROGERS et al., 2002). Além desses, a modulação da resposta imune via sinalização purinérgica, onde destacam-se a ação das ectonucleotidases, constitui um importante mecanismo de evasão do sistema imune pelo parasito (FIGUEIREDO; SOUZA-TESTASICCA; AFONSO, 2016).

Um estudo demonstrou que células dendríticas infectadas com *Leishmania amazonensis* apresentam um aumento na expressão de ectonucleotidases quando comparado com células não infectadas (FIGUEIREDO et al., 2012). Ao propiciar a formação de adenosina a partir do ATP, por meio do aumento da expressão de ectonucleotidases, o parasito cria um ambiente favorável à sua sobrevivência, uma vez que a adenosina tem efeitos anti-inflamatórios.

Estudos revelaram que a suplementação com compostos imunoestimulantes pode ser uma estratégia promissora para um aumento da resposta pró-inflamatória (MABROK; WAHDAN, 2018). A ativação dos receptores A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ pela adenosina gera efeitos que inibem esta resposta. Deste modo, compostos capazes de antagonizar esses receptores podem reverter esse estado, possibilitando a montagem de uma resposta inflamatória efetiva, que no contexto de uma infecção poderia resultar na eliminação do parasito. Como descrito acima, um conhecido antagonista, não seletivo, dos receptores de adenosina é a cafeína, que pode exercer seus efeitos no sistema imune ao modular a expressão de citocinas pró-inflamatórias e/ou anti-inflamatórias (HORRIGAN; KELLY; CONNOR, 2006). Contudo, pouco se sabe sobre os efeitos da cafeína nas infecções por *Leishmania*. Deste modo, buscamos avaliar os efeitos da cafeína sob parasitos do gênero *Leishmania*, bem como sua capacidade de atuar no sistema de sinalização purinérgica em células do sistema imune.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Cafeína

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) (Fig. 1.) é um alcaloide das classes das metilxantinas presente em muitos alimentos. É uma substância inodora, que apresenta um gosto amargo. Isoladamente, existe sob a forma de um pó branco. Possui ponto de fusão de 238°C e é termo resistente (ELIAS et al., 2017). Entre os derivados das xantinas, a cafeína é a que possui maior potencial farmacológico de atuação sobre o sistema nervoso central.

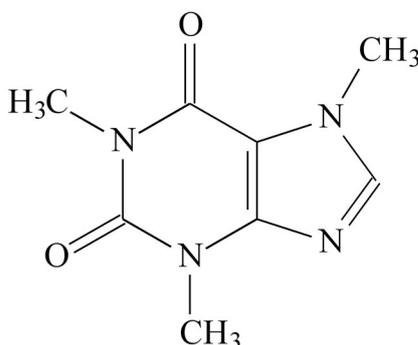


Fig. 1 – Fórmula química estrutural da cafeína (adaptado de ELIAS et al., 2017).

Apesar da cafeína não ser um nutriente essencial, nem fundamental para o bem-estar, ela é amplamente consumida em todo o mundo. A cafeína é encontrada em alimentos consumidos diariamente, tais como cafés, chás, refrigerantes, chocolates e energéticos (AL REEF; GHANEM, 2018a). Além disso, também está presente em alguns medicamentos e pode ser consumida na forma de suplementos. A cafeína sintética também pode ser adicionada aos produtos comerciais para promover a excitação, estado de alerta, energia e humor elevado (TEMPLE et al., 2017).

A molécula de cafeína apresenta característica apolar, que a torna capaz de atravessar a membrana plasmática das células, podendo, desta forma, exercer algum efeito sobre enzimas intracelulares e receptores de superfície celular. Além disso, a cafeína possui uma rápida absorção pelo trato gastrointestinal (FREDHOLM et al., 1999), atingindo um pico de concentração plasmática entre 30 a 75 minutos após a ingestão. Sugere-se, que após o consumo de até cerca de 6 xícaras de café por dia os níveis plasmáticos de cafeína geralmente variam entre 2 e 6 mg/L (MANDEL, 2002). Um outro estudo verificou que a ingestão de uma única

xícara de café, com uma dose de 0,4 a 2,5 mg/kg, forneça uma concentração plasmática máxima de 0,25 a 2 mg/L ou, aproximadamente, 1 a 10 μM (FREDHOLM et al., 1999).

Anteriormente, acreditava-se que a ação da cafeína no organismo era relacionada à inibição da fosfodiesterase de AMPc, que resultava no aumento das concentrações de AMP cíclico intracelular. Contudo, a inibição desta enzima necessita de altas concentrações de cafeína (MANDEL, 2002). Hoje, é sabido que a molécula de cafeína apresenta similaridade estrutural com a adenosina (Fig. 2), sendo, portanto, um análogo capaz de antagonizar os seus efeitos em diversas células. O bloqueio dos receptores de adenosina pela cafeína é o mecanismo mais aceito para explicar os principais efeitos no organismo (FREDHOLM et al., 1999).

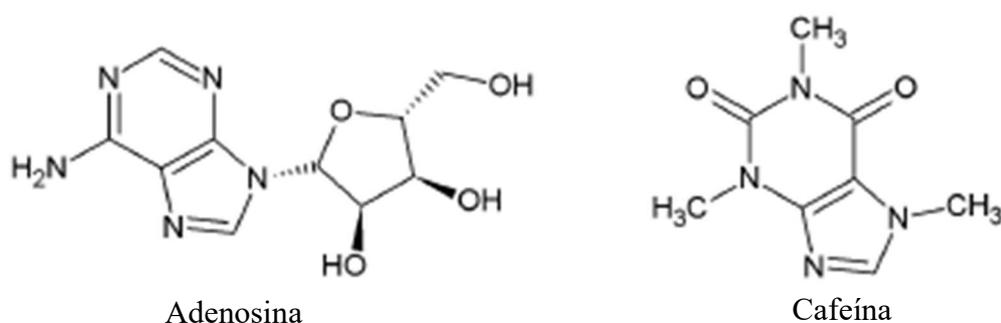


Fig. 2 – Fórmulas químicas estruturais da adenosina e cafeína. A cafeína é uma molécula análoga da adenosina. Sua similaridade estrutural possibilita sua ligação aos receptores celulares de adenosina (extraído de ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009).

Além dos efeitos psicoativos bem estabelecidos na literatura, a cafeína também exerce efeitos sobre outros sistemas orgânicos, como os sistemas cardiovascular, respiratório, renal, gastrointestinal e imunológico. Estudos sugerem que o consumo de café pode ser um fator de proteção contra doenças crônicas e autoimunes, como, diabetes mellitus tipo 2 e doença hepática (DOYLE; RANGANATHAN; CHEONG, 2017; FENTON et al., 2015; NIEBER, 2017; PRAY; YAKTINE; PANKEVICH, 2014; WELSH; PAN; BELIK, 2015).

Apesar de muitos estudos sugerirem efeitos benéficos da cafeína na saúde, deve-se alertar para o risco de toxicidade apresentado por altas dosagens dessa substância (acima de 15 mg/L no plasma). A U.S. Food and Drug Administration (FDA) determinou que é pouco provável que a ingestão diária total de 400 mg de cafeína represente um risco de danos graves para a população de adultos em geral (WILLSON, 2018). Além disso, a cafeína pode afetar

absorção e excreção de nutrientes essenciais, bem como os processos de reabsorção que ocorrem no intestino e no fígado (CUNHA, 2012).

2.2. Cafeína e sistema imune

Além dos bem definidos efeitos da cafeína sobre a estimulação do sistema nervoso central, estudos evidenciaram que a cafeína e seus metabólitos são capazes de modular o sistema imune. A cafeína exerce seus efeitos pela atuação nos receptores de adenosina e pelo acúmulo de AMPc nas células por meio da inibição das enzimas fosfodiesterase de AMPc, que subsequentemente causam ativação da proteína quinase A (PKA). Existem, portanto, dois mecanismos prováveis pelos quais a cafeína pode modular a resposta imunológica (CARVALHO JÚNIOR, 2017; FREDHOLM et al., 1999; HERRIGAN; KELLY; CONNOR, 2006).

Nos últimos anos tem crescido o espectro de estudos sobre os efeitos da cafeína no sistema imune (AL REEF; GHANEM, 2018a). Um grande problema enfrentado por esses estudos é a determinação da dose de cafeína testada, uma vez que o consumo de cafeína varia muito de pessoa para pessoa e de país para país. Além disso, mesmo dentro de uma população, o consumo de cafeína pode resultar em concentrações plasmáticas diferentes devido ao seu metabolismo e hábitos de vida (HERRIGAN; KELLY; CONNOR, 2006). Estudos sugerem que a cafeína atua, geralmente, de forma anti-inflamatória em múltiplos componentes do sistema imunológico (Fig. 3), por meio da ligação aos receptores A2A nas células imunes (SHARIF et al., 2017). Acredita-se que seus efeitos sejam dependentes da dosagem administrada.

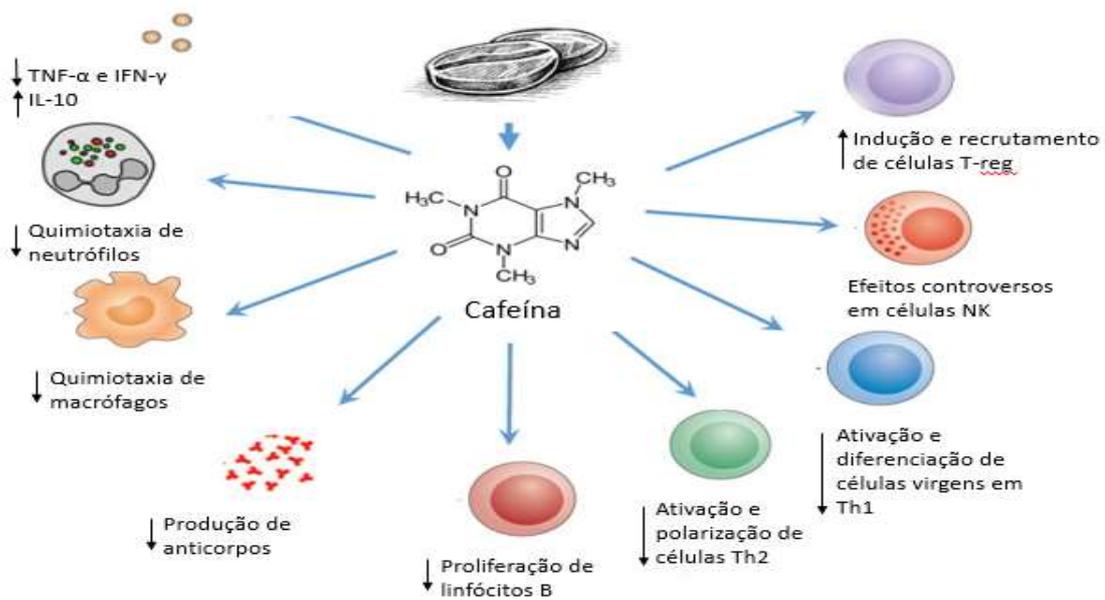


Fig. 3 – Efeitos moduladores da cafeína no sistema imune. A cafeína atua modulando a atividade e diferenciação celular, a produção de citocinas e de anticorpos (Adaptado de SHARIF et al., 2017).

Geralmente, ao se ligar aos receptores A1, a adenosina causa uma inibição da adenilil ciclase, levando a uma redução intracelular de AMPc. Contudo, ao ligar-se aos receptores do tipo A2a, ocorre uma estimulação da atividade da adenilil ciclase, acumulando AMPc nas células. A cafeína também atua na inibição da atividade da fosfodiesterase de AMPc (Fig. 4), levando ao acúmulo de AMPc no meio intracelular. O AMPc, por sua vez, ativa a PKA, bloqueando a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, TNF e IFN- γ , e estimulando produção de IL-10. Evidências sugerem que concentrações plasmáticas em torno de 100 μ M de cafeína são capazes de inibir a enzima fosfodiesterase, resultando em acúmulo de AMPc no espaço intracelular de células do sistema nervoso central (AL REEF; GHANEM, 2018b; ATIK et al., 2017).

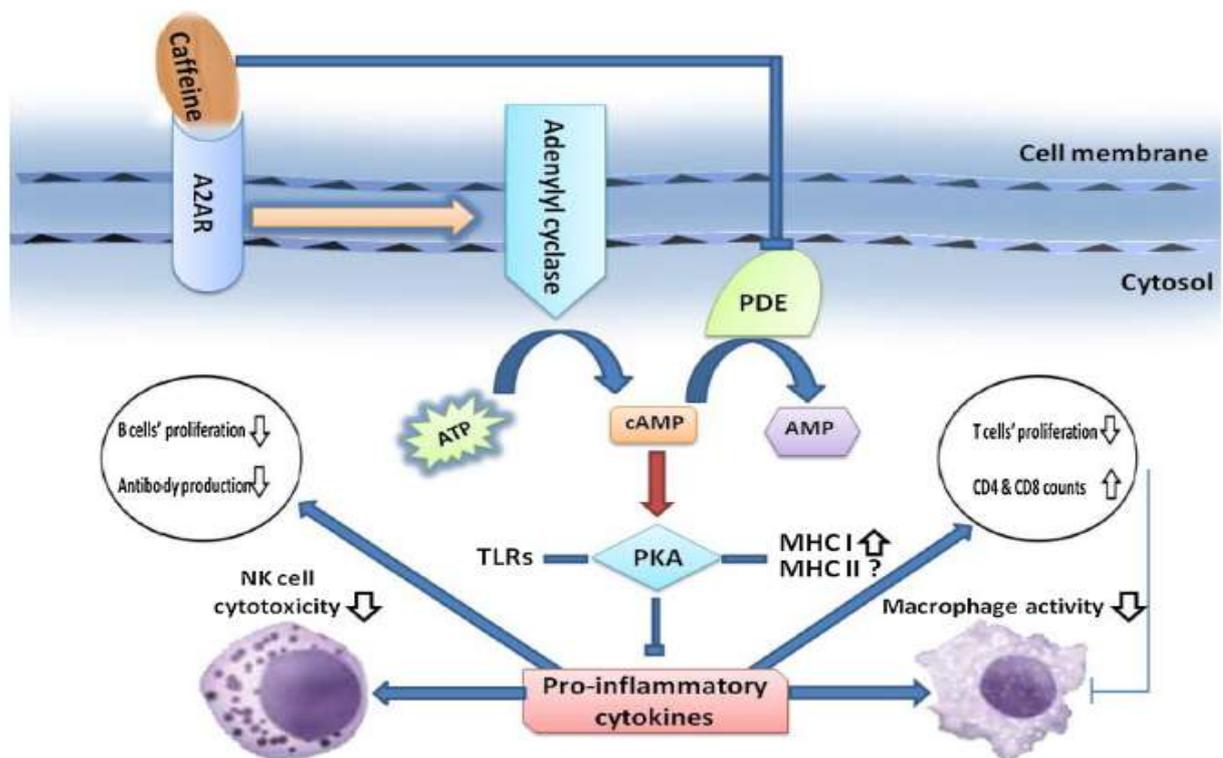


Fig. 4 – Mecanismo e efeitos moduladores da cafeína no sistema imune. A cafeína, ao se ligar aos receptores A2a na superfície de células imunes, estimula a enzima adenilil ciclase e inibe a fosfodiesterase, resultando em acúmulo de AMPc. O AMPc estimula a PKA que, por sua vez, bloqueia a produção de citocinas pró-inflamatórias, que atua por diversas vias na resposta imunológica (AL REEF; GHANEM, 2018b).

Um estudo verificou que a cafeína é capaz de suprimir a proliferação de linfócitos. Além disso, a cafeína, em altas doses, foi capaz de reduzir a atividade de macrófagos e células NK, ao contrário do efeito verificado em doses baixas, que aumentou a atividade dessas células. Esse efeito pró-inflamatório proporcionado por uma baixa dosagem é provavelmente causado pela saturação dos receptores de adenosina, independente da sua ação inibitória de fosfodiesterase. As altas concentrações, por sua vez, reduzem a atividade fagocítica e a viabilidade de macrófagos (AL REEF; GHANEM, 2018b; SHARIF et al., 2017).

Verifica-se, portanto, que a cafeína exerce efeitos moduladores no sistema imune pela via da sinalização purinérgica através da ligação aos receptores de adenosina e das interações com as enzimas adenilil ciclase e fosfodiesterase. Seus efeitos são dependentes da concentração de cafeína disponível. Deste modo, pode estimular respostas pró ou anti-inflamatórias de acordo com a dosagem de cafeína administrada.

2.3. Sinalização Purinérgica

A sinalização purinérgica compreende vias de comunicação celular diretamente relacionada com respostas imunes, processos inflamatórios, dor, coagulação, vasodilatação mediada pelo endotélio, proliferação e apoptose (ALTENHOFEN, 2013).

A adenosina trifosfato (ATP) é a principal molécula sinalizadora do sistema purinérgico. Está presente em todas as células, sendo uma fonte de energia, proveniente da respiração celular. Em situações de dano e morte celular, a molécula de ATP pode ser liberada para o meio extracelular. Após a liberação, o ATP se acumula no meio extracelular e desempenha efeitos excitatórios em muitas células. Na ausência de morte celular, o ATP pode ser liberado em resposta a outros tipos de estresse celular, como estimulação mecânica, hipóxia e infecção (BURNSTOCK; BOEYNAEMS, 2014).

Uma vez que o ATP é liberado para fora das células, sua concentração no meio extracelular é regulada pela ação de ectonucleotidases (Fig. 5), enzimas localizadas na superfície celular com um sítio catalítico orientado para o meio extracelular. Essas enzimas são responsáveis pela cascata de hidrólise que resulta na degradação de nucleotídeos presentes no espaço extracelular. As ectonucleotidases compreendem várias famílias de proteínas com diferentes especificidades de substrato (ZIMMERMANN, 2011).

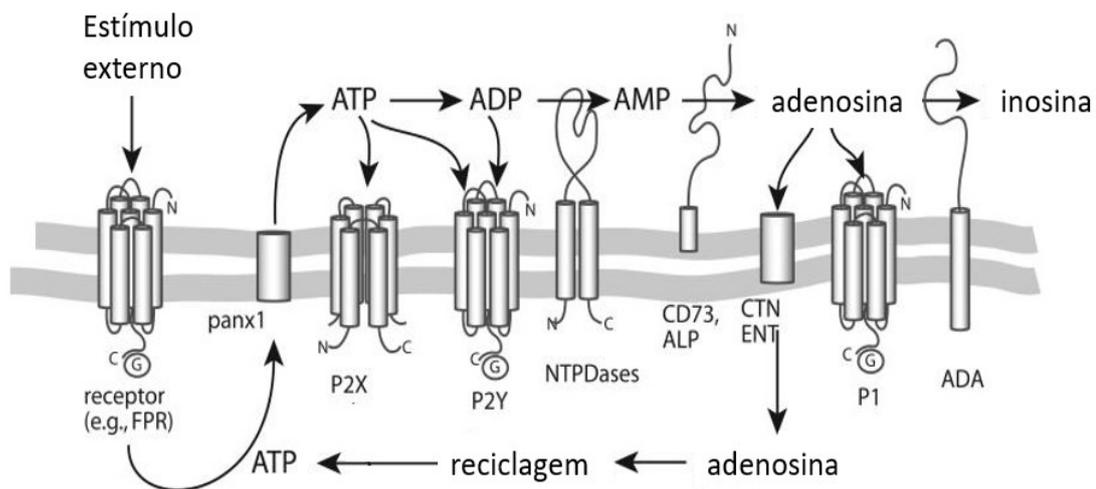


Fig. 5 – Componentes da sinalização purinérgica. Após um estímulo externo, a molécula de ATP pode ser liberada no meio extracelular através do canal panexina 1. Essa liberação de ATP leva à estimulação autócrina dos receptores P2X e hidrólise da molécula de ATP a adenosina pela ação de ectonucleotidases. A adenosina ativa os receptores do tipo P1 ou pode ser internalizada para reciclagem por canais específicos. No meio extracelular, a adenosina pode ser convertida à inosina pela ação de enzima adenosina desaminase (ADA). Adaptada de JUNGER (2011).

No espaço extracelular, o ATP é hidrolisado pela ação de enzimas pertencentes a três famílias das ectonucleotidasas: fosfatase alcalina, ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases) e ectonucleotídeos pirofosfatases / fosfodiesterases (ENPPs) (CEKIC; LINDEN, 2016). A enzima ecto-NTPDase (CD39) hidrolisa a molécula de ATP a ADP e posteriormente à uma forma mais simples, o AMP. Essa molécula, por sua vez, tem o grupo fosfato removido pela ação da enzima ecto-5'-nucleotidase (CD73), que leva à produção de adenosina (BURNSTOCK; BOEYNAEMS, 2014). O controle da sinalização adenosinérgica ocorre pela ação da enzima adenosina desaminase que catalisa a desaminação da adenosina a inosina e amônia (ZAVIALOV; ENGSTRÖM, 2005).

Adenosina está relacionada com a síntese de ácidos nucleicos, além de atuar no metabolismo de aminoácidos e na modulação do estado metabólico celular (ALTENHOFEN, 2013). A adenosina tem sua ação sobre os receptores da família P1, na qual são descritos 4 subtipos (A1, A2a, A2b e A3) (DI VIRGILIO; VUERICH, 2015). Quando presente no meio extracelular, a adenosina é capaz de se ligar aos receptores do tipo A2a e A2b na membrana celular e atuar antagonizando os efeitos do ATP extracelular.

2.4. Sinalização purinérgica e sistema imune

É estabelecido na literatura o papel da sinalização purinérgica na regulação de vários subconjuntos de células imunes (BURNSTOCK; BOEYNAEMS, 2014). Essa regulação se dá principalmente pela ação do ATP e de outros nucleosídeos e nucleotídeos no meio extracelular.

O estresse celular ou apoptose desencadeia a liberação de ATP e outros nucleotídeos no espaço extracelular (CEKIC; LINDEN, 2016). Após a lesão tecidual ou infecção, a sinalização purinérgica pode ser dividida em três fases (Fig. 6). Na primeira fase, denominada de fase aguda, ocorre um rápido efluxo de ATP para o meio extracelular. Esse ATP acumula no espaço extracelular e estimula células do sistema imune. Em seguida, têm-se a fase subaguda, com uma redução da concentração de ATP extracelular e aumento da concentração de adenosina. A ativação dos receptores A2a e A2b pela adenosina servem para controlar a intensidade da resposta inflamatória. Por fim, ocorre a terceira fase, denominada de fase crônica, caracterizada por uma baixa relação ATP/ADO e pelo desenvolvimento de processos cicatriciais (CEKIC; LINDEN, 2016; LINDEN; KOCH-NOLTE; DAHL, 2019).

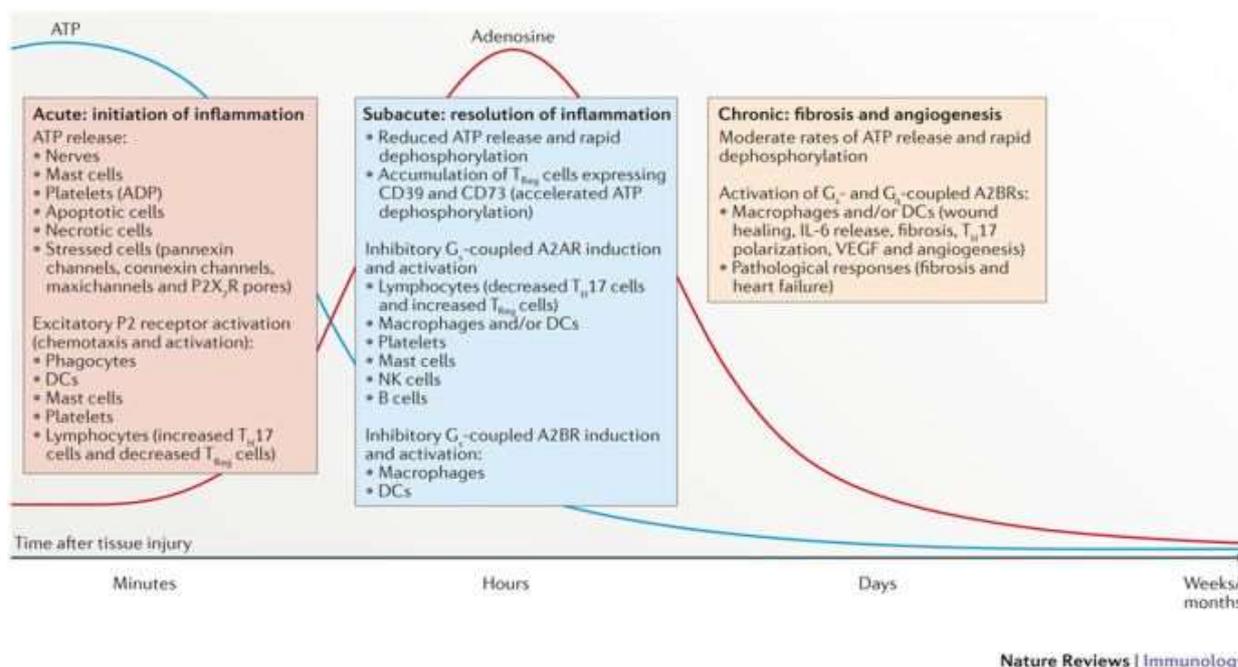


Fig. 6 – Fases da sinalização purinérgica após injúria tecidual. Em resposta à injúria celular ou infecção, ocorre a liberação de ATP no meio extracelular que resulta na ativação de receptores do tipo P2. Esse mecanismo, por sua vez, estimula a quimiotaxia e ativação de células imunes. Esse processo é a fase aguda, onde ocorre o início do processo inflamatório. A segunda fase, denominada subaguda, é caracterizada por uma redução da liberação de ATP e desfosforilação dessa molécula a adenosina, pela ação de ectonucleotidases presentes na membrana celular. Ocorre, portanto, acúmulo de adenosina, que atua nos receptores do tipo P1. Esses eventos limitam a extensão e a duração da resposta pró-inflamatória. A fase crônica está associada com redução da razão ATP/ADO e uma persistente ativação do receptor de adenosina nos macrófagos residentes nos tecidos. Essa persistente ativação dos receptores de adenosina A2B produz inflamação de baixo grau persistente, fibrose e angiogênese. (CEKIC; LINDEN, 2016)

A estimulação dos receptores do tipo P2 pelo ATP resulta em ativação e quimiotaxia de células do sistema imune, como fagócitos, células dendríticas, mastócitos e linfócitos (CEKIC; LINDEN, 2016). A ativação autócrina dos receptores P2 têm importantes funções na amplificação de sinais do TCR e na comunicação entre células T e apresentadoras de antígenos (APC). Além disso, o ATP extracelular modula a resposta imune estimulando a maturação de células dendríticas imaturas e a secreção de citocinas inflamatórias por monócitos, macrófagos e células dendríticas. O ATP também pode estimular um aumento na degranulação de eosinófilos, bem como na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e adesão ao endotélio. O ATP extracelular é, também, um importante sinal na ativação do inflamassoma desencadeando a síntese e liberação de IL-1 β (SALLES, 2011).

Em contrapartida, o acúmulo de adenosina resulta em respostas antagônicas às desencadeadas pelo ATP extracelular. A ativação dos receptores P1 em monócitos e neutrófilos suprime a produção de IL-12, prevenindo assim a inflamação induzida pela injúria tecidual. A adenosina também modula a secreção de outras citocinas, reduzindo a produção de citocinas

pró-inflamatórias, como TNF, e estimulando a produção das citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (HAMIDZADEH; MOSSER, 2016). A adenosina inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e aumenta a IL-10 em resposta ao LPS. Essa molécula também atua sobre as células dendríticas inibindo sua maturação e produção de citocinas necessárias na diferenciação de células Th1 além de aumentar a produção de citocinas que contribuem para a polarização em Th17 (CEKIC; LINDEN, 2016; CRONSTEIN, 1994). Dado os efeitos imunomoduladores da adenosina é possível afirmar também que a ADA apresenta uma importante função no sistema imune, uma vez que essa enzima é capaz de controlar os níveis de ADO no meio extracelular (FRANCO et al., 1997).

Em síntese, pode-se afirmar que o ATP extracelular liberado de células injuriadas estimulam a quimiotaxia, a maturação de células do sistema imune e a produção de citocinas pró-inflamatórias, que resultam na ativação de fagócitos e no estabelecimento de uma resposta inflamatória. Adenosina, por sua vez, exerce um efeito contrário, inibindo a ativação de fagócitos e reduzindo o estado inflamatório pela estimulação da produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, por células do sistema imune.

2.5. *Leishmania* e leishmaniose

Leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias, transmitidas por flebotomíneos, causadas por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (OMS). Esse complexo de doenças é caracterizado pela sua diversidade e complexidade. Apresenta uma distribuição mundial, presente em todos os continentes, sendo endêmica em regiões tropicais e subtropicais (HERWALDT, 1999; STEBUT, 2014).

Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam ciclo de vida heteroxeno, necessitando, desta forma, de um hospedeiro invertebrado e um vertebrado. A transmissão ocorre a partir da injeção de promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva do flebotomíneo infectado durante o repasto sanguíneo. No hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas são fagocitadas por células do sistema imune e se diferenciam em amastigotas, forma intracelular obrigatória. As amastigotas são adaptadas para sobreviver no fagolisossomo dessas células. Essas formas se multiplicam e são fagocitadas por outras células. O ciclo se inicia, no hospedeiro invertebrado, quando esse alimenta-se de sangue com macrófagos infectados com amastigotas (Fig. 7). Após a ingestão, no intestino médio do flebotomíneos, as amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas. Essas, por sua vez, diferenciam em formas nectomonadas, que migram para regiões anteriores do intestino onde dão origem às formas

leptomonadas. Essas se replicam e diferenciam em formas metacíclicas. A forma infectante ao hospedeiro vertebrado pode responder a estímulos ambientais, se diferenciando em formas retroleptomonadas, após repastos adicionais de sangue não infectado. As retroleptomonadas se multiplicam no flebotomíneos amplificando o número de formas metacíclicas. Isso contribui para o aumento do número de formas infecciosas e conseqüentemente para a transmissão da doença (NEVES et al., 2005; SERAFIM et al., 2018).

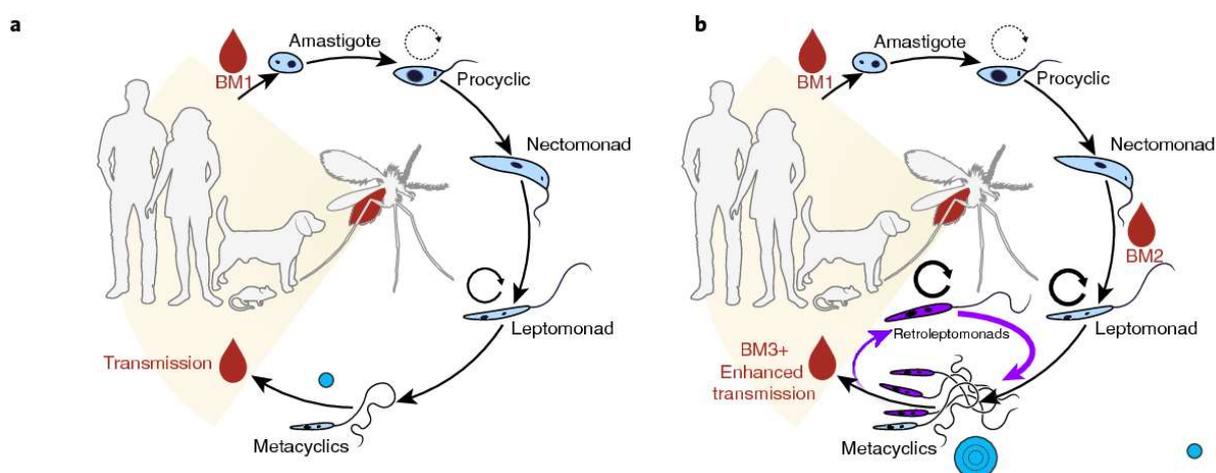


Fig. 7 – Estágio do ciclo de vida do parasito no hospedeiro invertebrado. A figura (a) apresenta o desenvolvimento de parasitos do gênero *Leishmania* no intestino dos flebotomíneos. A figura (b) mostra a diferenciação do parasito em formas retroleptomonadas replicativas após repastos adicionais de sangue não infectado (SERAFIM et al., 2018).

A manifestação clínica da doença é variável e dependente da espécie do parasito. Além disso, o estado imunológico do hospedeiro também é um fator importante na determinação do curso da doença (NEVES et al., 2005).

Esse complexo de doenças pode ser organizado em grupos, com base nas características das manifestações clínicas, em leishmaniose cutânea difusa ou localizada, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose visceral. Uma outra forma de classificação reúne as três primeiras formas em um único grupo, a leishmaniose tegumentar, mantendo a leishmaniose visceral em outro grupo (PEREIRA, 2010).

A forma da doença causada pela espécie *L. major* é a leishmaniose tegumentar, que ocorre comumente no Velho Mundo. A doença causada por essa espécie de parasito é caracterizada pela formação de úlceras indolores, quando as lesões não se agravam, e úmidas.

Apesar de ser uma espécie do Velho Mundo, no Brasil, alguns casos de leishmaniose cutânea americana foram associados a uma espécie fenotipicamente similar a *L. major* (MOMEN et al., 1985; NEVES et al., 2005; PEREIRA, 2010; STEBUT, 2014).

2.6. *Leishmania* e sistema imune

Durante o repasto sanguíneo de flebotomíneos infectados, macrófagos e neutrófilos migram para o sítio de infecção e fagocitam os parasitos que são injetados no hospedeiro. O macrófago é uma das principais células de defesa do organismo. Entretanto, *Leishmania* é capaz de sobreviver aos efeitos microbicidas e multiplicar no interior dessas células. Macrófagos são capazes de estimular a produção de IFN- γ por outras células do sistema imune. Essa citocina atua nos macrófagos estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, que são tóxicos ao parasito (LIESE; SCHLEICHER; BOGDAN, 2008; PETERS et al., 2008).

Células dendríticas também estão envolvidas na resposta imune contra a *Leishmania*. Essas células produzem IL-12 em resposta à infecção por algumas espécies do parasito. A produção dessa citocina é fundamental no estabelecimento de uma resposta Th1, protetora ao hospedeiro (PEREIRA, 2010; TASLIMI; ZAHEDIFARD; RAFATI, 2018). A estimulação diferencial dos subtipos de linfócitos T CD4⁺ parece ser de importância primordial na determinação da progressão da doença. Os subtipos de células T CD4⁺ são definidos pelas citocinas produzidas logo após a estimulação. As células do tipo Th1 tem perfil mais pró-inflamatório, produzindo IL-2, IL-12, TNF e IFN- γ , enquanto as células do tipo Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-10. Essas citocinas produzidas pelo sistema imune em resposta à infecção por *Leishmania* determinam a evolução do quadro clínico (MASPI; ABDOLI; GHAFFARIFAR, 2016; NEVES et al., 2005; NYLÉN; GAUTAM, 2010; SCOTT; NOVAIS, 2016). As citocinas IL-12 e IFN- γ são duas moléculas centrais para muitas abordagens de imunoterapia para leishmaniose (TASLIMI; ZAHEDIFARD; RAFATI, 2018). A citocina IL-12 tem sua importância na diferenciação de células T para Th1 e na estimulação da produção de IFN- γ por células NK e linfócitos T.

Em paralelo ao tipo de resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro para combater a infecção, a sobrevivência do parasito é dependente de estratégias de evasão do sistema imune (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998). A via de sinalização purinérgica é uma das vias utilizadas por parasitos do gênero *Leishmania* para evadir da resposta imune e garantir sua permanência no hospedeiro (FIGUEIREDO; SOUZA-TESTASICCA; AFONSO, 2016).

2.7. *Leishmania* e sinalização purinérgica

É sabido que parasitos do gênero *Leishmania* são incapazes de sintetizar nucleotídeos de purina pela via “*de novo*”, sendo necessária outras formas de obtenção desses nutrientes. A alternativa é através da via de salvação de purinas do hospedeiro para satisfazer suas necessidades. Foi demonstrado que *L. amazonensis* apresenta atividade da ENTPDase e ecto-5'-nucleotidase. Essas enzimas atuam na conversão de ATP à adenosina, que por sua vez, é internalizada pelo parasito (MARQUES-DA-SILVA et al., 2008).

A ADA também é uma importante enzima envolvida no metabolismo do ATP extracelular. Contudo, ainda são escassos os estudos que investigam o papel da ADA no contexto da infecção por *Leishmania*. Dados recentes do nosso laboratório demonstraram pela primeira vez a atividade da adenosina desaminase em *L. amazonensis*, *L. major* e *L. braziliensis*. Foi verificado também que macrófagos de linhagem infectados por promastigotas metacíclicas tem uma tendência a aumentar a atividade da ADA.

A presença das ectonucleotidases exerce importante papel no estabelecimento da infecção por *Leishmania*. Além de contribuir para a sobrevivência do parasito, as ectonucleotidases interferem no estabelecimento de uma resposta imune eficaz contra a *Leishmania* através de mecanismos supracitados. O aumento da atividade das ectonucleotidases expressas no parasito tem uma correlação com sua potencial infectividade. Foi observado que parasitos com alta atividade ectonucleotidásica possuem maior capacidade de infectar macrófagos peritoneais obtidos de camundongo (DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA et al., 2008; DE SOUZA et al., 2010).

A atividade de ectonucleotidases em *L. amazonensis*, portanto, tem um papel fundamental na modulação da resposta imune dos macrófagos. Alguns autores sugerem que o nível de atividade da E-NTPDase pode propiciar a sobrevivência do parasito por meio da inibição na produção de óxido nítrico por células J774A.1 ativadas. Eles mostraram que ao inibir a atividade da E-NTPDase com um inibidor específico a produção de NO não é reduzida, o que contribui para a eliminação do parasito. Além disso, verificaram também que a atividade ectonucleotidásica de *L. amazonensis* contribui para a redução da produção de citocinas inflamatórias, como IL-12 e TNF, pelas células estimuladas (GOMES et al., 2015).

As ectonucleotidases expressas na membrana do parasito apresentam um elevado potencial na virulência de *Leishmania*, uma vez que contribuem para a formação e acúmulo de

adenosina no meio extracelular, que atua na modulação da resposta imune contra o parasito. Tem sido mostrado uma forte relação entre a atividade da ectonucleotidase e a virulência do parasito. Foi demonstrado, também, que a presença de 3'-ectonucleotidase favorece o controle da resposta imune inata via degradação das armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). Tudo isso evidencia o papel das ectonucleotidasas enquanto importante fator de virulência dos parasitos do gênero *Leishmania* (FIGUEIREDO; SOUZA-TESTASICCA; AFONSO, 2016).

3. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são um complexo de doenças infecto-parasitárias negligenciadas, que além de causar manifestações clínicas diversas podem levar o indivíduo ao óbito, se não tratada. O estabelecimento de uma resposta imune eficaz contra o parasito é uma estratégia desejável para evitar a manutenção e progressão da doença. Sabe-se que esses parasitos possuem mecanismos que os possibilitam evadir do sistema imune, garantindo sua sobrevivência no hospedeiro. Um desses mecanismos é o controle de nucleotídeos e nucleosídeos no meio extracelular, através da ação de ectonucleotidasas. A adenosina é uma molécula com grande potencial imunossupressor, o que favorece a permanência da infecção. A utilização de moléculas antagonistas da adenosina pode levar a uma resposta inflamatória mais efetiva, resultando na eliminação do parasito. A cafeína, amplamente consumida pela sociedade, é um antagonista não específico da adenosina, capaz de ligar aos seus receptores, impedindo sua ação sobre o sistema imune. Sabe-se que a cafeína tem um potencial imunomodulador sobre células imunes e sobre a secreção de citocinas. Contudo, não se tem claro sua ação em modelos de infecção, uma vez que apenas um estudo avaliou o papel da cafeína na infecção *in vivo* por *Leishmania*. Deste modo, nosso estudo é o primeiro a avaliar a relação entre cafeína, sistema imune e sinalização purinérgica no contexto da infecção *in vitro* por *L. major*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da administração de cafeína em parâmetros imunológicos e enzimáticos na infecção *in vitro* de macrófagos J774A.1 por *L. major*.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar a viabilidade de *L. major* e células J774A.1 expostas a diferentes concentrações de cafeína.
- Avaliar o efeito da administração de cafeína sobre a atividade da ADA em células J774A.1.
- Determinar o efeito da cafeína sobre a infecção em macrófagos da linhagem J774A.1 por *L. major*.
- Avaliar a produção de NO e citocinas por macrófagos da linhagem J774A.1 infectados por *L. major* e tratados com cafeína.

5. METODOLOGIA

5.1. Crescimento de *L. major* em meio enriquecido com cafeína

As formas promastigotas, após o descongelamento, foram cultivadas em garrafas de cultura com meio Grace enriquecido com soro fetal bovino (10%), L-glutamina 2mM e penicilina G 100U/mL, com pH igual a 6,5. A cultura foi iniciada com 1×10^5 parasitos/mL e incubada a 25°C. Foram realizados repiques dos parasitos a cada três dias, de modo a manter a cultura e o número adequado de parasitos.

Formas promastigotas de *L. major* (MHOM/IL/1980/FRIEDLIN) foram cultivadas em garrafas de cultura contendo meio Grace completo adicionado de cafeína nas concentrações de 10µM e 1000µM. A cultura foi iniciada com 1×10^5 parasitos/mL e incubada a 25°C, durante 8 dias.

A viabilidade do parasito exposto à cafeína foi avaliada por meio da curva de crescimento. Durante sete dias consecutivos, sempre no mesmo horário, foram retiradas alíquotas para a contagem do número de parasitos em câmara de Neubauer. Posteriormente, foi confeccionado o gráfico de crescimento e a concentração de parasitos no meio foi expressa em escala logarítmica.

5.2. Viabilidade de células J774A.1 tratadas com cafeína

Foram realizados cultivos de macrófagos da linhagem J774A.1 para posterior ensaio de citotoxicidade. As células foram descongeladas e cultivadas em garrafa contendo meio de cultura próprio para J774A.1, composto por DMEM enriquecido com soro fetal bovino (10%), penicilina G 100U/mL, L-glutamina 2mM, aminoácidos não essenciais 1%, piruvato de sódio 1mM, HEPES 1M e NaHCO₃ 7,5%, pH ajustado para 7,2.

A cultura foi iniciada com 1×10^4 células/mL. O valor foi quantificado, pela contagem na câmara de Neubauer com o auxílio do corante azul de Trypan. Os macrófagos foram incubados em estufa à 37°C e 5% de CO₂. Após o período de recuperação (aproximadamente 5 dias) foram realizados repiques para a manutenção da cultura de células.

Para a determinação da citotoxicidade da cafeína foi realizado o ensaio de redução de tetrazólio (MTT). A suspensão de células foi ajustada para um valor de 1×10^4 macrófagos por poço e distribuída em placa de cultivo de 96 poços. As placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante uma hora, para adesão dos macrófagos aos poços. Após esse período, os poços foram esgotados, retirando o meio e, conseqüentemente, as células não aderidas.

O ensaio de viabilidade foi realizado na ausência (grupo controle) e na presença de cafeína diluída em meio para J774A.1, em diferentes concentrações, sendo as concentrações de 10 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 750 μ M e 100 μ M. As placas foram incubadas a 37°C, com 5% de CO₂, expostas ao tratamento durante 24, 48 ou 72 horas.

Após os diferentes períodos de incubação, foram adicionados aos poços solução de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)]- 2,5-difeniltetrazólio) em PBS, a 2,5 mg/mL. As placas foram incubadas novamente, por um período de 4 horas a 37°C, com 5% de CO₂. As placas incubadas foram, posteriormente, tratadas com solução de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% em HCl 0,01M, para solubilização dos cristais de formazan formados a partir da redução do MTT pelas células viáveis. As placas foram novamente incubadas *overnight*.

Posteriormente, as placas foram submetidas à leitura fotométrica, realizada em leitor de microplaca, na qual a densidade ótica foi lida com comprimento de onda de 570nm. Os dados dos valores de densidade ótica obtido foram transcritos para o *software SoftMax*® para subtração do branco.

5.3. Atividade da adenosina desaminase de células J44A.1 tratadas com cafeína

A atividade da enzima adenosina desaminase foi medida em células J774A.1 a partir de adaptação do método Giusti e Galanti (1974). A atividade da ADA em J774A.1 foi determinada pela quantificação de NH₃ liberada a partir da reação de Berthelot (Weisman et al.,1988).

Células J774A.1 foram plaqueadas em placas de 12 poços de baixa aderência na concentração de 5 x 10⁵células por poço. Após um período necessário para que as células aderissem fracamente aos poços, os macrófagos de linhagem foram tratados com meio para J774A.1 enriquecido com cafeína nas concentrações de 10 μ M, 50 μ M e 100 μ M. Além disso, foi acrescentado aos poços LPS 100pg/mL e IFN- γ 10U/mL. As células foram incubadas a 37°C / 5% CO₂ por 24 horas.

Decorrido as 24 horas, as células foram ressuspensas, retiradas da placa e centrifugadas. Em seguida foi realizado o ajuste de concentração para 5x10⁵células/mL. Posteriormente foi realizado o ensaio para avaliar a atividade enzimática da adenosina desaminase. As amostras foram incubadas a 37°C durante 1 hora após a adição de adenosina 21mmol/L. A reação foi interrompida por meio da adição de 0.16mmol/L da solução de nitroprussiato de sódio/mL.

Controles com a adição da preparação enzimática após mistura com o reagente nitroprussiato de sódio foram usadas para corrigir a hidrólise espontânea dos substratos.

As amostras foram acrescidas do reagente hipoclorito de sódio 125/11mmol/L em NaOH 0,6M. Em seguida foram incubadas a 37°C por 30 minutos e a leitura do ensaio colorimétrico foi feita a 620nm. As absorbâncias das amostras foram analisadas utilizando-se o *software SoftMax Pro 7*[®].

5.4. Infecção experimental de células J774A.1 por *L. major*

Para a realização da infecção das células J774A.1 com parasitos da espécie *L. major* foi necessário fazer o enriquecimento de formas metacíclicas. As formas promastigotas metacíclicas foram obtidas através de uma adaptação do protocolo descrito por SPÄTH & BEVERLEY (2001).

Após 5 dias de cultura, período correspondente à fase estacionária de crescimento, uma alíquota da cultura foi coletada para a realização da contagem do número de parasitos, na câmara de Neubauer. Posteriormente, foi realizado a lavagem com salina tamponada com fosfato (PBS), por meio da centrifugação a 1540g / 4 °C / 10min. O procedimento de lavagem foi realizado 2 vezes. Após a lavagem, os parasitos foram ressuspensos em DMEM, pH 7,2., e distribuídos em alíquotas de 2mL. Sob a suspensão foi adicionado 2 mL de Ficoll 10% (50% de Ficoll 20% + 10% de Salina 10X + 40% de água milli-Q). O gradiente formado foi centrifugado a 1070g / 25°C / 15min, com aceleração lenta e o freio da centrífuga desligado. Esse processo permite separar as formas metacíclicas, no sobrenadante, das formas procíclicas, que ficam no *pellet* formado. O sobrenadante foi coletado e as formas metacíclicas submetidas à lavagem com PBS, para remoção do Ficoll 10%. O sobrenadante gerado a partir da lavagem foi descartado e os parasitos foram ressuspensos em PBS. Novamente, foi realizado a contagem na câmara de Neubauer, para o cálculo de rendimento de metacíclicas.

Macrófagos de linhagem J774A.1 foram plaqueados, na concentração de $2,0 \times 10^5$ células/mL, em placa sobre lamínula de vidro. As células foram incubadas, por 60 minutos, a 37°C/5% CO₂ para que as células ficassem aderidas às lamínulas. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e os poços foram lavados com PBS para remoção das células não aderidas. Para infecção foram utilizadas as formas promastigotas metacíclicas de *L. major* enriquecidas. Os parasitos foram adicionados na proporção de três metacíclicas por macrófago, em 1mL de meio. A placa foi incubada por 3 horas a 33°C / 5% CO₂. Logo em seguida, o sobrenadante foi coletado e os poços foram lavados com PBS para remoção dos parasitos que não infectaram as células J774A.1. Aos poços foram adicionados 1mL de meio de cultura para célula. Os

macrófagos de linhagem foram estimulados com LPS 100pg/mL e IFN- γ 10U/mL e incubadas por 72 horas a 37°C / 5% CO₂.

Foram realizados diferentes procedimentos de tratamentos com cafeína durante a infecção. Células J774A.1 foram tratadas com meio enriquecido com cafeína 10 μ M, nos respectivos tempos: 30 minutos antes da infecção; 30 minutos antes da estimulação com LPS e IFN- γ ; e no momento da estimulação com LPS e IFN- γ . Após as 72 horas, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C, para posterior dosagem de citocinas. As citocinas (TNF e IL-10) foram dosadas pelo método de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).

A determinação da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos de linhagem tratados com cafeína e estimulados com LPS + IFN- γ foi realizada pela dosagem baseada na reação de *Griess*. Células J774A.1 foram incubadas em placa de 12 poços na concentração de 2 x 10⁵ células/poço, à 37°C e 5% de CO₂. Células da linhagem J774A.1 foram incubadas em meio contendo 10 μ M cafeína e estímulo (LPS + IFN- γ), durante 24 horas.

Após o tempo de tratamento, o sobrenadante foi coletado dos poços e transferidos para outra placa. Procedeu-se com o ensaio de *Griess*, que consiste na detecção de nitrito (NO₂⁻), resultante da oxidação do NO presente no sobrenadante da cultura. Em uma placa de ELISA de 96 poços foi adicionado 50 μ L do sobrenadante de cultura em duplicata. Posteriormente foi adicionado aos poços o reagente de Griess, preparado a partir das soluções de sulfanilamida 1% diluída em H₃PO₄ 2,5% e de Dicloreto de N(1-naftil) etilenadamina 0,1% diluído em H₃PO₄ 2,5%. A curva padrão foi preparada com oito pontos, correspondente à leitura de oito poços. O padrão (solução de nitrito de sódio) foi adicionado ao primeiro poço (50 μ L) e procedeu-se com a diluição seriada. Após a incubação durante 10 minutos, a 25°C e ao abrigo da luz, foi realizada a leitura no espectrofotômetro a 540nm. As absorbâncias das amostras foram analisadas utilizando-se o software *SoftMax Pro 7*[®].

As células foram fixadas nas lamínulas com metanol e coradas pela técnica de Panótico Rápido para avaliação da taxa de infecção. Realizou-se a contagem de 200 células, avaliando-se a quantidade de células infectadas. Os resultados foram expressos em percentual de células infectadas.

5.5. Análise estatística dos dados

As análises estatísticas dos dados obtidos nos experimentos foram realizadas com o *software* GraphPad Prism 5.0. Comparações entre os diferentes grupos testados foram avaliadas por análise de variância ANOVA One-Way com pós-teste Bonferroni ou Dunnett. Os grupos

testados em diferentes tempos foram avaliados por ANOVA Two-Way, com pós-teste de Bonferroni. Foram consideradas diferenças significativas para $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Cafeína altera o perfil de crescimento de *L. major*

Avaliamos o efeito do tratamento com cafeína sobre o perfil de crescimento de *L. major*, nas concentrações de 10 μ M e 1000 μ M. Parasitos da espécie *L. major* foram cultivados, na concentração de 1 x 10⁵ parasitos/mL, em meio de cultura enriquecido ou não com cafeína nas concentrações de 10 μ M ou 1000 μ M. A contagem do número de parasitos (Fig. 8) foi realizada durante 7 dias, em intervalo de 24 horas.

A curva de crescimento foi realizada com objetivo de determinar a concentração de cafeína a ser utilizada em outros experimentos.

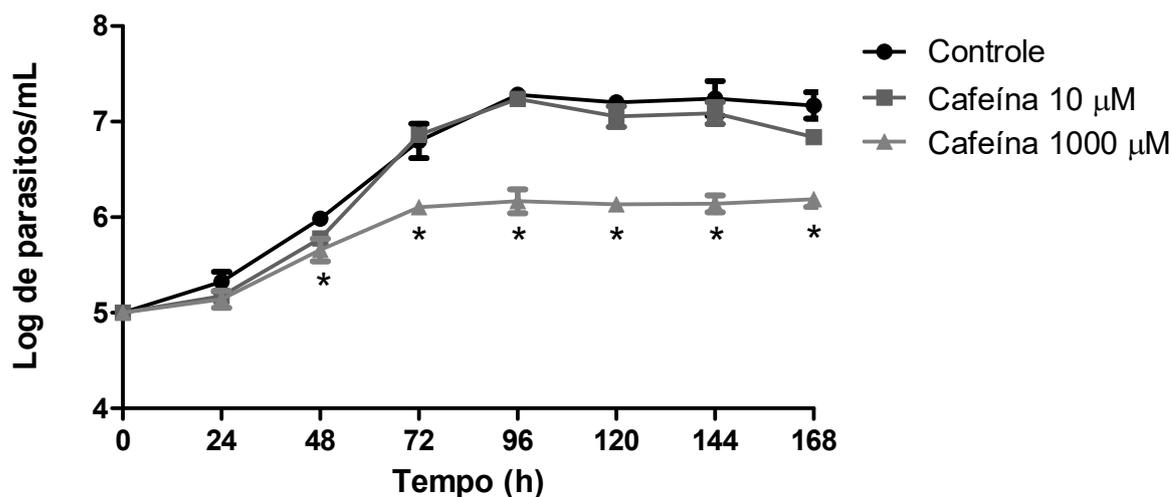


Fig. 8 – Papel do tratamento com cafeína no perfil de crescimento de *L. major*. Foram incubados 1 x 10⁵ parasitos/mL na ausência ou presença de 10 μ M ou 1000 μ M de cafeína. A contagem do número de parasitos em cultura foi realizada a cada 24 horas durante 7 dias. Os asteriscos representam a diferença estatística entre o grupo indicado (Cafeína 1000 μ M) e o grupo controle. O gráfico representa a média e o desvio-padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata.

Conforme observado acima, a cafeína é capaz de reduzir a taxa de crescimento do parasito, na concentração de 1000 μ M, após 48 horas de tratamento. A concentração de 10 μ M de cafeína no meio não alterou o perfil de crescimento de *L. major*.

6.2. Cafeína é capaz de reduzir o crescimento de células J774A.1

Células J774A.1 foram cultivadas por 24, 48 e 72 horas em meio enriquecido com cafeína conforme descrito na metodologia. As células foram expostas à diferentes concentrações de cafeína (10 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 750 μ M e 1000 μ M). Após o período de incubação, procedeu-se com o ensaio de MTT para verificação da viabilidade (Fig. 9).

Iniciamos o teste de viabilidade celular com o objetivo de determinar a dose de cafeína que seria posteriormente utilizada em outros experimentos.

Avaliamos o efeito das diferentes concentrações de cafeína sobre o perfil de crescimento das células J774A.1 ao longo do tempo (Fig. 9). Essa análise temporal foi realizada com o objetivo de determinar se ao longo do tempo as altas concentrações de cafeína são capazes de reduzir a viabilidade celular de macrófagos da linhagem J774A.1.

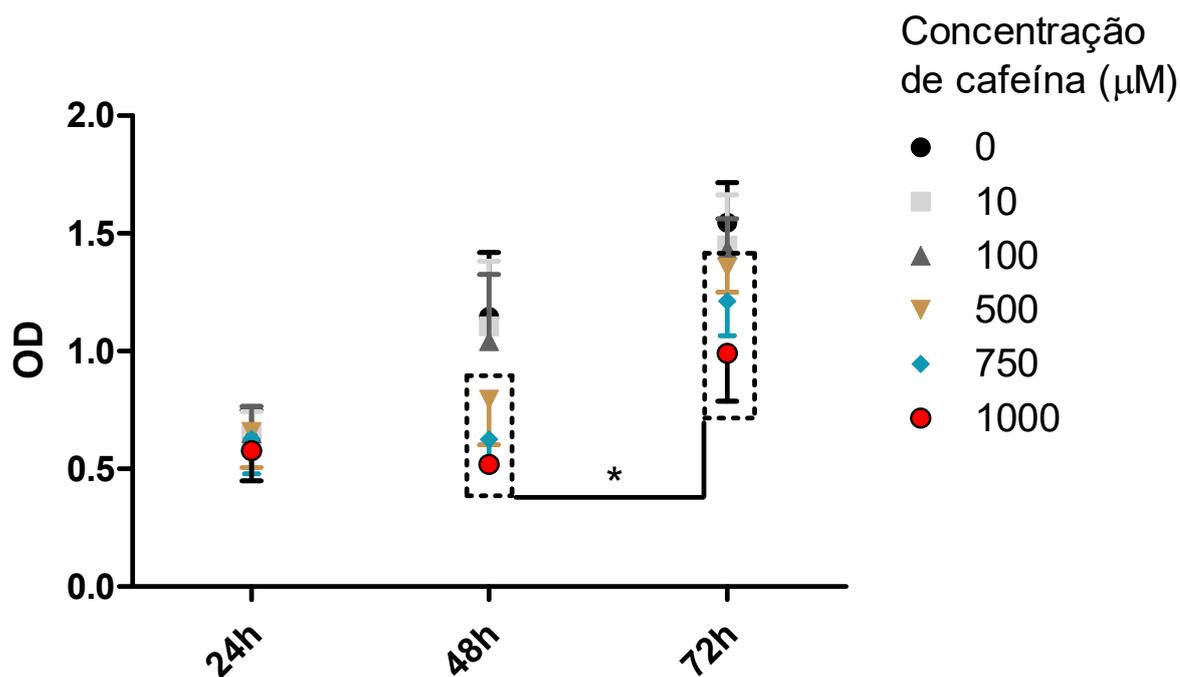


Fig. 9 – Crescimento de células J774A.1 tratadas com cafeína ao longo do tempo. Macrófagos de linhagem foram plaqueados na concentração de 1×10^4 células/poço, expostos à diferentes concentrações de cafeína e incubados durante 24, 48 e 72h a 37°C / 5% CO₂. Após o período de incubação foi determinada a viabilidade celular pelo ensaio de MTT. O asterisco representa a diferença estatística para as concentrações marcadas entre os grupos indicados (24h e 72h). O gráfico representa a média e desvio-padrão de três experimentos independentes, realizados em quadruplicata. Para melhor apresentação gráfica dos dados, optamos por representar os desvios padrões em apenas uma direção para cada ponto.

A cafeína não altera a viabilidade de células J774A.1 quando administrada nas concentrações de 10 μ M e 100 μ M, uma vez que o crescimento ao longo do tempo acompanhou o grupo controle. Quando tratadas com concentrações a partir de 500 μ M, é possível notar que a viabilidade das células também não é comprometida, uma vez que há crescimento celular ao longo do tempo. Entretanto, as concentrações de 500 μ M, 750 μ M e 1000 μ M impedem o crescimento celular quando expostas à cafeína, durante 48h. Esse efeito é revertido em um tempo de 72 horas, no qual as células recuperam sua capacidade de crescimento.

6.3. Cafeína não altera a atividade da enzima adenosina desaminase

A adenosina desaminase é uma importante enzima envolvida na via de sinalização purinérgica, pois atua controlando os níveis de adenosina por meio da sua desaminação hidrolítica até formação da inosina. Visto que a adenosina apresenta efeitos anti-inflamatórios sobre células do sistema imune, decidimos verificar se a cafeína teria influência na atividade da ADA.

Para tanto, células J774A.1 foram expostas a diferentes concentrações de cafeína e estimuladas com LPS e IFN- γ , durante 24 horas a 37°C / 5% CO₂. Após as 24 horas de incubação, foi determinada a atividade da adenosina desaminase, como descrito, pela quantificação de NH₃ liberada.

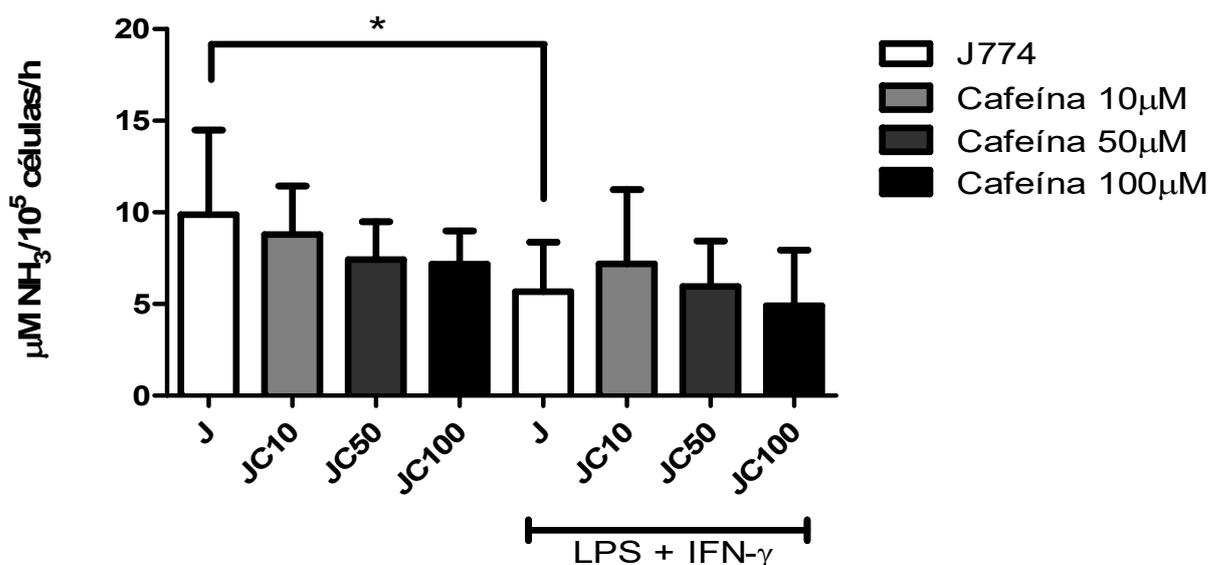


Fig. 10 – Atividade da adenosina desaminase de células J774A.1 tratadas com cafeína e estimuladas com LPS e IFN- γ . Macrófagos de linhagem foram plaqueados na concentração de 1×10^5 células/poço, expostos à diferentes concentrações de cafeína, tratados com LPS e IFN- γ e incubados durante 24h a 37°C / 5% CO₂. Após o período de incubação foi determinada a atividade da adenosina desaminase a partir da produção de NH₃. O asterisco representa a diferença estatística entre os grupos indicados. O gráfico representa a média e desvio-padrão de pelo menos três experimentos independentes, realizados em duplicata.

A cafeína, em todas as concentrações testadas, foi incapaz de modificar a atividade da adenosina desaminase em um período de 24 horas. O estímulo com LPS e IFN- γ na ausência de cafeína, por sua vez, reduziu a atividade da enzima.

6.4. O tratamento com cafeína antes da infecção reverte a redução da taxa de infecção mediada pelo LPS e IFN- γ em células J774A.1

Decidimos verificar se o tratamento com 10 μ M de cafeína administrada em diferentes momentos do curso da infecção causada por *L. major* em células J774A.1 altera a taxa de infecção.

Para a avaliação da infecção (Fig. 11) as lamínulas foram fixadas com metanol, coradas com o kit Panótico rápido e analisadas em microscópio óptico.

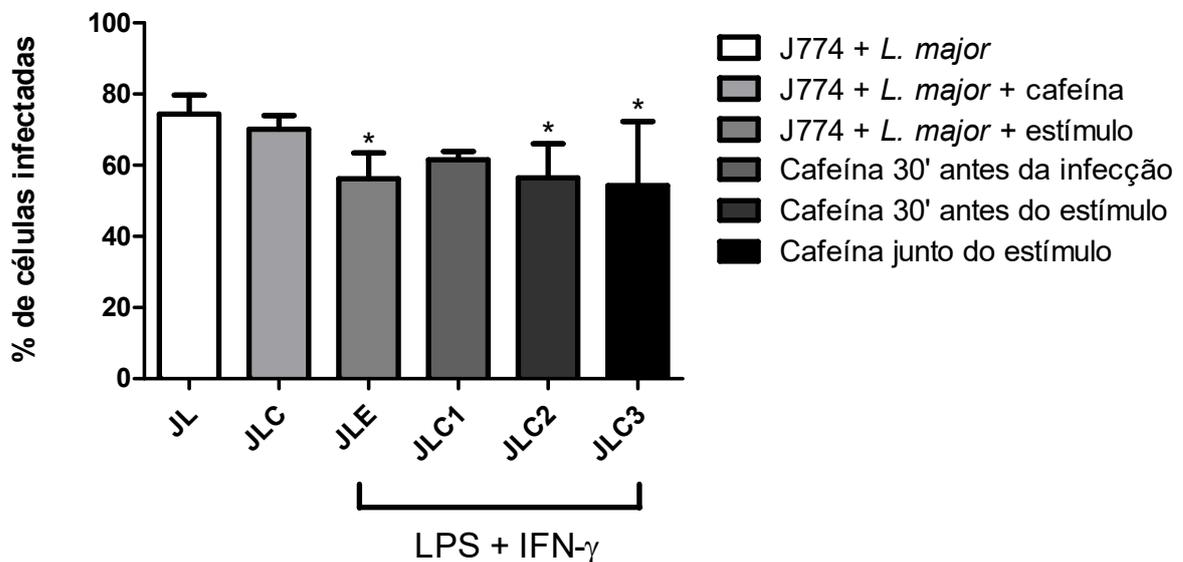


Fig. 11 – Taxa de infecção de *L. major* em células J774A.1 tratadas com cafeína 10 μ M e estimuladas com LPS e IFN- γ Células J774A.1 foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 células/poço, infectadas com *L. major* e tratadas com 10 μ M de cafeína conforme descrito. As células foram incubadas a 33°C / 5% CO₂ durante 3 horas. Após as três horas, as células receberam o estímulo de LPS e IFN- γ . Posteriormente foram incubadas novamente a 37°C / 5% CO₂ durante 72h. As lamínulas foram fixadas com metanol e coradas com o kit de coloração Panótico rápido. A avaliação da infecção foi feita pela contagem de, no mínimo, 200 células. O asterisco representa a diferença estatística entre os grupos indicados e o controle infectado (JL). O gráfico representa a média e desvio-padrão de três experimentos independentes, realizados em duplicata.

A ativação das células J774A.1 pelo LPS e IFN- γ foi capaz de reduzir a taxa de infecção por *L. major*. Esse efeito, contudo, não foi observado nas células tratadas com cafeína antes da infecção. Nesses grupos, a taxa de infecção manteve-se semelhante ao grupo controle não estimulado.

6.5. Tratamento com cafeína antes da infecção com *L. major* reduz a produção de óxido nítrico por células J774A.1

Visto que a cafeína exerce alguns efeitos moduladores em células do sistema imune (SHARIF et al., 2017), decidimos verificar seu efeito sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos de linhagem no contexto da infecção por parasitos da espécie *L. major*.

Células J774A.1 foram tratadas com 10 μ M de cafeína, em diferentes tempos, durante 72 horas, e estimuladas com LPS e IFN- γ , conforme descrito. A dosagem de óxido nítrico foi realizada nos sobrenadantes de cultura pelo método de Griess (Fig. 12).

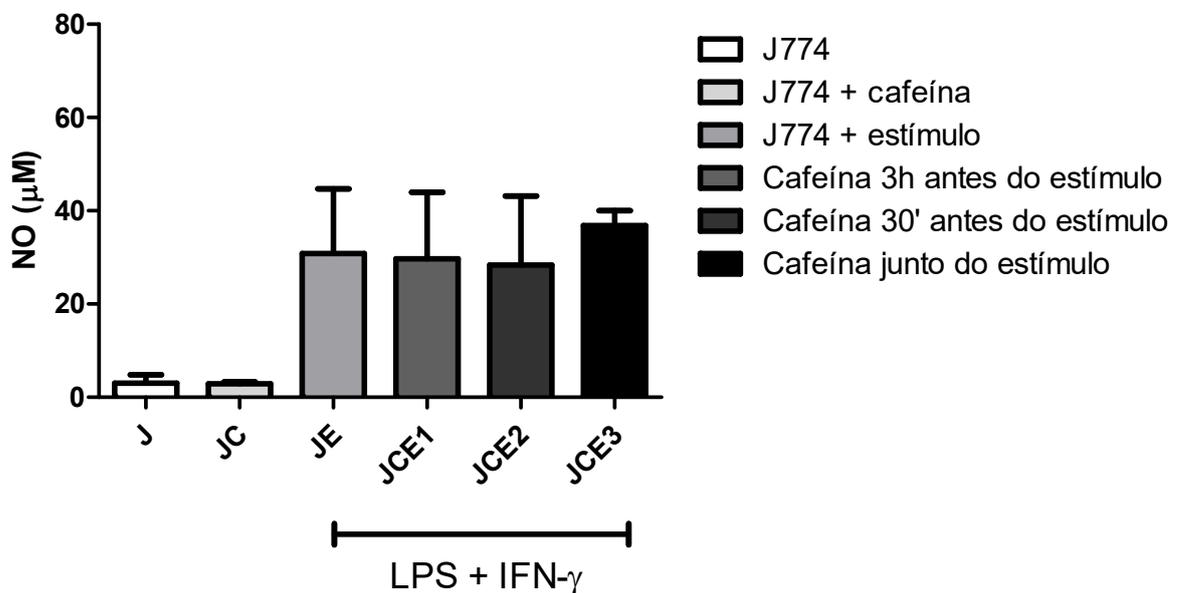


Fig. 12 – Produção de óxido nítrico em células J774A.1 tratadas com cafeína 10 μ M e estimuladas com LPS e IFN- γ . Células J774A.1 foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 células/poço e tratadas com 10 μ M de cafeína conforme descrito. As células foram incubadas a 33°C / 5% CO₂ durante 3 horas. Após as três horas, as células receberam o estímulo de LPS e IFN- γ . Posteriormente foram incubadas novamente a 37°C / 5% CO₂ durante 72h. A dosagem de NO foi realizada pelo método de Griess. O gráfico representa a média e desvio-padrão de três experimentos independentes, realizados em duplicata.

O tratamento com 10 μ M de cafeína não foi capaz de alterar a produção de NO por células J774A.1 estimuladas ou não com LPS e IFN- γ .

Células J774A.1 foram infectadas por *L. major* e tratadas com 10 μ M de cafeína, em diferentes momentos, durante 72 horas, como descrito (Fig. 13).

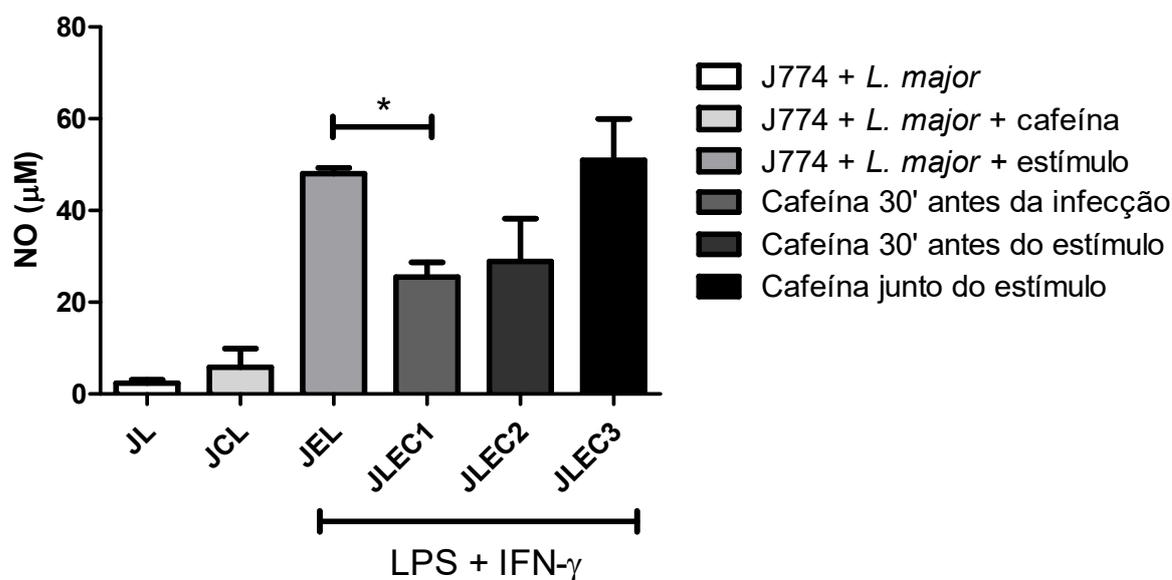


Fig. 13 – Produção de óxido nítrico em células J774A.1 infectadas com *L. major* e tratadas com cafeína 10 μ M. Células J774A.1 foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 células/poço, infectadas com *L. major* e tratadas com 10 μ M de cafeína conforme descrito. As células foram incubadas a 33°C / 5% CO₂ durante 3 horas. Após as três horas, as células receberam o estímulo de LPS e IFN- γ . Posteriormente foram incubadas novamente a 37°C / 5% CO₂ durante 72h. A dosagem de NO foi realizada pelo método de Griess. O asterisco representa a diferença estatística entre os grupos indicados. O gráfico representa a média e desvio-padrão de três experimentos independentes, realizados em duplicata.

Células J774A.1 tratadas com cafeína 10 μ M momentos antes da infecção com *L. major* apresentam menor produção de óxido nítrico. A cafeína administrada nos momentos seguintes à infecção não altera a produção de óxido nítrico pelos macrófagos de linhagem.

6.6. Células J774A.1 infectadas com *L. major* tem maior produção de NO quando tratadas com cafeína após 3 horas de infecção

Conforme descrito, a avaliação da produção de óxido nítrico foi realizada em células infectadas ou não por *L. major*. Comparamos o resultado encontrado anteriormente com os dados de produção de NO para os grupos não infectados, mas tratados com a mesma concentração de cafeína.

Macrófagos de linhagem foram infectados ou não por *L. major*, estimulados com LPS e IFN- γ e tratadas com 10 μ M de cafeína, em diferentes tempos, durante 72 horas. A avaliação da produção de óxido nítrico foi realizada nos sobrenadantes de cultura pelo método de Griess (Fig. 14).

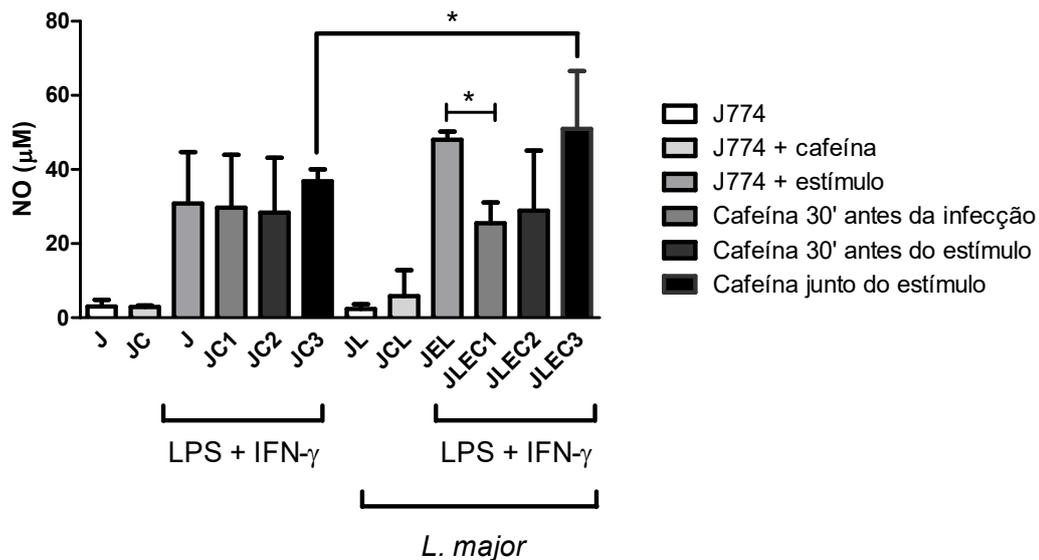


Fig. 14 – Produção de óxido nítrico em células J774A.1 infectadas ou não com *L. major* e tratadas com cafeína 10 μ M. Células J774A.1 foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 células/poço, infectadas ou não com *L. major* e tratadas com 10 μ M de cafeína conforme descrito. As células foram incubadas a 33°C / 5% CO₂ durante 3 horas. Após as três horas, as células receberam o estímulo de LPS e IFN- γ . Posteriormente foram incubadas novamente a 37°C / 5% CO₂ durante 72h. A dosagem de NO foi realizada pelo método de Griess. O asterisco representa a diferença estatística entre os grupos indicados. O gráfico representa a média e desvio-padrão de três experimentos independentes, realizados em duplicata.

O tratamento com cafeína 3 horas após a infecção com *L. major* foi capaz de aumentar a produção de óxido nítrico em relação às células não infectadas.

6.7. Tratamento com cafeína não altera a produção de IL-10 por células J774A.1

Uma vez que a produção de óxido nítrico reduziu após o tratamento com cafeína em células J774A.1 infectadas com *L. major*, decidimos verificar a produção da citocina IL-10 após o mesmo tratamento com cafeína 10 μ M, em células infectadas ou não.

Após 72 horas de tratamento com cafeína em células J774A.1 não infectadas e estimuladas com LPS e IFN- γ , foi avaliada a produção da citocina nos sobrenadantes de cultura pelo método de ELISA (Fig. 15).

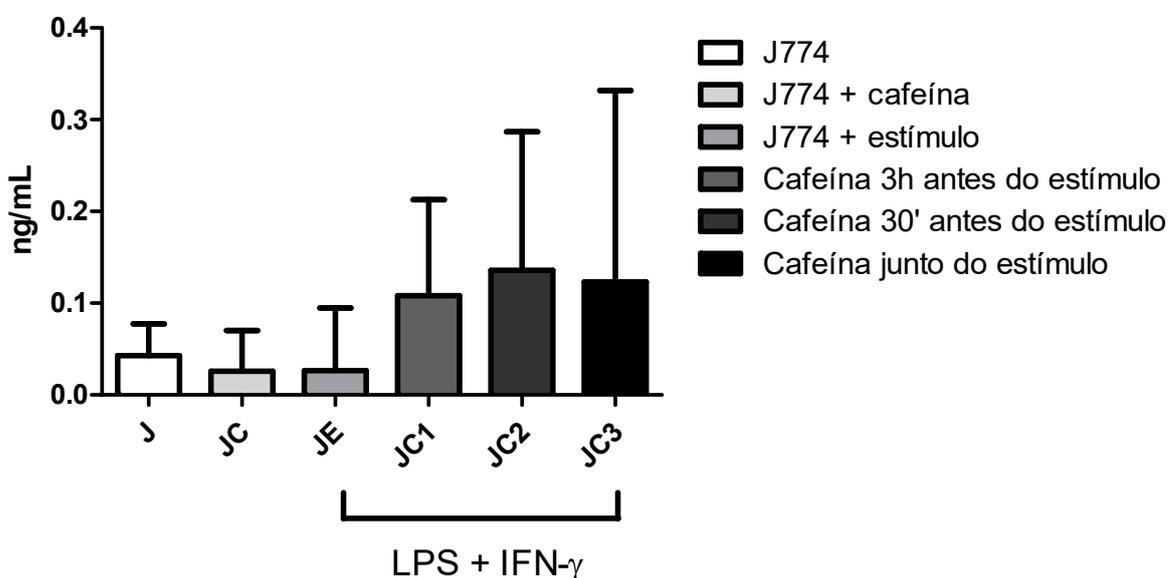


Fig. 15 – Produção de IL-10 em células J774A.1 expostas a 10 μ M de cafeína e estimuladas com LPS e IFN- γ . Células J774A.1 foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 células/poço e tratadas com 10 μ M de cafeína conforme descrito. Os tratamentos com cafeína nas células não infectadas foram realizados concomitante aos grupos que foram infectados (Fig. posterior). As células foram incubadas a 33°C / 5% CO₂ durante 3 horas. Após as três horas, as células receberam o estímulo de LPS e IFN- γ . Posteriormente foram incubadas novamente a 37°C / 5% CO₂ durante 72h. A dosagem de IL-10 foi realizada pelo método de ELISA. O gráfico representa a média e desvio-padrão de três experimentos independentes, realizados em duplicata.

O tratamento com 10 μ M de cafeína não alterou a produção de IL-10 em células J774A.1 estimuladas com LPS e IFN- γ .

Também foi avaliada a produção da citocina IL-10 pelas células J774A.1 infectadas por parasitos *L. major*, tratadas por 72 horas com cafeína 10 μ M administrada em diferentes momentos e estimuladas com LPS e IFN- γ (Fig. 16).

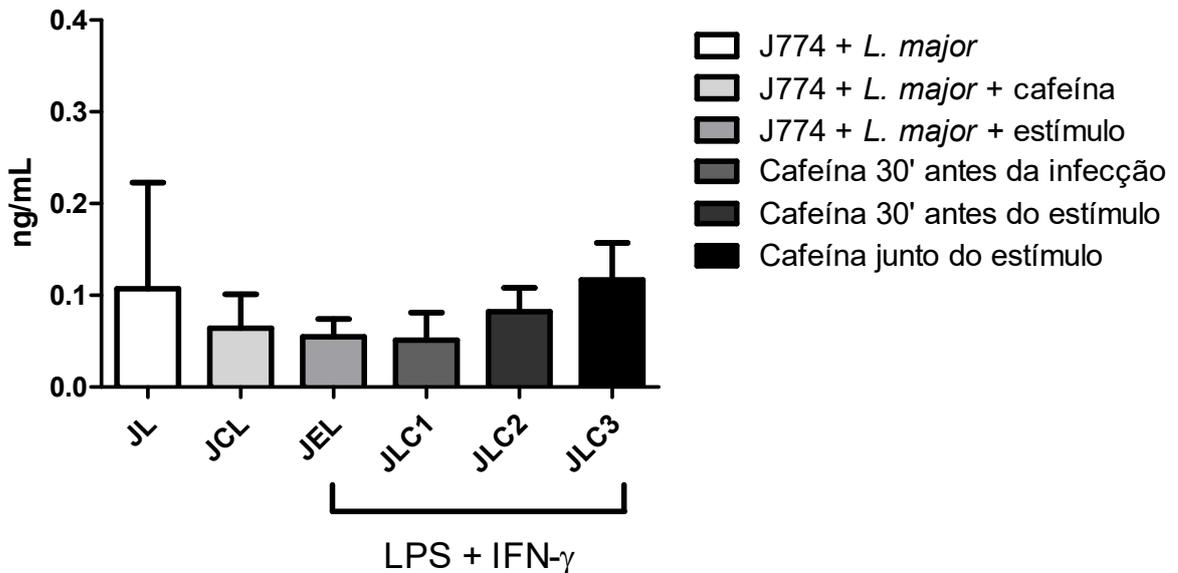


Fig. 16 – Produção de IL-10 em células J774A.1 infectadas com *L. major* expostas a 10 μ M de cafeína e estimuladas com LPS e IFN- γ . Células J774A.1 foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 células/poço, infectadas com *L. major* e tratadas com 10 μ M de cafeína conforme descrito. As células foram incubadas a 33°C / 5% CO₂ durante 3 horas. Após as três horas, as células receberam o estímulo de LPS e IFN- γ . Posteriormente foram incubadas novamente a 37°C / 5% CO₂ durante 72h. A dosagem de IL-10 foi realizada pelo método de ELISA. O gráfico representa a média e desvio-padrão de três experimentos independentes, realizados em duplicata.

O tratamento com 10 μ M de cafeína não foi capaz de alterar a produção de IL-10 em células J774A.1 infectadas com *L. major* e estimuladas com LPS e IFN- γ .

6.8. O tratamento com cafeína não altera a produção de TNF em células J774A.1 infectadas ou não com *L. major*

Visto que a cafeína não alterou a produção da citocina IL-10, decidimos avaliar também a produção de TNF, para verificar se a concentração de cafeína administrada estimulou uma resposta pró-inflamatória.

O tratamento com cafeína foi realizado conforme descrito anteriormente. Após 72 horas, foi avaliada a produção da citocina nos sobrenadantes de cultura pelo método de ELISA, em células J774A.1 infectadas ou não por *L. major* e estimuladas com LPS e IFN- γ (Fig. 17 e Fig. 18).

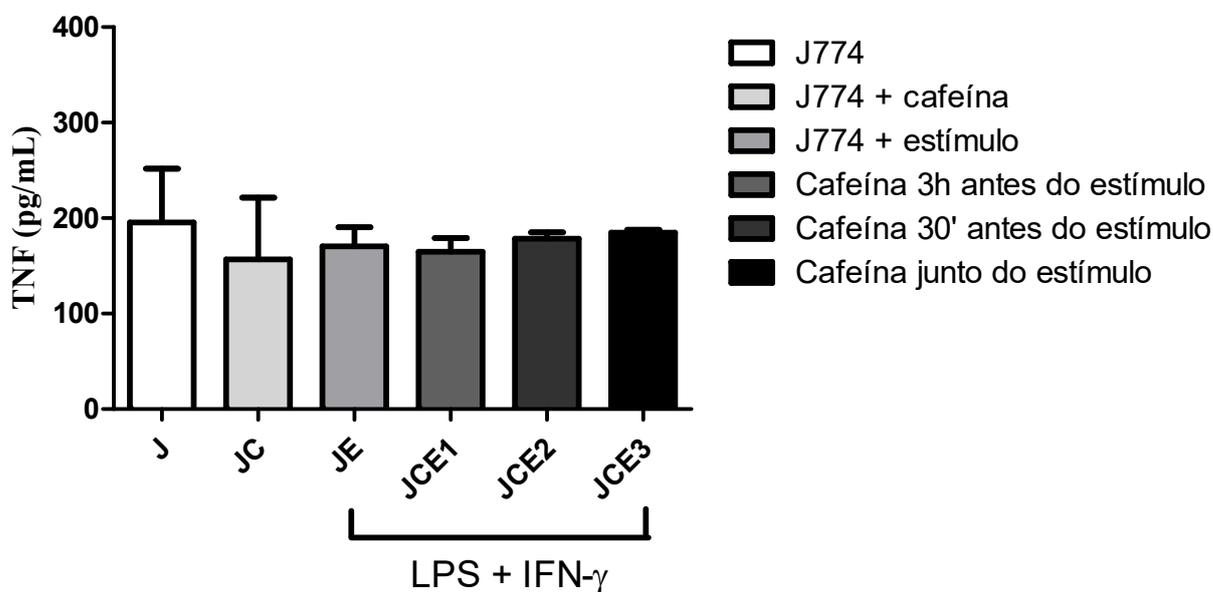


Fig. 17 – Produção de TNF em células J774A.1 expostas a 10 μ M de cafeína e estimuladas com LPS e IFN- γ . Células J774A.1 foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 células/poço e tratadas com 10 μ M de cafeína conforme descrito. As células foram incubadas a 33°C / 5% CO₂ durante 3 horas. Após as três horas, as células receberam o estímulo de LPS e IFN- γ . Posteriormente foram incubadas novamente a 37°C / 5% CO₂ durante 72h. A dosagem de TNF foi realizada pelo método de ELISA. O gráfico representa a média e desvio-padrão de três experimentos independentes, realizados em duplicata.

O tratamento com cafeína na concentração de 10 μ M não alterou o padrão de produção da citocina TNF por células J774A.1.

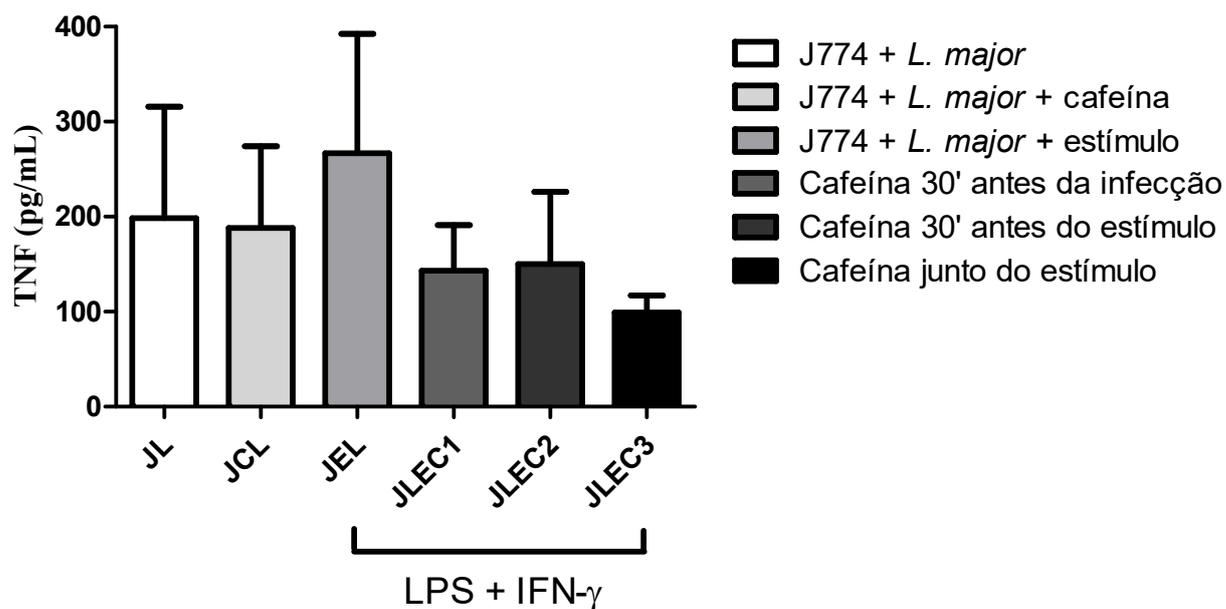


Fig. 18 – Produção de TNF em células J774A.1 infectadas com *L. major* expostas a 10 μ M de cafeína e estimuladas com LPS e IFN- γ . Células J774A.1 foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 células/poço, infectadas com *L. major* e tratadas com 10 μ M de cafeína conforme descrito. As células foram incubadas a 33°C / 5% CO₂ durante 3 horas. Após as três horas, as células receberam o estímulo de LPS e IFN- γ . Posteriormente foram incubadas novamente a 37°C / 5% CO₂ durante 72h. A dosagem de TNF foi realizada pelo método de ELISA. O gráfico representa a média e desvio-padrão de três experimentos independentes, realizados em duplicata.

Verificou-se que a o tratamento com cafeína 10 μ M antes ou durante o curso de infecção de células J774A.1 por parasitos *L. major* não foi capaz de alterar a produção da citocina TNF.

7. DISCUSSÃO

A cafeína é uma molécula presente em diversos alimentos sendo amplamente consumida pela população mundial. Nos últimos anos tem sido descritos os principais efeitos moduladores da cafeína sobre o sistema imune. Por apresentar semelhança estrutural com a molécula de adenosina, a cafeína é capaz de se ligar aos seus receptores e antagonizar os seus efeitos nos sistemas orgânicos. Além disso, a cafeína também pode atuar na inibição de enzimas pertencentes à classe das fosfodiesterases, causando um aumento nas concentrações intracelulares de AMPc (FREDHOLM et al., 1999; HERRIGAN; KELLY; CONNOR, 2006; SHARIF et al., 2017). Sugere-se que os efeitos da cafeína sobre o sistema imune sejam dependentes da dosagem administrada. Deste modo, a cafeína pode apresentar efeitos tanto pró-inflamatórios quanto anti-inflamatórios.

Como mencionado anteriormente, a cafeína atua como um inibidor das enzimas pertencentes às classes das fosfodiesterases. Em nosso trabalho, buscamos avaliar o efeito da cafeína sobre o perfil de crescimento de *L. major*, uma vez que já é descrito na literatura a presença de três fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos, capazes de hidrolisar AMPc, em *L. major* (JOHNER et al., 2006). Iniciamos nosso estudo verificando o efeito da cafeína sobre o crescimento de *L. major*. Verificamos que a cafeína na concentração de 10 μ M em meio de cultura não altera o perfil de crescimento de *L. major*. O mesmo efeito foi observado para *L. amazonensis* tratadas com 100 μ M de cafeína (CARVALHO JÚNIOR, 2017).

Contudo, parasitos em meio de cultura contendo 1000 μ M de cafeína apresentaram uma redução na taxa de crescimento após 48 horas. Deste modo, a cafeína, em concentrações elevadas, parece impedir o crescimento de *L. major*. Poucos trabalhos descrevem o efeito da enzima fosfodiesterase em parasitos do gênero *Leishmania*. Sugere-se que ela esteja envolvida com vias de proliferação de promastigotas (WALTER et al, 1978). O trabalho supracitado (JOHNER et al., 2006) estudou o efeito de inibidores das enzimas fosfodiesterases na proliferação celular de *L. major* e *Leishmania infantum*. Foi verificado que os inibidores das fosfodiesterases foram capazes de inibir a proliferação de promastigotas de *L. major* em cultura. Um outro estudo verificou que na presença de 1000 μ M de cafeína, houve um aumento do acúmulo de AMPc em promastigotas de *Leishmania tropica* que resultou em uma redução de 50% na taxa de proliferação do parasito. Em *Leishmania donovani* tratadas com 2000 μ M de cafeína verificou-se uma redução da taxa de transformação de amastigota em promastigotas após 48 horas de tratamento (WALTER et al, 1978).

Embora a especificidade da cafeína não possa ser dada como certa para essa concentração, acreditamos que a concentração de 1000 μ M pode ter inibido os efeitos das fosfodiesterases, causando acúmulo de AMPc, que por sua vez gerou uma cascata de sinalização que resultou em redução da proliferação do parasito em relação ao grupo não tratado ou tratado com uma concentração menor de cafeína (Fig. 8).

Alguns estudos descrevem os efeitos citotóxicos causados pela cafeína em modelos *in vitro* (CHEN; HWANG, 2016; HWANG et al., 2016; JAFARI; RABBANI, 2000, 2004). Muitos desses estudos relacionam os efeitos da cafeína ao acúmulo de AMPc, decorrente da inibição da fosfodiesterase. A inibição dessa classe de enzimas é alcançada com uma concentração aproximada de 200 μ M (ATIK et al., 2017). Em relação ao tratamento de células J774A.1 com cafeína, foi observado que, como para o parasito, a cafeína foi capaz de impedir o crescimento celular nas concentrações mais altas, isto é, acima de 500 μ M.

De acordo com o perfil de crescimento (Fig. 9), nossos dados evidenciam que o efeito da cafeína sobre o perfil de crescimento de células J774A.1 ocorre de forma dose/tempo-dependente, como também observado em macrófagos alveolares de ratos (JAFARI; RABBANI, 2000). Ao analisar o efeito da cafeína ao longo do tempo é possível observar que o crescimento celular foi afetado de forma significativa no tempo de 48h, para as concentrações de cafeína superiores a 500 μ M, no qual não há redução da viabilidade, mas uma menor taxa de crescimento em relação ao grupo controle. A cafeína, portanto, em altas concentrações, impede o crescimento celular em até 48 horas após a administração. No tempo de 72h, é possível perceber que há uma elevação dessa taxa de crescimento das células J774A.1 tratadas com cafeína nas concentrações acima de 500 μ M. Essa recuperação do crescimento celular após 72h pode ser decorrente da recuperação celular e adaptação ao meio contendo altas concentrações de cafeína ou até mesmo da parcial ou completa metabolização da molécula, que resulta em redução da sua concentração na cultura.

A partir desses dados verificamos que concentrações de cafeína abaixo de 100 μ M não alteram o perfil de crescimento das células J774A.1 para o tempo de 72h e que a concentração de 10 μ M também não modificou o padrão de crescimento de *L. major*. Esses achados possibilitaram a escolha da dosagem testada no contexto da infecção dos macrófagos da linhagem J774A.1 pelo parasito. Antes, porém, foi verificado se a cafeína teria efeito sobre a atividade da enzima adenosina desaminase (Fig. 11).

A adenosina desaminase é uma enzima citosólica, que pode também ser expressa na superfície celular (FRANCO et al., 1997). Essa enzima é responsável por controlar os níveis de adenosina, que apresenta um potencial efeito anti-inflamatório sobre células do sistema imune. Deste modo, decidimos verificar se a cafeína exerce efeito sobre a atividade da adenosina desaminase, uma vez que uma maior atividade da ADA poderia reduzir os efeitos anti-inflamatórios por meio da hidrólise da adenosina.

Poucos trabalhos na literatura avaliaram o papel da cafeína sobre a adenosina desaminase em células do sistema imune. Um estudo *in vitro* avaliou o efeito da cafeína sobre a enzima proveniente de células da mucosa gástrica de novilhos. Os resultados encontrados mostram que a ADA é inibida de forma não competitiva pela cafeína na temperatura de 37°C. Nesse estudo, as concentrações testadas de cafeína foram superiores à 30µM (SABOURY et al., 2003). Um outro trabalho realizado com ratos submetidos a exercícios e tratados com cafeína em diferentes concentrações não evidenciou efeito isolado da cafeína sobre a atividade da ADA em sinaptossomas de córtex cerebral (VIEIRA, 2012). Os nossos achados também não evidenciaram efeito da cafeína sobre a atividade da adenosina desaminase em células J774A.1 (Fig. 11). Houve, contudo, uma redução da atividade da adenosina desaminase decorrente da estimulação com LPS e IFN- γ . Essa redução da atividade pode resultar em aumento do substrato da enzima, isto é, da concentração de adenosina no meio, potencializando uma resposta do tipo anti-inflamatória. Células do sistema imunológico, contudo, são capazes de regular positivamente a expressão de ectonucleotidases em resposta ao estímulo por LPS ou IFN- γ (COHEN et al., 2015; VUADEN et al., 2007; ZANIN et al., 2012). O aumento na expressão de ectonucleotidases, mediado pelo estímulo com LPS e IFN- γ , associado a uma redução da atividade da enzima adenosina desaminase pode contribuir para um equilíbrio entre as respostas do tipo pró e anti-inflamatórias.

Buscando compreender o estabelecimento de uma resposta imune por células J774A.1 tratadas com cafeína durante a infecção por *L. major*, avaliamos a taxa de infecção, bem como a produção de óxido nítrico, IL-10 e TNF pelas células infectadas por 72 horas.

Conforme verificado, a ativação das células J774A.1 por LPS e IFN- γ foi capaz de reduzir a taxa de infecção por *L. major*. A administração de LPS e IFN- γ estimula a produção de óxido nítrico pelas células do sistema imune. A produção de óxido nítrico, por sua vez, está relacionada com a eliminação do parasito. O efeito da redução da taxa de infecção nos grupos estimulados parece ser mediado pela estimulação com LPS e IFN- γ e não como um efeito da

caféina. É possível notar, entretanto, que a taxa de infecção nas células tratadas com caféina antes da infecção manteve-se semelhante ao grupo infectado não estimulado, não havendo redução como nos outros grupos tratados com caféina e estimulados com LPS e IFN- γ . Dados anteriores, não publicados, do nosso laboratório verificaram que o tratamento com caféina não alterou as taxas de infecção no contexto da infecção por *L. amazonensis*. Diante dos resultados encontrados, decidimos verificar a produção de óxido nítrico por essas células.

O controle e eliminação do parasito se dá basicamente pela ativação de macrófagos pelo IFN- γ . Os sinais gerados pelo IFN- γ e pelo LPS estimulam a produção de NO pelos macrófagos. A produção de NO é um fator determinante na atividade microbicida dos macrófagos murinos (LIEW; WEI; PROUDFOOT, 1997). Também é descrito o papel de NO na eliminação de *L. major* (GREEN et al., 1990; LIEW et al., 1990). Deste modo, no presente estudo, avaliamos a produção de NO em células da linhagem J774A.1 após tratamento com caféina.

Pesquisadores avaliaram a produção de óxido nítrico em macrófagos murinos da linhagem RAW264.7 estimulados com LPS e tratados com caféina (100 μ M, 400 μ M e 800 μ M) por 24 horas e encontraram que a caféina foi capaz de reduzir a produção de NO nas células estimuladas por LPS. Nesse trabalho foi verificado também os níveis de iNOS, enzima envolvida na produção de NO, e mRNA dessa mesma enzima. A caféina reduziu os níveis de ambos parâmetros, indicando que a redução da produção de NO é decorrente da inibição do mRNA e da enzima. Acredita-se que esse efeito seja decorrente da inibição da expressão do fator de transcrição nuclear kappa-B (NF- κ B), uma vez que esse fator é um potente indutor de genes pró-inflamatórios (iNOS, IL-6). O tratamento com caféina também diminuiu os níveis nucleares de NF- κ B p65 em comparação com o controle tratado com LPS (HWANG et al., 2016).

Em nosso trabalho, não foi observado o mesmo efeito pelas células não infectadas (Fig. 12). Porém também foi verificado uma redução da produção de NO para o tratamento com caféina realizado antes da infecção por *L. major*. Nossos resultados indicam, portanto, que a caféina quando administrada antes da infecção pode atuar sobre alguma via de sinalização, que resulta na redução da produção de NO. Essa redução da produção de óxido nítrico nas células tratadas com caféina antes da infecção explica a manutenção da taxa de infecção. Os tratamentos administrados durante o curso da infecção, contudo, não alteraram a produção de NO pelas células J774A.1 em relação ao grupo controle estimulado (Fig. 14). A principal hipótese para explicar a produção normal de NO nos demais grupos de células J774A.1

infectadas é que a administração de cafeína nos momentos que antecedem a estimulação ou junto da administração do estímulo é capaz de interagir com os receptores adenosinérgicos, inibindo os efeitos anti-inflamatórios da adenosina. Essa inibição associada às vias de estimulação por LPS e IFN- γ , garante a produção normal de NO. Esse efeito é mais significativo na administração da cafeína junto do estímulo (Fig. 14).

Em relação à produção da citocina IL-10, não verificamos, nenhum efeito significativo decorrente da infecção, do tratamento com cafeína e da estimulação com LPS e IFN- γ (Fig. 15 e 1). Dados do nosso laboratório também não verificaram efeitos da cafeína sobre a produção de IL-10 em camundongos C57/B6 infectados com *L. amazonensis* (CARVALHO JÚNIOR, 2017). Vale destacar que as concentrações obtidas para a dosagem dessa citocina foram relativamente baixas, sendo insignificantes para o curso da infecção. Alguns trabalhos tem demonstrado o efeito da IL-10 no contexto da infecção por *Leishmania*. Apesar dos nossos resultados não verificarem diferença na produção de IL-10, é descrito na literatura que amastigotas de *L. major* e *L. amazonensis* induzem a produção da citocina por macrófagos derivados de medula estimulados por LPS. Nesse trabalho, verificaram também que a IL-10 produzida pelos macrófagos infectados diminuiu a produção de IL-12 e TNF. Além disso, foi importante na prevenção da morte de parasitas por macrófagos ativado (KANE; MOSSER, 2001). Outros estudos sugerem que a IL-10 é uma citocina importante na promoção da suscetibilidade a *L. major* (BELKAID et al., 2002; NOBEN-TRAUTH et al., 2003).

A citocina TNF está envolvida diretamente com a indução da capacidade de ativar macrófagos para matar *L. major* via produção de NO (LIEW et al., 2016). Deste modo, avaliamos a capacidade de produção da citocina pelas células J774A.1 infectadas com *L. major* e tratadas com cafeína, LPS e IFN- γ . Um estudo, realizado *in vitro*, observou que macrófagos peritoneais de camundongo ativado por TNF se tornaram mais efetivos na eliminação do parasito. Além do mais, a infecção das células por *L. major* aumentou a capacidade celular de produzir a citocina em questão (THEODOS et al., 1991).

Nosso trabalho, entretanto, não verificou efeito da infecção de células J774A.1 por *L. major* sobre o padrão de produção de TNF. Houve uma variação em relação à produção, contudo, sem diferença estatística. Acreditamos que os dados evidenciam uma produção basal da citocina por essas células e que o estímulo com LPS e IFN- γ foram insuficientes para estimular a produção de TNF tanto em células não infectadas quanto nas células infectadas pelo parasito. A concentração de LPS adicionada ao meio foi 100pg/mL. Estudos que verificaram o

aumento da produção de TNF estimulada por LPS testaram concentrações acima de 1000pg/mL (KIKKAWA et al., 1998; SHERRY et al., 2007; VAN DER BRUGGEN et al., 1999). De modo equivalente, o tratamento com 10µM de cafeína por 72 horas foi ineficaz em modificar a produção da citocina.

Uma hipótese presente na literatura relaciona o efeito da cafeína ao subtipo de receptor de adenosina que é bloqueado pela molécula de cafeína. Sugere-se que essa molécula pode apresentar efeito citoprotetor pela ativação de alguns receptores específicos ou citotóxicos pela ativação de outros (FREDHOLM et al., 1999; JARDIM, 2005). É descrito que macrófagos murinos da linhagem J774.1 apresentam maior expressão de RNA do receptor de adenosina A3 em relação ao receptor de adenosina A1 ou A2 (MCWHINNEY et al., 1996). A cafeína é um antagonista não seletivo de adenosina e tem baixa afinidade pelos receptores A3 e grande afinidade pelos receptores A1, A2A e A2B (FREDHOLM et al., 1999).

Deste modo, os efeitos observados ou a ausência deles podem ser decorrentes de uma ligação específica a um determinado subtipo de receptor, que desencadeia uma via de sinalização distinta da observada em outros estudos ou até mesmo da falta de ligação aos receptores decorrente da baixa especificidade ou da pequena concentração de cafeína testada em nosso trabalho.

8. SUMÁRIO DE RESULTADOS

- ✓ Cafeína altera o perfil de crescimento de *L. major* na concentração de 1000 μ M.
- ✓ Células J774A.1 tem o crescimento limitado quando tratadas com concentrações superiores a 500 μ M de cafeína por 48 e 72h.
- ✓ A atividade da enzima adenosina desaminase não é regulada por cafeína em concentrações menores que 100 μ M.
- ✓ O tratamento com 10 μ M cafeína em células J774A.1 infectadas por *L. major* e estimuladas com LPS e IFN- γ não altera a taxa de infecção e a produção das citocinas IL-10 e TNF.
- ✓ A cafeína administrada antes da infecção é capaz de reduzir a produção de NO, mas a administração conjunta com LPS e IFN- γ torna a produção de NO superior ao observado para as células não infectadas.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Em relação aos efeitos da cafeína sobre o crescimento de *L. major* e de células J774A.1 concluímos que a cafeína, em concentrações elevadas e ao longo do tempo, é capaz de impedir a proliferação celular e por consequência o seu crescimento adequado. Em contrapartida, a cafeína não alterou a atividade da enzima adenosina desaminase em concentrações abaixo de 100 μ M.

Verificamos também que a cafeína no contexto da infecção de células J774A.1 por parasitos da espécie *L. major* não alterou a taxa de infecção e a produção das citocinas IL-10 e TNF. Contudo, quando administrada antes da infecção, causou uma redução na produção de NO. Interessante destacar que nosso trabalho evidenciou a importância do momento da administração da cafeína, no contexto da infecção, para modulação da produção de NO por células J774A.1.

Concluimos que apesar dos efeitos descritos, na literatura, da cafeína sobre o sistema imune, nosso estudo não observou efeitos significativos no contexto da infecção de macrófagos da linhagem J774A.1 por parasitos da espécie *L. major*. Como mencionado anteriormente, a ação da cafeína é dose e tempo dependente, o que pode justificar a ausência de efeitos sobre a produção de citocinas e sobre a atividade da enzima adenosina desaminase.

Existem poucos estudos correlacionando os efeitos da cafeína sobre o sistema imune no contexto das doenças infectocontagiosas. Deste modo, novos estudos que busquem compreender os potenciais benefícios da cafeína sobre a modulação da resposta imune frente à patógenos se fazem importantes, uma vez que podem contribuir para o desenvolvimento de novos tratamentos que reduzam as altas taxas de prevalência de doenças negligenciadas em todo o mundo.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, L. C. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 7, p. 2952–2959, 1993.

AL REEF, T.; GHANEM, E. Caffeine: Well-known as psychotropic substance, but little as immunomodulator. **Immunobiology**, v. 223, n. 12, p. 818–825, 2018a.

ALTENHOFEN, S. et al. Avaliação dos efeitos de fármacos benzodiazepínicos sobre o catabolismo de nucleotídeos, nucleosídeos e acetilcolina em encéfalo de zebrafish adulto (*Danio rerio*). 2013.

ALVES, R. C.; CASAL, S.; OLIVEIRA, B. Benefícios do café na saúde: Mito ou realidade? **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2169–2180, 2009.

ANTONIOLI, L. et al. Adenosine and inflammation: What's new on the horizon? **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 8, p. 1051–1068, 2014.

ATIK, A. et al. Caffeine for apnea of prematurity: Effects on the developing brain. **NeuroToxicology**, v. 58, p. 94–102, 2017.

BARCELOS, R. P. et al. Caffeine intake may modulate inflammation markers in trained rats. **Nutrients**, v. 6, n. 4, p. 1678–1690, 2014.

BELKAID, Y. et al. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v. 420, n. 6915, p. 502–507, 2002.

BOGDAN, C. et al. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. **Current opinion in immunology**, v. 8, n. 4, p. 517–25, ago. 1996.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International journal for parasitology**, v. 28, n. 1, p. 121–34, jan. 1998.

BURNSTOCK, G.; BOEYNAEMS, J. M. Purinergic signalling and immune cells. **Purinergic Signalling**, v. 10, n. 4, p. 529–564, 2014.

CARVALHO JÚNIOR, J. M. DE. Efeito da administração diária de cafeína sobre a infecção por *Leishmania amazonensis*. 2017.

CEKIC, C.; LINDEN, J. Purinergic regulation of the immune system. **Nature Reviews**

Immunology, v. 16, n. 3, p. 177–192, 2016.

CHEN, J. C.; HWANG, J. H. Effects of caffeine on cell viability and activity of histone deacetylase 1 and histone acetyltransferase in glioma cells. **Tzu Chi Medical Journal**, v. 28, n. 3, p. 103–108, 2016.

COHEN, H. B. et al. IFN- γ Prevents Adenosine Receptor (A2bR) Upregulation To Sustain the Macrophage Activation Response. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 8, p. 3828–3837, 2015.

CRONSTEIN, Bruce N. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. **Journal of applied Physiology**, 1994, 76.1: 5-13.

CUNHA, S. DE F. V. DA. Influência da suplementação de cafeína na performance física de ratas submetidas ao treinamento físico e sua relação com o estresse oxidativo. 2012.

DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA, E. et al. Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 8, p. 850–857, 2008.

DE SOUZA, M. C. et al. The influence of ecto-nucleotidases on *Leishmania amazonensis* infection and immune response in C57B/6 mice. **Acta Tropica**, v. 115, n. 3, p. 262–269, 2010.

DESCOTEAUX, A.; PODINOVSKAIA, M. *Leishmania* and the macrophage : A multifaceted interaction. **Future Microbiology**, v. 10, n. January, p. 111–129, 2015.

DI VIRGILIO, F.; VUERICH, M. Purinergic signaling in the immune system. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 191, p. 117–123, 2015.

DOYLE, L. W.; RANGANATHAN, S.; CHEONG, J. L. Y. Neonatal caffeine treatment and respiratory function at 11 years in children under 1, 251 g at Birth. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 196, n. 10, p. 1318–1324, 2017.

ELIAS, D. et al. Consumo de cafeína : uma abordagem bioquímica e sociocultural no IFC-Araquari. 2017.

FENTON, R. A. et al. Caffeine-induced diuresis and natriuresis is independent of renal tubular NHE3. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 308, n. 12, p. F1409–F1420, 2015.

FIGUEIREDO, A. B. et al. *Leishmania amazonensis* impairs DC function by inhibiting CD40

expression via A 2B adenosine receptor activation. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 5, p. 1203–1215, 2012.

FIGUEIREDO, A. B. DE; SOUZA-TESTASICCA, M. C.; AFONSO, L. C. C. Purinergic signaling and infection by *Leishmania*: A new approach to evasion of the immune response. **Biomedical Journal**, v. 39, n. 4, p. 244–250, 2016.

FRANCO, R. et al. Cell surface adenosine deaminase: Much more than an ectoenzyme. **Progress in Neurobiology**, v. 52, n. 4, p. 283–294, 1997.

FRASSON, Amanda Piccoli. Estudo da expressão gênica das ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (e-ntpdases) em *Trichomonas vaginalis* e participação da sinalização purinérgica na relação parasito-hospedeiro. 2015.

FREDHOLM, B. B. et al. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacological reviews**, v. 51, n. 1, p. 83–133, 1999.

GIUSTI, J, GALANTI, B. Adenosine Deaminase In: HU Bergmeyer eds. Methods of enzymatic analysis. New York: Academic Press, 1974;1092-9.

GOMES, R. S. et al. E-NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) of *Leishmania amazonensis* inhibits macrophage activation. **Microbes and Infection**, v. 17, n. 4, p. 295–303, 2015.

GREEN, S. J. et al. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 144, n. 1, p. 278–83, 1990.

HAMIDZADEH, Kaja; MOSSER, David M. Purinergic signaling to terminate TLR responses in macrophages. **Frontiers in Immunology**, 2016, 7: 74.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. v. 354, p. 1191–1199, 1999.

HORRIGAN, L. A.; KELLY, J. P.; CONNOR, T. J. Immunomodulatory effects of caffeine: Friend or foe? **Pharmacology and Therapeutics**, v. 111, n. 3, p. 877–892, 2006.

HWANG, J. H. et al. Caffeine prevents LPS-induced inflammatory responses in RAW264.7 cells and zebrafish. **Chemico-Biological Interactions**, v. 248, p. 1–7, 2016.

JAFARI, M.; RABBANI, A. Dose and time dependent effects of caffeine on superoxide release, cell survival and DNA fragmentation of alveolar macrophages from rat lung. **Toxicology**, v.

149, n. 2–3, p. 101–108, 2000.

JAFARI, M.; RABBANI, A. Studies on the mechanism of caffeine action in alveolar macrophages: Caffeine elevates cyclic adenosine monophosphate level and prostaglandin synthesis. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 53, n. 6, p. 687–692, 2004.

JARDIM, F. M. A. Efeito da ingestão crônica da cafeína na atividade de enzimas antioxidantes, peroxidação de lipídeos e na produção de radicais livres em diferentes regiões do sistema nervoso central de ratos adultos. p. 64, 2005.

JOHNER, A. et al. Cyclic nucleotide specific phosphodiesterases of *Leishmania major*. **BMC Microbiology**, v. 6, p. 1–13, 2006.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 2, p. 1141–1147, 2001.

KIKKAWA, I. et al. Lipopolysaccharide (LPS) Stimulates the Production of Tumor Necrosis Factor (TNF)- α and Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) by Osteoclasts (OCL) in Murine Bone Marrow Cell Culture. **Microbiology and immunology**, v. 42, n. 9, p. 591–598, 1998.

LASKAY, Tamás; VAN ZANDBERGEN, Ger; SOLBACH, Werner. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology**, 2008, 213.3-4: 183-191.

LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. **Immunobiology**, v. 213, n. 3–4, p. 377–387, 14 maio 2008.

LIEW, F. Y., et al. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **The Journal of Immunology**, 1990, 144.12: 4794-4797.

LIEW, F. Y.; LI, Yun; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **The Journal of Immunology**, 1990, 145.12: 4306-4310.

LIEW, F. Y.; WEI, X. Q.; PROUDFOOT, L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 352, n. 1359, p. 1311–1315, 1997.

LINDEN, J.; KOCH-NOLTE, F.; DAHL, G. Purine Release, Metabolism, and Signaling in the

- Inflammatory Response. **Annual Review of Immunology**, v. 37, n. 1, p. 325–347, 2019.
- MABROK, MAHMOUD ABD ELAZIZ; WAHDAN, A. The immune modulatory effect of oregano (*Origanum vulgare* L .) essential oil on *Tilapia zillii* following intraperitoneal infection with *Vibrio anguillarum*. **Aquaculture International**, p. 1147–1160, 2018.
- MANDEL, H. G. Update on caffeine consumption, disposition and action. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 9, p. 1231–1234, 2002.
- MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFARIFAR, F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and Global Health**, v. 110, n. 6, p. 247–260, 2016.
- MCWHINNEY, C. D. et al. Activation of adenosine A3 receptors on macrophages inhibits tumor necrosis factor- α . **European Journal of Pharmacology**, v. 310, n. 2–3, p. 209–216, 1996.
- MOMEN, H. et al. Brazilian *Leishmania* stocks phenotypically similar to *Leishmania major*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 34, n. 6, p. 1076–1084, 1985.
- NEVES, D. P. et al. Parasitologia Humana - Neves 11^aed. **Parasitologia Humana**, p. 127–138, 2005.
- NIEBER, K. The Impact of Coffee on Health Author Pharmacokinetics and Mode of Action Bioactive Components in Coffee. **Planta Med**, v. 83, n. 1, p. 1256–1263, 2017.
- NOBEN-TRAUTH, N. et al. The Relative Contribution of IL-4 Receptor Signaling and IL-10 to Susceptibility to *Leishmania major* . **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 10, p. 5152–5158, 2003.
- NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological perspectives of leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 135, 2010.
- PASSOS, D. F. et al. Adenosine signaling and adenosine deaminase regulation of immune responses: impact on the immunopathogenesis of HIV infection. **Purinergic Signalling**, v. 14, n. 4, p. 309–320, 2018.
- PEREIRA, B. A. S. *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* : Participação de fatores do hospedeiro e do parasito no curso da infecção experimental em Rio de Janeiro. 2010.
- PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis

transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 15 ago. 2008.

PRAY, Leslie, et al. Caffeine in food and dietary supplements: examining safety. Workshop summary. In: **Caffeine in food and dietary supplements: examining safety. Workshop summary**. National Academies Press, 2014.

ROGERS, K. A. et al. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS microbiology letters**, v. 209, n. 1, p. 1–7, 19 mar. 2002.

SABOURY, A. A. et al. Inhibition study of adenosine deaminase by caffeine using spectroscopy and isothermal titration calorimetry. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, n. 3, p. 849–855, 2003.

SALLES, Érika Machado de. Estudo do papel do ATP na ativação do sistema imune e na proteção durante a infecção por *Plasmodium chabaudi*. 2011. PhD Thesis. Universidade de São Paulo.

SANTOS, Ramon de Freitas. Caracterização e avaliação da atividade ectonucleotidásica do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com a infectividade in vitro. 2008.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592, 2016.

SERAFIM, T. D. et al. Sequential blood meals augment vector infectiousness by promoting *Leishmania* replication and triggering amplification of metacyclics via a novel retroleptomonad developmental stage HHS Public Access. **Nat Microbiol**, v. 3, n. 5, p. 548–555, 2018.

SHARIF, K. et al. Coffee and autoimmunity: More than a mere hot beverage! **Autoimmunity Reviews**, v. 16, n. 7, p. 712–721, 2017.

SHERRY, C. L. et al. Augmented Lipopolysaccharide-Induced TNF- α Production by Peritoneal Macrophages in Type 2 Diabetic Mice Is Dependent on Elevated Glucose and Requires p38 MAPK. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 2, p. 663–670, 2007.

SPÄTH GF, BEVERLEY SM. A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. **Exp Parasitol**. 2001;99:97-103.

STEBUT, E. VON. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2014.

TASLIMI, Y.; ZAHEDIFARD, F.; RAFATI, S. Leishmaniasis and various immunotherapeutic

approaches. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 497–507, 2018.

TEMPLE, J. L. et al. The Safety of Ingested Caffeine: A Comprehensive Review. **Frontiers in Psychiatry**, v. 8, n. May, p. 1–19, 2017.

THEODOS, C. M. et al. Role of tumor necrosis factor in macrophage leishmanicidal activity in vitro and resistance to cutaneous leishmaniasis in vivo. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 8, p. 2839–2842, 1991.

TONIN, Alexandre Alberto, et al. Componentes dos sistemas purinérgico e colinérgico nos processos inflamatórios e neurológicos em roedores infectados experimentalmente com *Toxoplasma gondii*. 2014. PhD Thesis. Universidade Federal de Santa Maria.

VAN DER BRUGGEN, T. et al. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the Raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 8, p. 3824–3829, 1999.

VIEIRA, Juliano Marchi, et al. Efeito do exercício de alta intensidade na atividade de enzimas do sistema purinérgico e colinérgico em ratos tratados com cafeína. 2012.

VIEIRA, J. M. et al. Caffeine and high intensity exercise: Impact on purinergic and cholinergic signalling in lymphocytes and on cytokine levels. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 108, n. September, p. 1731–1738, 2018.

VUADEN, F. C. et al. Lipopolysaccharide alters nucleotidase activities from lymphocytes and serum of rats. **Life Sciences**, v. 80, n. 19, p. 1784–1791, 2007.

Walter RD, Buse E, Ebert F: Effect of cyclic AMP on transformation and proliferation of *Leishmania* cells. **Tropenmed Parasitol**. 1978, 29: 439-442.

WELSH, C.; PAN, J.; BELIK, J. Caffeine impairs gastrointestinal function in newborn rats. **Pediatric Research**, v. 78, n. 1, p. 24–28, 2015.

WILLSON, C. The clinical toxicology of caffeine: A review and case study. **Toxicology Reports**, v. 5, n. November, p. 1140–1152, 2018.

ZANIN, R. F. et al. Differential macrophage activation alters the expression profile of NTPDase and Ecto-5'-nucleotidase. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

ZAVIALOV, A. V.; ENGSTRÖM, Å. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. **Biochemical Journal**, v. 391, n. 1, p. 51–57, 2005.

ZIMMERMANN, H. Purinergic signaling in neural development. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 22, n. 2, p. 194–204, 2011.