

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
PPG CBIOL

Dissertação

**O papel de CD40 expresso nos
macrófagos com ênfase na
infecção por *Leishmania
amazonensis* – Revisão**

Suzy Carvalho Oliveira

Ouro Preto
2022



UFOP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

O papel de CD40 expresso nos macrófagos
com ênfase na infecção por *Leishmania*
amazonensis – Revisão

Autora: Suzy Carvalho Oliveira

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Ouro Preto, como exigência
parcial à obtenção do título de Mestre
em Ciências Biológicas, área de
concentração: Doenças infecciosas e
parasitárias.

Ouro Preto
2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

O48p Oliveira, Suzy Carvalho.
O papel de CD40 expresso nos macrófagos com ênfase na infecção por
L. amazonensis - Revisão. [manuscrito] / Suzy Carvalho Oliveira. - 2022.
92 f.

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso.
Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro
Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. L. amazonensis. 2. Macrófagos. 3. CD40. 4. Sinalização purinérgica.
I. Afonso, Luís Carlos Crocco. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III.
Título.

CDU 577.27:561.24

Bibliotecário(a) Responsável: Luciana De Oliveira - SIAPE: 1.937.800



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

Suzy Carvalho Oliveira

O papel de CD40 expresso nos macrófagos com ênfase na infecção por *Leishmania amazonensis* – Revisão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de mestre

Aprovada em 19 de agosto de 2022

Membros da banca

Dr. Luís Carlos Crocco Afonso - Orientador Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Amanda Braga de Figueiredo - Centro de Pesquisa e Ensino Hospital Albert Eisten
Dra. Joana Ferreira do Amaral - Universidade Federal de Ouro Preto

Luís Carlos Crocco Afonso, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 04 de outubro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Luís Carlos Crocco Afonso, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 04/10/2022, às 14:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0407488** e o código CRC **632EA63F**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.013772/2022-12

SEI nº 0407488

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000
Telefone: 3135591672 - www.ufop.br

Trabalho desenvolvido no Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, sob orientação do Professor Doutor Luís Carlos Crocco Afonso, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho aos meus pais, os maiores apoiadores dos meus sonhos
e os pilares da minha formação acadêmica*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro à Deus, por me sustentar e renovar as minhas forças diariamente. À meus pais, por proporcionar todas as condições para que eu pudesse concluir essa etapa. Meu irmão e cunhada pela gentileza de estarem comigo durante a revisão do trabalho. Meus sobrinhos por serem minha inspiração. Ao meu companheiro de aventuras e melhor amigo pela generosidade, consolo e compreensão.

Agradeço ao Prof. Dr. Luís Carlos, por me receber como aluna e possibilitar a realização de um sonho. Profissional ético, humanitário, íntegro e atento. Grata pela orientação, paciência e compreensão. Os ensinamentos que me foram passados vão muito além de instruções práticas e teóricas, mas valores que levarei como exemplo.

Agradeço também a Profa. Dra. Samantha, pela disponibilidade, ajuda e contribuições em todas as etapas do desenvolvimento desse trabalho. Aos professores Ricardo Gonçalves e Wagner Tafuri pelo apoio e acompanhamento.

Agradeço aos colegas de laboratório pela convivência e parceria. Em especial a Duda, pelas boas conversas e por tornar agradável as horas de trabalho, e a Josi, pela companhia e conselhos.

Agradeço as minhas amigas, Luhanna, Gabi e Carol, pelas distrações, risadas e conselhos, além de tornarem leve e feliz o tempo que passei em Ouro Preto. A minha amiga Gabrielle, por iniciar essa jornada comigo, e por continuar tão presente na minha vida mesmo distante fisicamente.

Por fim, agradeço aos professores, funcionários e colegas de classe e outros laboratórios. O profissionalismo, a solidariedade e o trabalho competente realizado, tornou a minha trajetória mais fácil e alegre.

À todos que direta ou indiretamente esteve comigo durante esse período, deixo o meu sincero agradecimento.

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são.” (Aristóteles)

RESUMO

A *Leishmania* é o parasita que causa a doença conhecida como leishmaniose. A doença afeta as vísceras ou o tegumento, e apresenta sintomas de leves a graves, a depender da espécie transmissora. Nosso laboratório, nos últimos anos, investigou a resposta imune decorrente de infecções por *Leishmania*. Os resultados obtidos revelaram que *L. amazonensis*, quando comparada a outras espécies, apresenta resposta imune diferenciada, caracterizada pelo sucesso do parasita em resistir as respostas imunológicas do hospedeiro. Estudos realizados em células dendríticas mostraram que a infecção por *L. amazonensis* reduziu a expressão do receptor CD40 associada ao aumento na expressão da ectonucleotidase CD39 e 5'- nucleotidase CD73, responsáveis por hidrolisar ATP extracelular em ADP, AMP e adenosina, ocasionando a supressão imunológica. O CD40, expresso nos macrófagos, ao interagir com o ligante CD40L irá estimular os linfócitos T CD4⁺ a produzir IFN- γ , responsável por ativar o macrófago para que este produza NO e destrua o patógeno fagocitado. Macrófagos ativados por IFN- γ ativam o receptor purinérgico P₂X₇ e induzem a liberação de ATP. O ATP extracelular é hidrolisado pelas enzimas CD39 e CD73, que são altamente expressas durante a infecção por *L. amazonensis*. A adenosina gerada nesse processo leva a imunossupressão. Diante disso, propusemos realizar uma revisão da literatura que visa o papel da expressão de CD40 nos macrófagos com ênfase na infecção por *Leishmania amazonensis*. Ao fim, foi apresentado um modelo hipotético de possíveis mecanismos de evasão que a *L. amazonensis* utiliza para obter sucesso na infecção.

Palavras-chave: *L. amazonensis*; Macrófagos; CD40; Sinalização purinérgica

ABSTRACT

Leishmania is the parasite that causes the disease known as leishmaniasis. The disease affects the viscera or the integument, and presents mild to severe symptoms, depending on the transmitting species. Our laboratory, in recent years, has investigated the immune response resulting from *Leishmania* infections. The results obtained revealed that *L. amazonensis*, when compared to other species, presents a differentiated immune response, characterized by the success of the parasite in resisting the host's immune responses. Studies carried out in dendritic cells showed that infection by *L. amazonensis* reduced the expression of the CD40 receptor associated with the increase in the expression of CD39 ectonucleotidase and CD73 5'-nucleotidase, responsible for hydrolyzing extracellular ATP into ADP, AMP and adenosine, causing immune suppression. CD40, expressed on macrophages, when interacting with the CD40L ligand, will stimulate CD4+ T lymphocytes to produce IFN- γ , responsible for activating the macrophage so that it produces NO and destroys the phagocytosed pathogen. IFN- γ -activated macrophages activate the P2X7 purinergic receptor and induce ATP release. Extracellular ATP is hydrolyzed by CD39 and CD73 enzymes, which are highly expressed during *L. amazonensis* infection. The adenosine generated in this process leads to immunosuppression. In view of this, we proposed to carry out a review of the literature that aims at the role of CD40 expression in macrophages with emphasis on *Leishmania amazonensis* infection. Finally, a hypothetical model of possible evasion mechanisms that *L. amazonensis* uses to succeed in infection was presented.

Keywords: *L. amazonensis*; Macrophages; CD40; Purinergic signaling

ÍNDICE

DEDICATÓRIA.....	III
AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	XI
1.INTRODUÇÃO.....	12
2. METODOLOGIA.....	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
3.1 EXPRESSÃO E INTERAÇÕES DE CD40.....	25
3.1.1 A expressão de CD40 na produção das citocinas e ativação celular....	25
3.1.2 O papel de CD40 na produção das citocinas de importância na infecção por <i>Leishmania</i>	26
3.1.3 As interações de CD40 em doenças infecciosas	27
Interações de CD40 em infecções por <i>Leishmania</i>	27
Interações de CD40 em infecções por <i>Toxoplasma gondii</i>	29
Interações de CD40 em infecções por <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
Interações de CD40 em infecções Bacterianas	30
Interações de CD40 em infecções por vírus	30
Interações de CD40 em infecções por Fungos	32
3.1.4 As interações de CD40 em doenças não infecciosas.....	33
3.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO INDUZIDAS POR CD40	33
3.2.1 Vias de sinalização de CD40 em doenças infecciosas e não infecciosas.....	35
3.2.2 Vias de sinalização de CD40 em infecções por <i>Leishmania</i>	36

3.3 MECANISMOS QUE PODEM INFLUENCIAR NA EXPRESSÃO DE CD40 NOS MACRÓFAGOS	38
3.3.1 Receptores Toll-Like associados a expressão de CD40 em infecções.....	38
TLRs associados a expressão de CD40 em infecções por <i>Leishmania</i>	39
3.3.2 A sinalização purinérgica na ativação dos macrófagos.....	40
CD40 como indutor do ATP extracelular.....	43
O papel das nucleotidases e adenosina na suscetibilidade à infecção por <i>L. amazonensis</i>	44
4. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
5. MODELO PROPOSTO.....	56
6. CONCLUSÃO.....	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	14
Figura 2 - Distribuição da LCD no Brasil.....	15
2a. Boletim epidemiológico 2006.....	15
2b. Boletim epidemiológico 2017.....	15
Figura 3 - Características dos macrófagos compartilhadas.....	17
Figura 4 - Caracterização das subpopulações dos macrófagos (M1 e M2).....	18
Figura 5 - Ativação dos macrófagos.....	19
Figura 6 - Etapas da metodologia.....	22
Figura 7 - Vias de sinalização de CD40.....	34
Figura 8 - Via de sinalização induzida por CD40 em infecções por <i>Leishmania</i>	37
Figura 9 - Efeitos da sinalização purinérgica no sistema imune.....	48
Figura 10 - Respostas imunes desencadeadas por CD40.....	51
Figura 11 - Modelo proposto.....	57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADO - adenosina

ADP – adenosina difosfato

AMP – adenosina monofosfato

APCs – células apresentadoras de antígeno

ATP – adenosina trifosfato

ATPe – adenosina trifosfato extracelular

cAMP – monofosfato cíclico de adenosina

DCs – células dendríticas

E-NTPDases – Ectonucleotidases

5'-NT - Nucleotidase

ERK – Quinases reguladas por sinal extracelular

IFN- γ – Interferon gama

KO – Nocaute

LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa

LPS – Lipopolissacarídeo

LT – Linfócito T

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

mAb – anticorpo monoclonal

NF- κ B – Fator Nuclear kappa B

NK – Natural Killer

NKT – Células T Natural Killer

P38MAPK – Proteína quinase ativada por Mitógeno

ROS – Espécies reativas de oxigênio

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TLR – Receptores Toll-like

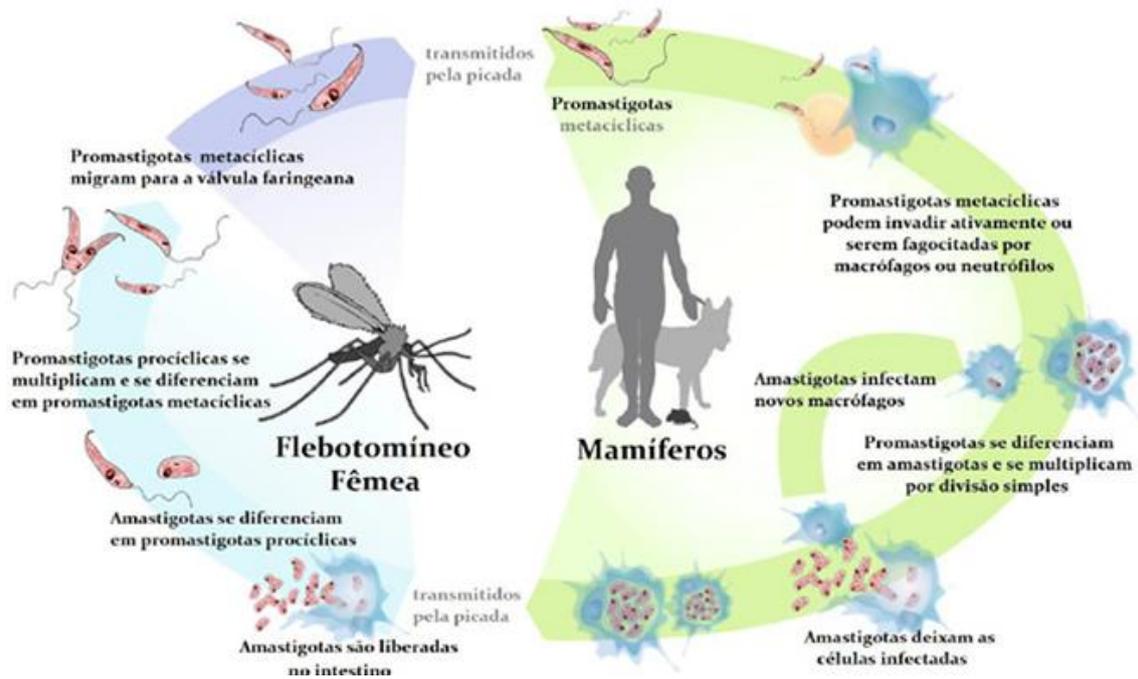
1. INTRODUÇÃO

A *Leishmania* é o parasita que causa a doença conhecida como leishmaniose. Sua transmissão ocorre através da picada de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, para espécies do Novo Mundo, e flebotomíneos do gênero *Phlebotomus*, para as espécies do Velho Mundo. A doença afeta as vísceras ou o tegumento, que podem apresentar sintomas de leves a graves, a depender da espécie transmissora (BITTENCOURT, 1991. LOUZIR, 1998). Por exemplo, as espécies que transmitem leishmaniose visceral são: *L.(L) infantum*; *L.(L) chagasi* e *L.(L) donovani*, enquanto as espécies transmissoras da leishmaniose tegumentar são: *L.(V) braziliensis*; *L. (L) amazonensis* e *L. (L) major*.

O ciclo de vida da *Leishmania* é heteroxênico, ou seja, para completar seu ciclo de vida ela precisa de pelo menos dois hospedeiros diferentes. No caso da *Leishmania* é o hospedeiro flebotomíneo, vetor da doença, e o hospedeiro mamífero. Esse parasita apresenta dois estágios em seu ciclo de vida: promastigota, forma flagelada e infectante; e amastigota, forma sem flagelo que se replica no interior das células do hospedeiro mamífero (SUNTER et al., 2017; LORÍA-CERVERA et al., 2020).

Após a transmissão da *Leishmania*, que ocorre através da picada de flebotomíneos fêmea no hospedeiro mamífero, os macrófagos irão fagocitar parasitas presentes na derme. No interior das células os parasitas irão adquirir a forma amastigota, onde se multiplicarão até romper a barreira celular e infectar novas células. Os flebotomíneos, ao picarem o mamífero infectado, capturam células infectadas com amastigotas, que no flebotomíneo se diferenciarão em promastigotas, e no estágio final promastigotas metacíclicas que migram para a probóscide podem ser transmitidas para um novo hospedeiro mamífero, concluindo seu ciclo de vida (Figura 1).

Figura 1 – Ciclo de vida da *Leishmania*



Fonte: HARHAY et al., 2011

Pesquisas realizadas em nosso laboratório nos últimos anos mostraram que camundongos C57BL/6 infectados por espécies diferentes de *Leishmania* induzem respostas imunes específicas no hospedeiro. Esses camundongos quando infectados por *L. amazonensis* apresentam lesões progressivas que não cicatrizam naturalmente. As lesões nos camundongos infectados por *L. major* curou-se espontaneamente entre as semanas 10 e 11. A cicatrização total das lesões por *L. braziliensis* ocorreu no período de 7 semanas (DE ALMEIDA et al., 2008). Através destes e outros dados, posteriormente discutidos, somos levados a crer que a infecção por *L. amazonensis*, comparada às outras espécies, evidencia mecanismo de evasão específico.

A *L. amazonensis* causa uma forma específica de leishmaniose tegumentar americana (LTA), conhecida como leishmaniose cutânea difusa (LCD). Essa forma da doença é caracterizada por apresentar lesões graves que evoluem com o decorrer do tempo (CASTES et al., 1993; AWASTHI et al., 2004).

Figura 2 – Distribuição da LCD no Brasil

Figura 2A – Boletim epidemiológico



Fonte: Departamento de Vigilância Epidemiológica
Brasília / DF – 2006

Figura 2B – Boletim epidemiológico



Fonte: Departamento de Vigilância Epidemiológica
Brasília / DF – 2017

Figura 2. Em 2006 os casos da LCD no Brasil eram predominantes nas regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste (2a). Em 2017, os casos da LCD aumentaram consideravelmente, havendo transmissão da doença em praticamente todo o território Brasileiro (2b).

Das estratégias de evasão que favorecem o estabelecimento da *L. amazonensis* no hospedeiro podemos citar: a dificuldade da célula na apresentação de antígeno, atraso ou inibição da ativação imune, apoptose prejudicada, ausência de citocinas coestimuladoras do processo de inflamação e nutrientes disponíveis para o crescimento do parasita (SAHA et al., 1995; SOONG et al., 1996; PODNOVSKAIA et al., 2015).

Estudo publicado por Figueiredo e colaboradores (2012), mostrou que ao infectar células dendríticas (DCs) com *L. braziliensis*, *L. major* e *L. amazonensis* ocorrem alterações na expressão das moléculas de superfície. A infecção, pelas três espécies testadas, apresentou redução na expressão do MHC II e CD86. A expressão de CD40 entretanto foi aumentada em DCs infectadas por *L. braziliensis* e *L. major*, ao passo que em *L. amazonensis* a expressão dessa molécula permaneceu inalterada. Esses dados indicam que CD40 é uma molécula fundamental que irá definir o rumo da infecção.

As DCs são responsáveis por induzir a proliferação dos linfócitos, isto é, sua ativação é muito importante para uma resposta imune eficaz, já os macrófagos, células derivadas de monócitos que fazem parte das respostas imunes inatas e adaptativas, são as principais células recrutadas para o local da infecção e possuem papel importante na defesa contra os parasitas nas primeiras horas do contágio. Essas células funcionam como células hospedeiras da *Leishmania*, apresentam antígeno ao Linfócito T CD4⁺ e atuam como células efetoras responsáveis pela morte do parasita (MAUEL, 1990).

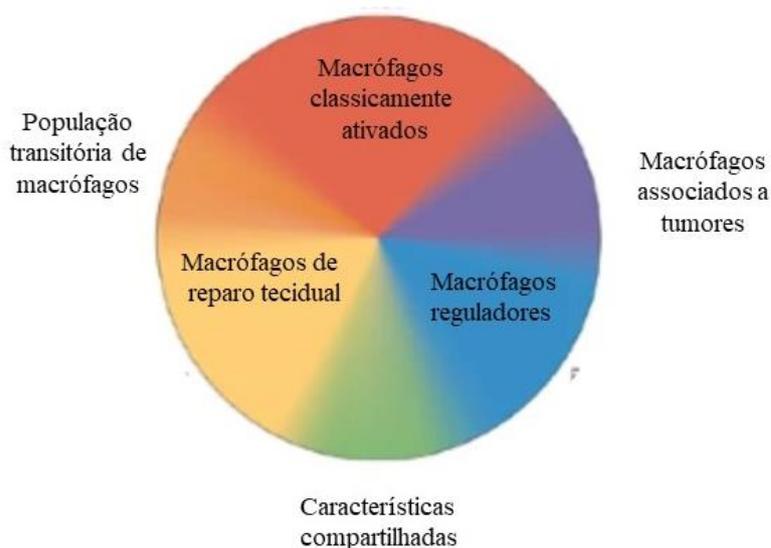
Por este motivo, é importante uma melhor explanação a respeito destas células e sua interação com o parasita. O entrosamento do parasita com o macrófago envolve fatores de virulência e imunidade do hospedeiro, e pode alterar suas funções a depender da espécie do parasita e do estágio da infecção (MCCONVILLE et al., 2012; OVALLE-BRACHO et al., 2015). Por exemplo, camundongos C57BL/6 são resistentes à infecção causada por *L. major*, mas estes camundongos são suscetíveis à infecção por *L. amazonensis* (AFONSO et al., 1993).

Das funções atribuídas aos macrófagos podemos citar: fagocitose de microrganismos e células necróticas, apresentação de antígeno, produção de superóxido, citotoxicidade tumoral, reconhecimento de células apoptóticas, produção de citocinas, reparo de tecidos lesionados, e outras tantas funções (ALBINA et al., 1989; GORDON., 2007).

São conhecidos pelo menos três tipos de populações principais de macrófagos. Os classicamente ativados são aqueles que apresentam atividade pró-inflamatória. Os macrófagos de reparo tecidual são ativados pela via alternativa e intermediam, através da produção de citocinas, o processo de inflamação, além de atuarem na cicatrização. Os macrófagos reguladores, como o próprio nome já diz, regulam as ações inflamatórias do sistema imune através da imunossupressão, que ocorre mediante a produção de citocinas anti-inflamatórias (MOSSER et al., 2008).

Apesar de serem atribuídos a esses macrófagos funções específicas, eles podem apresentar características de ativação que são compartilhadas dependendo das circunstâncias envolvidas (Figura 3).

Figura 3 - Características compartilhadas dos macrófagos

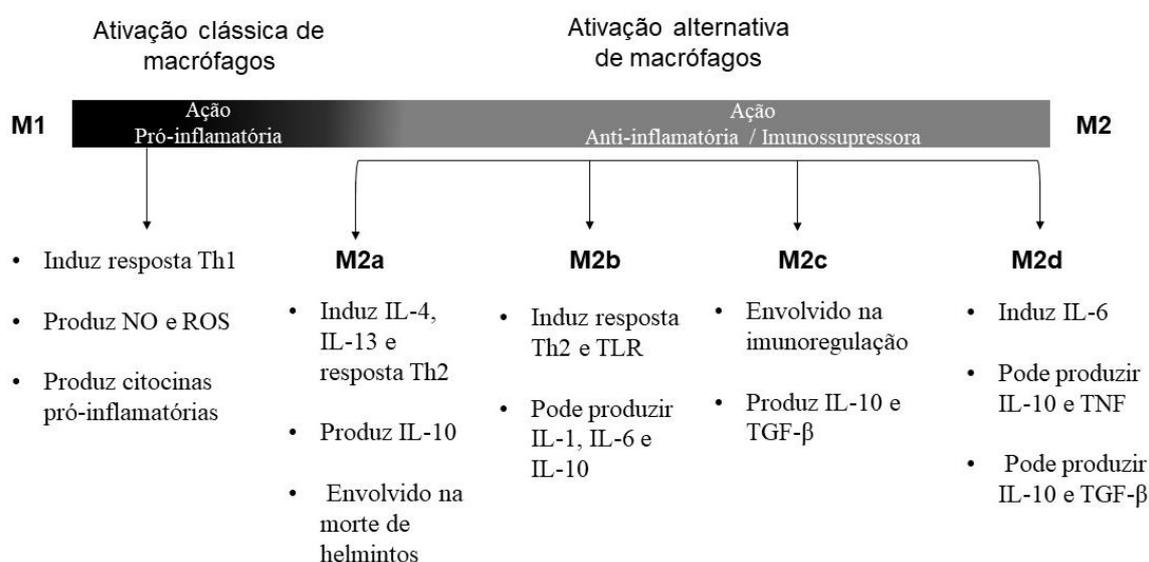


Adaptado: Mosser, 2008

Figura 3. As cores azul, amarela e vermelha representam as três populações principais de macrófagos. As cores derivadas das combinações primárias representam as demais características, podendo possuir algumas características que são compartilhadas ou representando populações de macrófagos que estão passando por transição.

Uma outra forma de categorizar os diversos tipos de macrófagos é através da nomenclatura M1 e M2. O fenótipo M1 apresenta atividade pró-inflamatória, com produção de TNF, NO, IL-12 e outras. O fenótipo do macrófago M2 é dividido em subconjuntos, M2a, M2b, M2c e M2d, que exercem funções variadas nas mais diversas respostas do sistema imunológico, porém possuem em comum a ativação alternativa e a produção de IL-10 (Figura 4) (WEAGEL et al., 2015).

Figura 4 - Caracterização de subpopulações de macrófagos (M1 e M2)



Adaptada: Weigel, 2015

Figura 4. Macrófagos M1 são ativados pela via clássica e possuem ação pró-inflamatória. Macrófagos M2 são ativados pela via alternativa, mas exercem funções diversificadas que variam de acordo com o tipo de subpopulação, por exemplo, os macrófagos M2c parecem estar envolvidos na imunossupressão, enquanto os macrófagos M2d parecem estar relacionados com atividades de reparo tecidual.

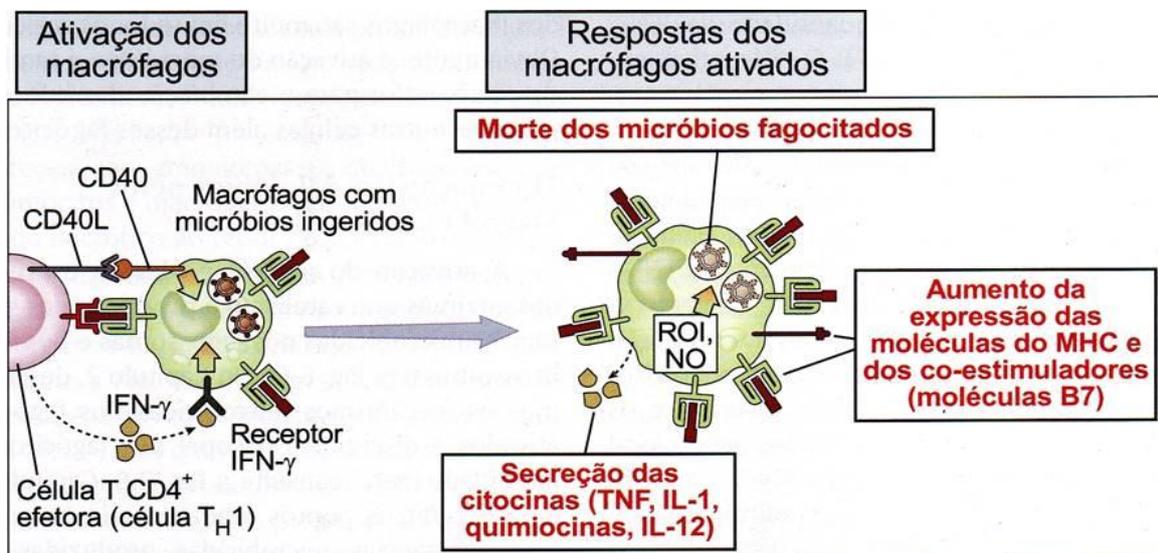
A ativação clássica dos macrófagos é induzida pelos linfócitos Th1, caracterizados principalmente pela produção do IFN- γ . Por meio dessa ativação o macrófago impele a síntese de NO, ROS e citocinas pró-inflamatórias como, IL-12, IL-1 e TNF- α (ANDRADE et al., 2003; CLASSEN et al., 2009). A alta produção de citocinas inflamatórias e maior expressão de moléculas coestimuladoras estimulam o aumento na destruição de patógenos intracelulares (MOSSER et al., 2008).

Linfócitos Th2 induzem à ativação alternativa dos macrófagos. A resposta com perfil Th2 amplia a produção de citocinas anti-inflamatórias pela célula, diminui a atividade fagocitária, reduz a expressão de citocinas inflamatórias, como a IL-12, e influencia na proliferação das células B (CLASSEN et al., 2009; CHIN et al., 2021).

Para a ativação dos macrófagos os receptores de superfície, presentes na membrana dos macrófagos, participam das cascatas de sinalização intracelular. Eles permitem a diferenciação, proliferação, adesão, migração, fagocitose e outras tantas funções (HU et al., 2008; CLASSEN et al., 2009; MARTINEZ 2011).

Na ativação clássica dos macrófagos a proteína coestimuladora chamada de CD40 é essencial. A interação CD40-CD40L estimula a expressão de moléculas do MHC, secreção de citocinas inflamatórias e ativação do próprio macrófago (Figura 5).

Figura 5 – Ativação clássica dos macrófagos



Fonte: **ABBAS, A.K.**; **LICHTMAN, A.H.**; **PILLAI, S.** *Imunologia* Celular e Molecular. 8ª Edição. Elsevier, 2015

Figura 5. Os macrófagos ao fagocitarem patógenos expressam em sua membrana o receptor CD40, que se liga ao linfócito TCD4⁺ através do ligante CD40L. A interação CD40-CD40L estimula os linfócitos a produzirem IFN-γ, responsável pela ativação clássica dos macrófagos, que aumenta a expressão de moléculas de superfície, induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias e estimula a produção de NO, destruindo o patógeno fagocitado.

A infecção por *Leishmania* tem a capacidade de mudar as vias de sinalização dos macrófagos para que ela consiga se replicar no fagossomo, sendo capaz de induzir alterações nas moléculas sinalizadoras, como os receptores TLR (Receptores Toll-Like) e CD40, prejudicando a ativação dos macrófagos (GHOSH et al., 2002; GIUDICE et al., 2012; MCCONVILLE et al., 2012).

Níveis elevados da interação CD40-CD40L ativam macrófagos, que passam a produzir IL-12. Baixos níveis da interação CD40-CD40L induzem a produção de IL-10 e impossibilitam a função inflamatória dos macrófagos (MATHUR et al., 2006). É a ativação do macrófago que vai regular a resposta imune e metabólica do hospedeiro e conduzir o destino da infecção (RUSSEL et al., 2019).

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi realizar uma revisão integrativa e sistemática da literatura, com o intuito de indagar sobre o papel de CD40 em doenças infecciosas com ênfase na infecção por *L. amazonensis* e em doenças não infecciosas, verificar dados da literatura que indicam possíveis interferências na expressão de CD40 e, por fim, propor um modelo de possíveis estratégias utilizadas pela *L. amazonensis* no momento da infecção para conseguir escapar das respostas imunes do hospedeiro e assim sobreviver no meio intracelular dos macrófagos.

2. METODOLOGIA

O presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão integrativa e sistemática da literatura, buscando compreender o papel da expressão de CD40 nos macrófagos durante a infecção por *L. amazonensis* e especular sobre possíveis mecanismos que o parasita pode utilizar para contornar a resposta imunológica e garantir o sucesso da infecção.

Os métodos utilizados na busca dos trabalhos científicos foram exemplificados na Figura 6.

Figura 6 – Etapas da metodologia

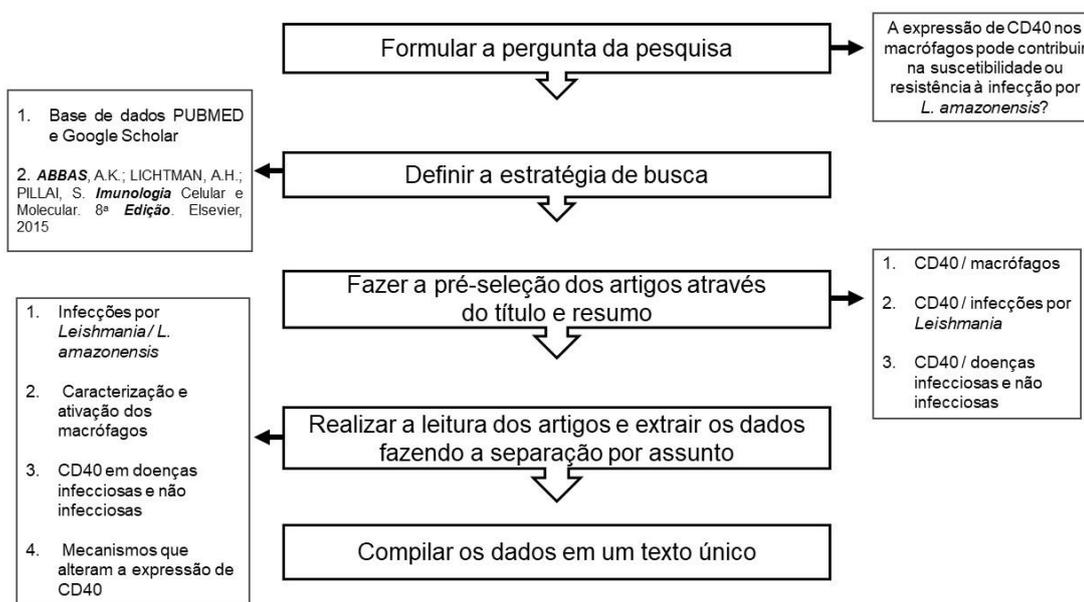


Figura 6. A procura dos artigos científicos se deu em inglês e incluiu principalmente o termo “CD40”. As bases de dados utilizadas na busca foram: PUBMED (Medline) e Google Scholar. O Livro acadêmico “*Abbas immunology 8ª edição*” foi utilizado como fonte secundária.

Os critérios de inclusão e exclusão para seleção de artigos estão descritos no quadro 1.

Quadro 1 – Critérios de inclusão e exclusão

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO
Artigos que apresentavam dados relevantes sobre a expressão de CD40	Artigos que apenas citavam o CD40 em dados secundários e não apresentavam informações concretas
Artigos publicados em qualquer idioma desde que em revistas indexadas	Dados de dissertações, teses, TCC e resumos não transformados em artigos
Qualquer período de publicação, desde que as informações estivessem de acordo com dados recentes	Artigos antigos que foram superados por dados recentes

Para a construção do texto científico e a formulação de um modelo hipotético foram selecionados 177 artigos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - EXPRESSÃO E INTERAÇÕES DE CD40

3.1.1 A expressão de CD40 na produção das citocinas e na ativação celular

A interação de CD40 com o CD40L leva à produção de citocinas, proteínas importantes na modulação da resposta imune e na ativação das funções celulares, dentre elas estão a IL-12 produzida pelos macrófagos e o IFN- γ produzido pelos linfócitos, juntos, induzem resposta protetora contra patógenos através de um mecanismo dependente de CD40 (DECHANET et al., 1997).

A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória que age no desenvolvimento de uma resposta Th1. A produção dessa citocina pelas DCs e macrófagos impulsiona a síntese de IFN- γ pelo linfócito T, que por sua vez, leva a ativação dos macrófagos (HEUFLER et al., 1996). A IL-12 também é relatada como uma citocina importante para a sustentação da expressão de CD40L em células T ativadas (LEE et al., 2002).

O IFN- γ é uma citocina mediadora da imunidade inata e adaptativa. Ele é produzido predominantemente por células NK (Natural Killer), linfócitos T CD4⁺ e linfócito T CD8⁺, quando estimuladas por antígenos (SCHOENBOR et al., 2007). Essa citocina está relacionada a regulação da resposta imune inflamatória, induzindo a ativação clássica dos macrófagos para que eles destruam patógenos intracelulares através da ação do NO (FERLIN et al., 1998; IMAIUZUMI et al., 1999). Os camundongos deficientes em IFN- γ se tornaram mais suscetíveis às infecções causadas por *Mycobacterium avium*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* devido a produção prejudicada de NO (FLORIDO et al., 1997; KOO et al., 2018; SASAI et al., 2018/2019; NASHLEANAS et al., 2000; AWASTHI et al., 2003).

Os macrófagos M1 ativam NOS2 ou iNOS para produzir NO a partir de L-arginina (DAVIS et al., 2013). Tal fato pode ser observado, por exemplo, em infecções por *Neospora caninum* (parasita que causa neosporose), onde a ausência de iNOS reduz a produção de citocinas inflamatórias como IL-12, TNF- α e IL-1 β , além de propiciar a produção de IL-10 (BARROS et al., 2019).

A IL-10 é uma citocina imunossupressora produzida por DCs, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, células NK, linfócitos B e linfócitos T. Por possuir função anti-inflamatória, sua presença prejudica o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz, como nas infecções causadas por *L. infantum* e *Mycobacterium tuberculosis*, onde observa-se correlação com a deficiência de CD40 nos macrófagos (FIRMINO-CRUZ et al., 2018; CHAUHAN et al., 2020; SANTOS et al., 2021; CHALLAGUNDLA et al., 2022).

3.1.2 O papel de CD40 na produção das citocinas de importância na infecção por *leishmania*

A revisão feita por Samant e colaboradores (2021) mostrou, que para que ocorra o controle da leishmaniose visceral, é necessário que haja a produção de IFN- γ , IL-2 e TNF- α por mecanismos dependentes de CD40, conquanto as citocinas IL-10, IL-6, IL-17 e TGF- β estão associadas à proliferação do parasita e ao desenvolvimento dos sinais clínicos da doença.

Camundongos nocaute (KO) para CD40 e CD40L, quando infectados por *L. major*, apresentaram eficácia no tratamento com a IL-12, sendo capazes de controlar a proliferação do parasita e o desenvolvimento da lesão, todavia após interromper o tratamento com a IL-12, nesses mesmos camundongos, a lesão foi reativada. Nesse caso, as produções de IL-12 e IFN- γ foram prejudicadas devido à ausência da interação CD40-CD40L, ou seja, o papel protetor das citocinas na infecção por *Leishmania* é dependente da interação CD40-CD40L. (WEINHEBER et al., 1998; OKWOR et al., 2015).

O IFN- γ atua induzindo a ativação dos macrófagos, que por sua vez produzem iNOS. Quando a via de iNOS é funcional verifica-se o controle da proliferação do parasita, mas se essa via for prejudicada por alguma razão, a função anti-leishmania também se torna ineficaz, favorecendo o desenvolvimento da doença (NASHLEANAS et al., 2000; AWASTHI et al., 2003; MIRZAEI et al., 2021).

Na ausência de IFN- γ , o TNF- α pode induzir a via de iNOS desde que ocorra a expressão de CD40. Tal fato foi observado nos macrófagos de camundongos IFN- γ $^{-/-}$ infectados por *L. donovani* e *L. major*. Esses camundongos reduziram a carga parasitária através da ativação de CD40, impulsionando a produção de TNF- α , que atuou como um substituto de IFN- γ na indução de NO (KAMIJO et al., 1993; MURRAY et al., 2003; NUNES et al., 2005). Vale destacar ainda que, a produção de NO é intensificada por macrófagos que são CD40 $^{+/+}$ e TNFr $^{-/-}$, mas não nos macrófagos que são TNFr $^{+/+}$ e CD40 $^{-/-}$ (KAMIJO et al., 1993; NASHLEANAS et al., 2000).

3.1.3 As interações de CD40 em doenças infecciosas

Foi demonstrado que CD40 exerce função dupla, onde as expressões mais elevadas aumentam a proteção do hospedeiro, enquanto as doses baixas diminuem a proteção através da indução de células T reguladoras (WAGNER et al., 1994; MARTIN et al., 2010).

Os sinais coestimuladores são necessários para a ativação completa das células de defesa. Quando os microrganismos são fagocitados as expressões de moléculas como CD40, CD80 e CD86 aumentam, sendo importantes para gerar resposta inflamatória. Diante disso, a interação de CD40-CD40L e as respostas imunes decorrentes têm sido frequentemente estudadas, porque sua importância já se mostrou clara em diversas doenças infecciosas provocadas por protozoários, bactérias, fungos e vírus (ADAMS et al., 1984; ANDRADE et al., 2003).

Interação de CD40 em infecções por *Leishmanias*

Os níveis na expressão de CD40 podem interferir na resposta imune à *Leishmania* de duas maneiras, a dizer: expressão de CD40 regulada negativamente, resultando em uma diminuição quantitativa na sinalização de CD40 e conseqüentemente na ativação dos macrófagos ou na sinalização de CD40 defeituosa, apesar de não ter a expressão alterada (KAYE et al., 1994; BRODSKYN et al., 2001; AWASTHI et al., 2003).

O bloqueio da ação de CD40, tanto do receptor quanto do ligante em linfócito T, CD40L, prejudica a resposta imune, pois interfere na ativação dos macrófagos, que dificulta a produção de citocinas pró-inflamatórias e favorece o crescimento do parasita. Um exemplo da importância dessa expressão nos macrófagos pode ser visto em infecções por *L. donovani* e *L. major*, onde as atividades dos macrófagos serão responsáveis pelo controle do parasita (KAYE et al., 1994; BRODSKYN et al., 2001; MURRAY et al., 2003).

Camundongos suscetíveis à infecção por *L. major* normalmente desenvolvem resposta Th2, com a indução de IL-10 e a progressão da doença. Esses mesmos camundongos são protegidos quando tratados com mAb CD40, que se liga e ativa a célula, conferindo a esses camundongos resistência ao parasita (CAMPBELL et al., 1996; FERLIN et al., 1998). Constatou-se resultados semelhantes em infecções por *L. infantum*, que induziram à produção de citocinas pró-inflamatórias e a morte do parasita quando as células foram estimuladas com o ligante de CD40, sendo capazes de controlar a infecção (OLIVEIRA et al., 2015).

Camundongos C57BL/6 que são CD40L^{-/-} quando infectados por *L. amazonensis* apresentam lesões ulcerativas progressivas. A suscetibilidade desse camundongo à infecção foi relacionada a ativação prejudicada das células T e dos macrófagos, uma vez que diminuíram a produção das citocinas inflamatórias. Esses camundongos, mesmo quando submetidos a imunização com antígenos, não foram capazes de gerar uma resposta protetora (SOONG et al. 1996).

A importância da expressão de CD40 também é vista em camundongos suscetíveis à infecção por *L. major* e *L. mexicana*. O estudo mostrou que o uso do mAb de CD40 resultou no aumento da produção de IL-12 e IFN- γ , controlando a proliferação dos parasitas. Fato oposto ocorreu ao utilizar o mAb anti-IL12 e o mAb anti-IFN- γ , neste caso a expressão de CD40 foi inibida, favorecendo o crescimento dos parasitas (FERLIN et al., 1998; WEINHEBER et al., 1998). Esses estudos validam a importância de CD40 para a ativação dos macrófagos, a produção de citocinas inflamatórias e o controle na proliferação do parasita.

Interações de CD40 em infecções por *Toxoplasma gondii*

Diferentes cepas do *Toxoplasma gondii* podem induzir altos ou baixos níveis de CD40 nos macrófagos. A alta expressão dessa molécula é essencial no controle da infecção, que ocorre principalmente mediante a produção de IFN- γ , principal indutor da ativação clássica dos macrófagos. No entanto, existe a possibilidade de acontecer a morte do parasita nos macrófagos sem que ocorra a produção de IFN- γ , mas que advém de um mecanismo dependente da expressão de CD40 e a produção de TNF- α , que pode envolver vias dependentes ou independentes de NO (REICHMANN et al., 2000; MORGADO et al., 2014).

Os resultados divulgados por Andrade e colaboradores (2005) mostraram que os macrófagos estimulados por CD40 exibiram atividade anti *T. gondii* que não foi inibida pelo mAb neutralizante anti IFN- γ , mas foi afetada pela neutralização de TNF- α . Esses dados sugerem que a expressão de CD40 em *T. gondii* é um importante ativador da sinalização de TNF- α que medeia o controle de patógenos intracelulares quando existe deficiência de IFN- γ .

Outro estudo mostrou que o CD40 expresso no macrófago provoca a morte do *Toxoplasma gondii* por autofagia, e por meio da interação CD40-CD40L, gerando resposta inflamatória (SUBAUSTE et al, 2021). As cepas que regulam negativamente a expressão de CD40 contribuem na sobrevivência do parasita por interferirem na ativação das células e na produção de citocinas pró-inflamatórias pelo Linfócito T (ZHU et al., 2019). Dados complementares relatam que, a indução da atividade toxoplásmica nos macrófagos, através dos estímulos de CD40, acompanha a redução da carga parasitária *in vivo* (SUBAUSTE et al., 2006).

Observou-se que o CD40 expresso em altos níveis nos macrófagos seguido da interação com o ligante CD40L, propiciou a produção de IFN- γ pelo linfócito, diminuindo a formação de cistos em células neurais (DOHERTY et al., 2022). Esses achados indicam que o CD40 desencadeia processos importantes no controle da proliferação do parasita no meio intracelular e na propagação para outros tecidos, destaca-se que tal reação depende da presença de leucócitos.

Interações de CD40 em infecções por *Trypanosoma cruzi*

Em *T. cruzi*, o papel de CD40 é auxiliar no controle da infecção. Esse controle é devido a cascata envolvendo a IL-12 e o TNF- α , que intermedia a produção de IFN- γ e estimula a síntese de NO (CHAUSSABEL et al., 1999).

Antígenos derivados de *T. cruzi* modulam a expressão de moléculas coestimuladoras em monócitos e DCs. Essas células, estimuladas com LPS, mas na presença do parasita, regulam negativamente a expressão de CD40, levando à redução na proliferação de células TCD4⁺ e o aumento nos níveis de IL-10 (GOMÉZ et al., 2019; BRODSKYN et al., 2002).

Apesar de CD40 ser importante no controle do parasita, foi demonstrado *in vivo* que a interação CD40-CD40L aumenta a produção de IL-6 (citocina inflamatória), no miocárdio de camundongos infectados, indicando que as células musculares cardíacas portadoras de CD40 podem interagir com linfócitos que expressam CD40L, infiltrando o coração e contribuindo para a lesão inflamatória na cardiomiopatia chagásica (MORENO et al., 2016).

Interações de CD40 em infecções bacterianas

O papel de CD40 foi demonstrado em diversas infecções bacterianas, como por exemplo: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* e *Streptococcus pneumoniae*, em todos os casos a interação CD40-CD40L foi importante para a contenção dos microrganismos. O CD40 vai coordenar as atividades dos LT, induzir a produção de IL-12 pelos macrófagos e estimular a síntese de NO e ROS. A ausência de NO oportuniza o desenvolvimento da doença (HAYASHI et al., 1999; MOENS et al., 2008; CHAUHAN et al., 2020).

No caso de *M. tuberculosis*, a resposta protetora do hospedeiro é enfraquecida pelo TGF- β e IL-10, citocinas produzidas pelos macrófagos. As funções efetoras, destas, são contrárias aos efeitos que ocorrem após a interação CD40-CD40L, portanto o destino da infecção pode estar relacionado à expressão dessas moléculas (CHAUHAN et al., 2020).

Outras espécies como: *Aeromonas hydrophila*, *Chlamydia muridarum*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella Dublin* ao infectar APCs induzem a expressão de CD40 e promovem proteção ao hospedeiro (MARRIOT et al., 1999; CHEN et al., 2009; NISHAT et al., 2018; SU et al., 2021; XIA et al., 2021).

Em infecções causadas por *S. agalactiae*, o CD40 é expresso em altos níveis após 24h, representando um potencial alvo terapêutico (XIA et al., 2021). No caso de *S. aureus* a modulação da resposta imune ocorre principalmente por CD40 expresso em DCs (NISHAT et al., 2018).

A infecção por *A. hydrophila* inibiu a proliferação de células B e aumentou a infecção em peixes devido à perda do ligante de CD40 (SU et al., 2021).

Em infecções causadas por *C. muridarum* os camundongos deficientes em CD40L ou CD40 apresentaram lesões prolongadas. As patologias inflamatórias foram mais graves em camundongos CD40 KO do que nos camundongos deficientes em CD28 e CD86 (CHEN et al., 2009).

A suscetibilidade dos camundongos à infecção por *S. dublin* é definida pela interação de CD40. Os camundongos que expressavam CD40L foram menos suscetíveis a esta infecção do que camundongos deficientes em CD40L (MARRIOT et al., 1999).

Interações de CD40 em infecções por vírus

Foi discutido recentemente que o CD40 expresso nos macrófagos peritoneais delimita a infecção precoce de uma vasta quantidade de vírus de RNA, entre eles, o vírus da influenza, conhecido também como vírus da gripe (HASHEM et al., 2014; ROGERS et al., 2021; PAULIKAT et al., 2022). A replicação limitada destes vírus nos macrófagos exigiu interações CD40-CD40L, responsáveis por estimular a produção de IL-12, IFN- γ e induzir resposta Th1 (ROGERS et al., 2021).

Em infecções pelo vírus Epstein-Barr (EBV), a expressão de CD40 foi associada aos sinais de apoptose das células T e NK. O bloqueio da sinalização CD40-CD40L potencializou a apoptose celular, diferente do que foi visto em

outras infecções. No caso de infecções por EBV a sinalização de CD40-CD40L parece promover a sobrevivência das células infectadas, apresentando indícios de que a interação CD40-CD40L está relacionada à proliferação excessiva dos linfócitos (IMADOME et al., 2005).

Na infecção por SARS-CoV-2, apesar de existir um pequeno aumento na expressão de CD40 em células imunes inatas, nenhuma das células infectadas produzem citocinas pró-inflamatórias, sendo estas células uma fonte improvável que induzem a produção de citocinas durante a infecção (NILES et al., 2021).

Em pacientes portadores do HIV (Vírus da imunodeficiência humana), o aumento na expressão de CD40L parece relacionar-se com o desenvolvimento da condição conhecida como hipergamaglobulinemia (aumento de anticorpos no organismo). Recentemente foi publicado que uma vacina experimental contra o HIV, utilizando anticorpo neutralizador de CD40 (anti-CD40), promoveu maior quantidade de plasmócitos que produzem imunoglobulinas IgG, o que sugere potencialização da resposta imune (MULLER et al., 1998; GODOT et al., 2020). O protocolo de uma vacina para prevenção à infecção pelo HIV ainda é indefinido, mas os dados relacionados com o papel de CD40 podem indicar um caminho na produção de vacinas e medicamentos eficazes.

Interações de CD40 em infecções por fungos

Infecções por fungos, como o *Cryptococcus neoformans*, induzem a produção de IL-12 tardia através da expressão prejudicada de CD40. A importância da interação CD40-CD40L foi demonstrada em estudos utilizando camundongos CD40L^{-/-}, que se correlacionaram com a baixa atividade antimicrobiana dos macrófagos (PIETRELLA et al., 2004).

O CD40 também está associado à restrição do crescimento desse fungo no pulmão, limitando a propagação sistêmica e a infecção ao sistema nervoso central. Apesar da expressão de CD40 ser muito importante para controlar o crescimento progressivo de fungos em infecção pulmonar criptocócica persistente, o CD40 também contribui para algumas características imunopatológicas, incluindo a produção de muco nas vias aéreas (CHEN et al., 2010).

3.1.4 As interações de CD40 em doenças não infecciosas

O CD40 expresso em APCs e o ligante CD40L no LT, tem sido alvo de uma vasta gama de estudos que buscam compreender os mecanismos envolvidos em doenças autoimunes, transplantes e em diferentes tipos de câncer, os quais foram capazes de desenvolver eficácia antitumoral através do uso de agonistas de CD40 (DJUREINOVIC et al., 2021).

A expressão aumentada de CD40 se correlaciona com a resposta antitumoral e uma melhora na sobrevida de pacientes com melanoma maligno (YAN et al., 2021). O CD40 também é importante na resposta antitumoral em linhagens de células de carcinoma epitelial de ovário (MELICHAR et al., 2007), câncer de bexiga (COOKE et al., 1999), câncer de pulmão (SABEL et al., 2000), entre outros (TONG et al., 2001; AMINI et al., 2020).

Em doenças autoimunes como, Esclerose Múltipla (EM) e Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), a interação CD40-CD40L é responsável por estimular respostas inflamatórias que passam despercebidas. O bloqueio dessa interação reduz a inflamação exacerbada. Por isso, essas moléculas podem representar alvos terapêuticos (AARTES et al., 2017; SMETS et al., 2018; RAMANUJAM et al., 2020).

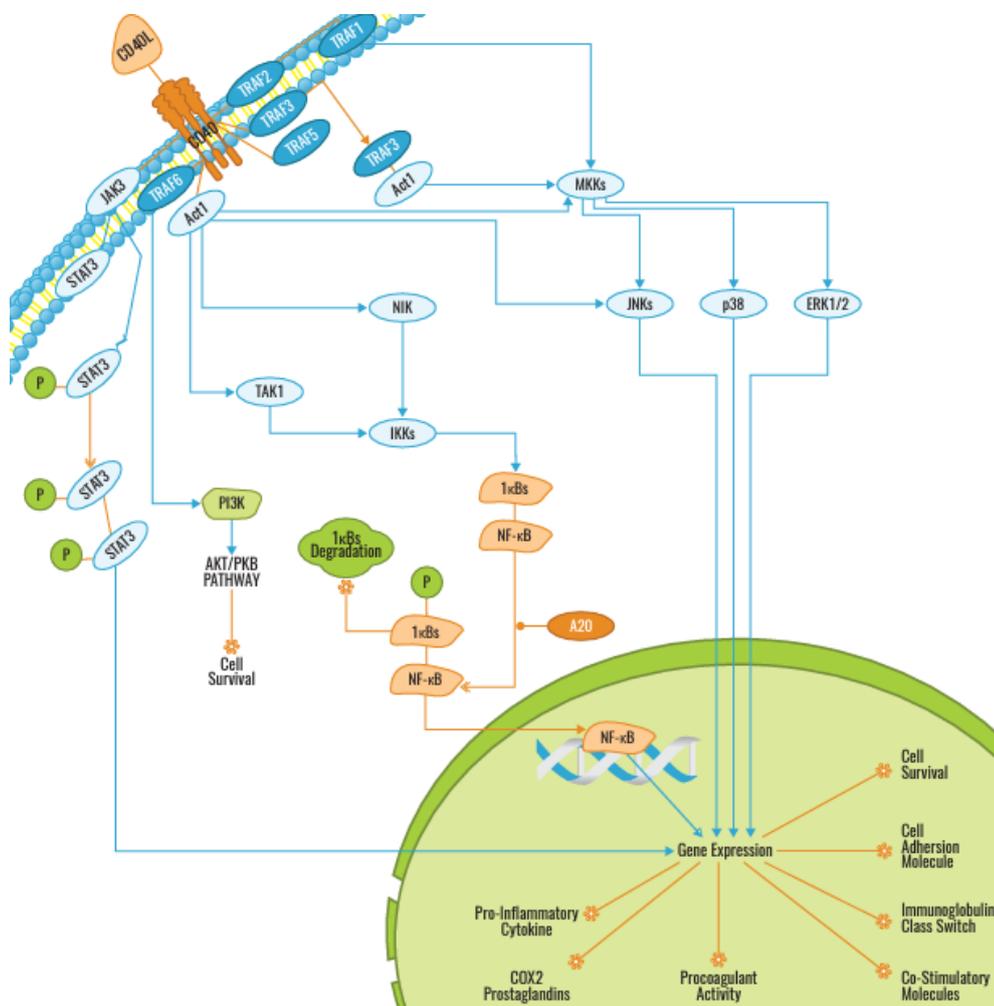
3.2 - VIAS DE SINALIZAÇÃO INDUZIDAS POR CD40

A sinalização celular faz parte de um sistema de comunicação que coordena as atividades celulares. A compreensão das vias de sinalização pode contribuir na terapia dos mais diversos tipos de doenças e distúrbios.

A transdução de sinal mediada por CD40 induz a transcrição de uma variedade de genes envolvidos na defesa do hospedeiro contra patógenos. Esses sinais também estimulam a ativação das quinases, produção de anticorpo, produção de citocinas e regulação da expressão de moléculas de superfície, que ocorre através de várias vias, incluindo NF- κ B (Fator Nuclear-Kappa B), MAPK (Proteína Quinase Ativada por Mitogênio) e STAT3 (Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição-3) (Figura 7) (PYPE et al., 2000; BISHOP et al., 2007).

Como CD40 pertence à família de receptores do TNF, a sinalização de CD40 envolve o recrutamento de TRAFs (Fatores Associados ao Receptor de TNF) ao seu respectivo domínio citoplasmático nas etapas iniciais da cascata de sinalização. O domínio citoplasmático de CD40 consiste em 62 aminoácidos nas posições 196–257 e está associado a TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5 e TRAF6 (HU et al., 1994; BROWN et al., 2001).

Figura 7 – Vias de sinalização induzidas por CD40



Fonte. Bosterbio.br

O TRAF1 não se liga diretamente ao CD40, mas pode ser recrutado para microdomínios de membrana por meio de heterodimerização com o TRAF2 (BISHOP et al., 2002).

O TRAF2 é necessário para a ativação das vias SAPK (Stress-Activated Protein Kinase) e também desempenha um papel na regulação positiva de moléculas de superfície, secreção de IgM nas células B e regulação positiva do gene ICAM1 (Molécula de adesão intercelular-1) (BROWN et al., 2001).

O TRAF5 também é indiretamente recrutado para o CD40 de maneira dependente do TRAF3 (PYPE et al., 2000).

O TRAF3 inicia vias de sinalização que ativam p38 e JNK (quinase c-jun NH2-terminal), mas inibe a ativação de NF- κ B dependente de Act1 (NF-Kappa B activator-1). Ele também age como um adaptador que liga proteínas TRAF a TAK1 (Fator de Crescimento Transformador-Beta Ativada Kinase-1) e NIK (Quinase indutora de NF- κ B). O Act1 se liga ao MKK (Complexo de Proteína Quinase Quinase Ativada por Mitogênio) para ativar JNK, p38 MAPK e ERK1/2 (KASHIWADA et al., 1998; BROWN et al., 2001; QIAN et al., 2002).

TRAF3 parece ter um papel neutro na transdução da sinalização de CD40, sendo mais importante na transdução do sinal de LMP-1 (HE et al., 2007). Os outros TRAFs, TRAF2, TRAF5 e TRAF6, são necessários para a ativação de NF- κ B.

3.2.1 Vias de sinalização induzidas por CD40 em doenças infecciosas e não infecciosas

Os dados da literatura mostram que nas mais diversas infecções a força da sinalização de CD40 determina a ativação da via p38MAPK ou ERK1/2. A ativação dessas duas vias pode definir o rumo da infecção através do perfil de citocinas que serão produzidas. Os sinais fracos de CD40 induzem a síntese de IL-10 dependente da quinase ERK1/2, enquanto os sinais fortes de CD40 ativam a via p38MAPK que induz a síntese de IL-12 (RINCÓN et al., 2000; AWASTHI et al., 2003; MATHUR et al., 2004; MORGADO et al., 2014).

Em infecção por *T. gondii* o baixo envolvimento de CD40 induziu resposta imune com perfil Th2 devido a ativação de ERK aumentada, que conseqüentemente levou a expressão de IL-10 (MORGADO et al., 2014). Resultados semelhantes também foram vistos em infecções por *Polyomavirus*, *Zika vírus* e *Chlamydia trachomatis* (SU et al., 2004; DUSHANE et al., 2018; VALENCIA et al., 2022).

Em doenças não infecciosas a ativação da via ERK1/2 induzida por CD40 possui um papel importante no desenvolvimento da patogênese da asma, e no desenvolvimento da fibrose miocárdica. No caso desse último o agravamento da doença é devido a produção da IL-17, intermediada por ERK (ALAM et al., 2011; LIU et al., 2012).

3.2.2 Vias de sinalização induzida por CD40 em infecções por *Leishmania*

Em infecções por espécies de *Leishmania* diversos trabalhos mostraram que o parasita pode regular negativamente a fosforilação de p38MAPK induzida por CD40 e impulsionar a ativação da via ERK 1/2 prejudicando a expressão de IL-12 e INOS2, resultando no desenvolvimento da infecção (AWASTHI et al., 2003; MATHUR et al., 2004; SUBAUSTE, 2009; BHARDWAJ et al., 2010).

As implicações da infecção por *L. infantum* nas formas fosforiladas de MAPKS (ERK1/2, SAPK/JNK e p38MAPK) foram investigadas. Os resultados mostraram que a infecção por *L. infantum* causou rápida ativação de ERK1/2, enquanto que as vias SAPK/JNK e p38 não foram moduladas pelo parasita no momento da infecção (NEVES et al., 2010).

A infecção por *L. amazonensis* leva à ativação de ERK1/2, redirecionando a expressão de genes específicos, no caso, CD40 e IL-12 p40, interferindo na maturação adequada da célula e promovendo a sobrevivência do parasita por mais tempo (BOGGIATO et al., 2009).

As *Leishmanias*, ao adentrarem as células podem alterar a cascata de sinalização de GTPases, e a intensidade destas é capaz de ativar isoformas específicas de Ras.

As Ras são GTPases celulares responsáveis por regular diversos processos celulares. Um sinal fraco de CD40 ativa N-Ras, enquanto um sinal forte, ativa H-Ras e K-Ras. Ao suprimir N-Ras a ativação de ERK 1/2 regulada por sinal extracelular de CD40 reduziu, assim como a produção de IL- A supressão de H-Ras ou K-Ras reduziu a ativação da via p38MAPK e a produção de IL-12 (Figura 8) (NAIR et al., 2020).

Figura 8 – via de sinalização induzida por CD40 em infecção por *Leishmania* (Hipótese)

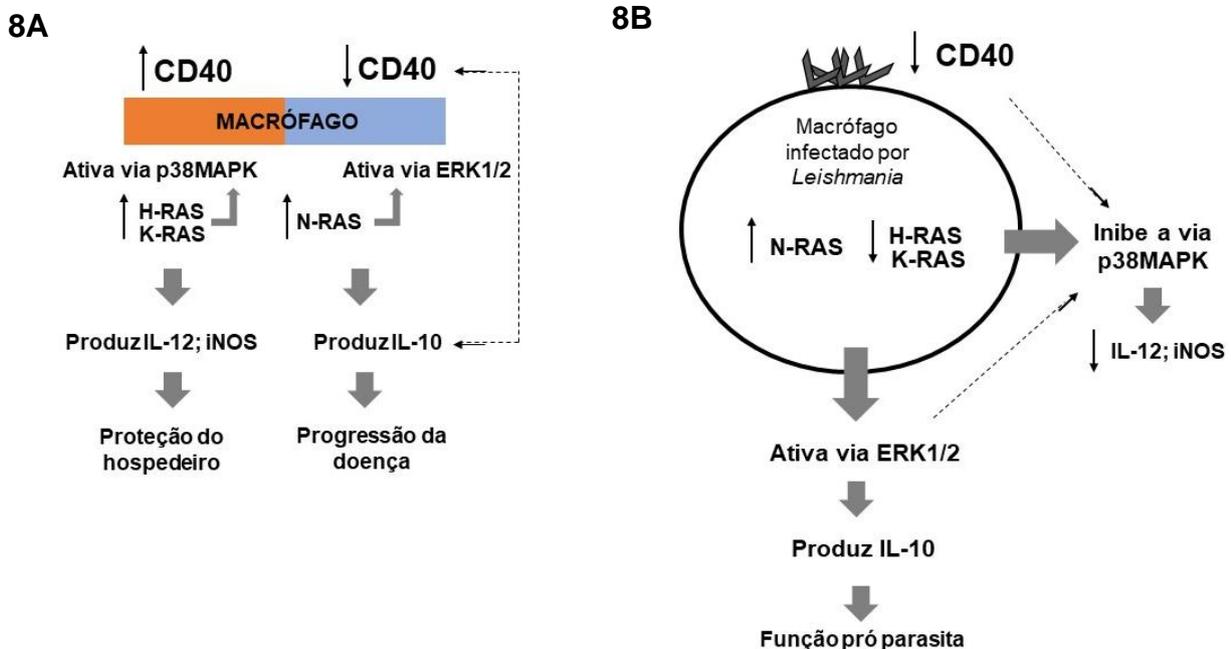


Figura 8. 8A: A força da sinalização do CD40 induz a ativação da via de sinalização. A elevada expressão do CD40 induz a ativação da via p38MAPK, aumenta a expressão de H-RAS e K-RAS e contribui na proteção do hospedeiro. A baixa sinalização do CD40 ativa a via ERK1/2, aumenta a expressão de N-RAS e induz a progressão da doença. **8B:** Para gerar uma resposta protetora contra *Leishmania* é necessário a ativação de p38MAPK. No entanto, esse parasita no meio intracelular induz a ativação da via ERK1/2 com alta expressão de N-RAS e baixa expressão de H-RAS e K-RAS. A ativação de ERK1/2 promove a produção de IL-10, favorável a permanência do parasita na célula

Em infecções causadas por *L. donovani* houve acréscimo na expressão de N-RAS, aumentando a fosforilação de ERK 1/2, que simultaneamente diminuiu a expressão de K-RAS e H-RAS, inibindo a fosforilação de p38MAPK. Ao utilizar um inibidor de RAS a fosforilação de ERK 1/2 foi reduzida levando a ativação de p38MAPK e um aumento da IL-12 (HUSEIN et al., 2018).

Os camundongos resistentes à infecção por *L. major* tornam-se suscetíveis devido à superexpressão de N-RAS, enquanto que a elevada expressão de H-RAS ou K-RAS reduziu a infecção nos camundongos vulneráveis (IBORRA et al., 2011). O silenciamento de N-RAS controlou a infecção através da ativação de p38MPAK induzida por CD40. A consequência foi a produção da IL-12, em contrapartida, o silenciamento de K-RAS e H-RAS diminuiu a expressão de CD40 durante a infecção por *L. major* em camundongos que normalmente são resistentes à infecção, promovendo o desenvolvimento da doença (SUBAUSTE, 2009; CHAKRABORTY et al., 2015).

A expressão de RAS é apenas um adicional à suscetibilidade ou resistência a infecção por *L. major*, uma vez que camundongos deficientes em RAS conseguem montar uma resposta imune independente de isoformas RAS (JHA et al., 2020).

3.3 - MECANISMOS QUE PODEM INFLUENCIAR NA EXPRESSÃO DE CD40

3.3.1 Receptores Toll-Like associados a expressão de CD40

Os receptores do tipo Toll-Like (TLR) são moléculas responsáveis por reconhecer patógenos e uma variedade de ligantes endógenos e exógenos. Das funções atribuídas a esses receptores podemos citar: reconhecimento inato de antígenos, indução das respostas adaptativas, maturação de APCs e ativação das células T. Alguns estudos mostram que esses receptores por ativar e coordenar etapas das reações inflamatórias, podem contribuir na expressão de moléculas de superfície (IWASAKI et al., 2004; CHANDEL et al., 2014).

Existem diversos subtipos de TLRs identificados que reconhecem diferentes antígenos, direcionando a sinalização celular e induzindo a produção de citocinas, quimiocinas e NO (MUXEL et al., 2018). Os TLRs demonstram ter influência no controle das respostas imunes adaptativas, incluindo a regulação positiva na expressão de moléculas coestimuladoras em DCs e monócitos, como CD40, CD80 e CD86 (GHOSH et al., 1998; LAI et al., 2008; VALINS et al., 2010).

Foi verificado que os agonistas do TLR2, TLR6 (MALP – derivado de *Mycoplasma fermentans*) e TLR4 (LPS – derivado de *Salmonella minnesota*) induziram cerca de 35% a expressão de CD40 em DCs. Os agonistas do TLR7 e TLR8 (3M-003 – derivado de imidazoquinolina) induziram efetivamente cerca de 80% de positividade na expressão de CD40 em DCs. A produção de IL-12 nos monócitos também foi aumentada devido a indução dos agonistas do TLR7 e TLR8 (LEVY et al., 2006).

TLRs associados a expressão de CD40 em infecções por *Leishmania*

Em infecções causadas por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* há aumento na expressão do TLR2. A quantidade de células que expressam esses receptores também aumentaram (WEINKOPFF et al., 2013; SACRAMENTO et al., 2015). A expressão do TLR2 também foi aumentada em infecções causadas por *L. amazonensis*, o que facilitou a internalização do parasita (TAVARES et al., 2014). O intrigante é que apesar do TLR2 levar a um ambiente inflamatório, sua expressão não previne o aparecimento da doença (CAMPOS et al., 2018; POLARI et al., 2019).

A expressão dos TLR3, TLR 7/8 e TLR 9 foi examinada após a estimulação de CD40 nos macrófagos infectados por *L. major* e nos macrófagos não infectados. Os resultados obtidos mostraram que apenas a expressão do TLR9 foi aumentada nos macrófagos estimulados. Observou-se também que TLR9 diminuiu a fosforilação de ERK1/2 nos macrófagos infectados com *L. major* em comparação com macrófagos não infectados (CHANDEL et al., 2014).

Em infecções por *L. major* os macrófagos deficientes em TLR9 tiveram expressão de CD40 reduzida e menor produção de IL-12 e TNF- α (PANDEY et al., 2015). Em infecções por *L. amazonensis* a expressão do TLR9 é

predominante comparado a outros TLRs. Camundongos com ausência do TLR9 mostraram aumento significativo no tamanho da lesão e da carga parasitária, indicando que esses camundongos são mais suscetíveis à infecção (CAMPOS et al., 2018; PRATTI et al., 2019). Não foram encontrados estudos que relacionem a expressão do TLR9 com a indução de CD40 em APCs infectadas por *L. amazonensis*.

3.3.2 A sinalização purinérgica na ativação dos macrófagos

No processo de ativação dos macrófagos ocorre a produção de ATP através da fosforilação oxidativa. A função do ATP intracelular é impulsionar processos fisiológicos que exigem energia. O ATP extracelular (ATPe), no entanto, age como um poderoso sinal de perigo, sendo liberado pelas células que estão sob estresse, além de auxiliar no estabelecimento da resposta inflamatória (DUGO et al., 2017).

Os Macrófagos ativados por IFN- γ aumentam a quantidade de ATPe, exibem elevada expressão de iNOS, citocinas pró-inflamatórias e TNF- α . Os Macrófagos não ativados pela mesma via convertem o ATPe em adenosina, induzindo a produção de citocinas anti-inflamatórias e menor sensibilidade à morte celular (HASKO et al., 2004).

O ATPe inicia suas funções através da ativação dos receptores purinérgicos conhecidos como receptores P2, que se dividem em P2X, associados a canais iônicos, e P2Y receptores acoplados a proteína G. Foram descritos sete receptores P2X (P2X₁₋₇) e todos eles respondem ao ATP. O receptor P2X₇, especialmente, além de sinalizar a presença de ATPe é capaz de mediar a secreção dessa molécula. Os receptores P2Y são divididos de acordo com sua especificidade como: P2Y₁ e P2Y₁₁ são específicos para purinas, P2Y₄ e P2Y₆ são específicos para pirimidinas, P2Y₁₂ e P2Y₁₃ responde apenas ao ADP. (DI VIRGILIO et al., 2001; BOURS et al., 2006; LÉVESQUE et al., 2010).

A ativação desses receptores purinérgicos representam vias de ativação dos macrófagos M1, tornando-os mais suscetíveis à morte celular e a resposta inflamatória que controla a proliferação de patógenos intracelulares (PRAETORIUS et al., 2009; ZANIN et al., 2012; SAKAKI et al., 2013).

A regulação do ATPe, a fim de evitar danos teciduais originados pelo excesso da resposta inflamatória, é regulada pela ação de enzimas metabolizadoras de nucleotídeos, conhecidas como ectonucleotidases, dando origem a adenosina (ADO), que exerce função imunossupressora no controle da resposta imune (HASKO et al., 2004; BOURS et al., 2006).

As atividades conjuntas das enzimas CD39 e CD73 (nos mamíferos) hidrolisam ATPe em ADO. As E-NTPDases CD39 podem modificar rapidamente ATPe em AMP, enquanto a 5'- nucleotidase (5'- NT) CD73 transforma AMP em ADO. A adenosina ao atuar nos receptores purinérgico para adenosina neutraliza os efeitos inflamatórios do ATP. Esses receptores são nomeados A1, A2a, A2b e A3. O receptor A2a leva a uma regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias e o receptor A2b leva a regulação positiva de citocinas anti-inflamatórias, além de outras funções. Já os receptores A1 e A3 parecem regular a ação dos receptores A2 (FREDHOLM et al., 2001; LIMA et al., 2017; BASU et al., 2020; SILVA et al., 2020).

Os receptores A2a seguido pelo receptor A2b possuem maior afinidade para ADO, os receptores A1 e A3 possuem menor afinidade, por isso são ativos somente na presença de altas concentrações de ADO (ABBRACCHIO et al., 2007).

Figura 9 – Efeitos da Sinalização Purinérgica no sistema imune

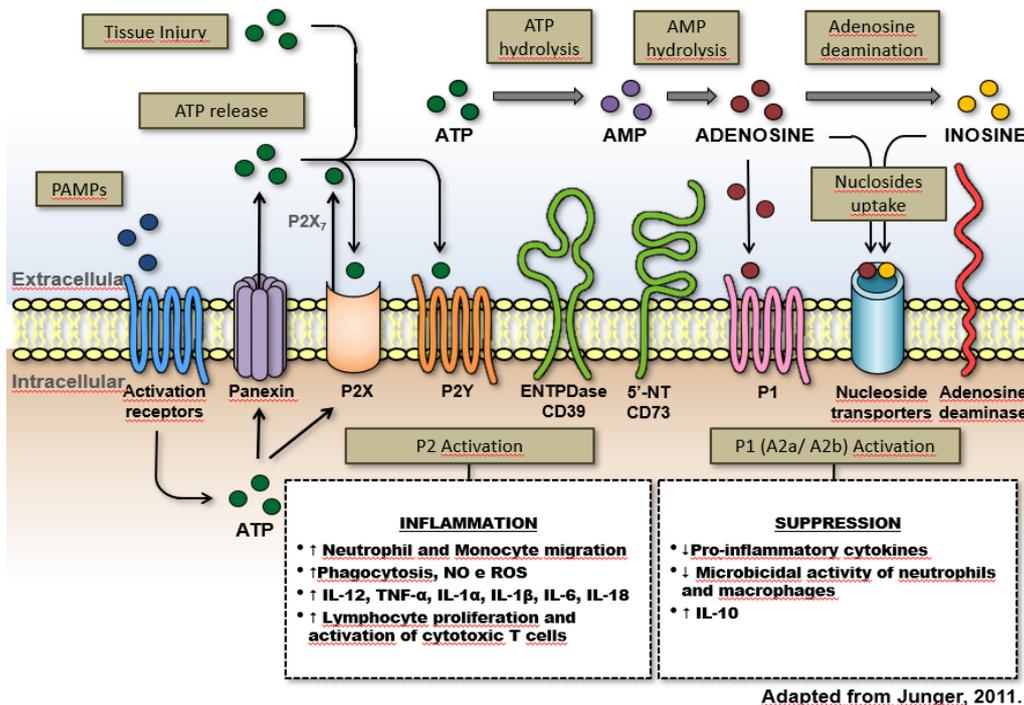


Figura 9. Os receptores são ativados através de estímulos à célula, acarretando na abertura dos canais de panexina, que leva o ATP para o meio extracelular. O ATPe irá ativar os receptores P2X e P2Y, iniciando o processo de inflamação. A E-NTPDase CD39 remove dois grupos fosfato, quebrando ATP em AMP, enquanto 5'-NT CD73 remove o último grupo fosfato, transformando AMP em adenosina. A Adenosina no meio extracelular ativa receptores P1 (A2a e A2b), dando início ao processo de imunossupressão. Por fim, a adenosina deaminase remove um grupo amina, transformando adenosina em inosina, que é enviada para dentro da célula.

O aumento na expressão das E-NTPDases e 5'-NT iniciam uma redução gradual nas concentrações de nucleotídeos e aumento na disponibilidade de adenosina. As mudanças nas atividades dessas enzimas podem fazer com que os macrófagos modulem o resultado da cascata purinérgica extracelular para ajustar suas funções durante o processo inflamatório (ZANIN et al., 2012).

A ativação celular quando ocorre em um ambiente rico em CD39 e CD73, portanto rico em adenosina, faz com que funções efetoras das células sejam insuficientes para eliminar patógenos devido à baixa resposta pró-inflamatória (SAMIUL et al., 2015).

CD40 como indutor do ATP extracelular

O ATP é liberado para o meio extracelular de várias maneiras, a título de exemplo: dano ou morte celular, estimulação mecânica, hipóxia e invasão de patógenos (BURNSTOCK et al., 2014). Logo, CD40 como indutor da resposta inflamatória, também é apresentado como um estímulo a liberação de ATP, sendo identificado como um indutor da sinalização purinérgica (STEINBERG et al., 1991; SUBAUSTE, 2017; JAKOVIJEVIC et al., 2019).

Uma recente revisão feita por Chaves e colaboradores (2021) mostrou que o receptor P_2X_7 serve como um segundo sinal para a ativação completa do inflamassoma NLRP3. A montagem do inflamassoma NLRP3 é fundamental para dar continuidade às respostas inflamatórias através da ativação de APCs. Esse receptor mostra-se importante na modulação das respostas imunes adaptativas em diversas doenças infecciosas, uma vez que o receptor P_2X_7 está associado a ativação de mecanismos inflamatórios do hospedeiro, promovendo a produção de ROS e NO, induzindo acidificação nos vacúolos parasitóforos e proporcionando a liberação de citocinas e quimiocinas (SAVIO et al., 2019).

A associação dos receptores P_2X_7 e a expressão de CD40 é mostrada em células de camundongos diabéticos e em animais portadores de encefalomielite autoimune e esclerose múltipla. Em todos os casos a expressão de CD40 conduz a ativação do receptor P_2X_7 e a produção de citocinas pró-inflamatórias (VOGEL et al., 2013; PORTILLO et al., 2017; AARTS et al., 2017).

Dados da literatura revelaram que a infecção por *L. amazonensis* regula positivamente o receptor P_2X_7 , levando a liberação de ATP para o meio extracelular (CHAVES et al., 2019; MARQUES et al., 2011). O intrigante é que mesmo regulando positivamente o receptor P_2X_7 a infecção por *L. amazonensis* não gera uma resposta inflamatória, indicando que a razão para a ausência de uma resposta pró-inflamatória durante a infecção está relacionada à modulação que ocorre após a ativação do receptor purinérgico P_2X_7 .

O papel das nucleotidases e adenosina na suscetibilidade à infecção por *L. amazonensis*

Existem algumas famílias de E-NTPDases que irão hidrolisar ATP em ADP, AMP e ADO (BOURS et al., 2011; DI VIRGILIO et al., 2017; BASU et al., 2020). As atividades da E-NTPDase (CD39) e 5'-NT (CD73) são importantes para a sobrevivência da *L. amazonensis* e *L. donovani* dentro dos macrófagos. Essas enzimas induzem a produção de ADO extracelular, que se ligam aos receptores de ADO e reduzem os níveis de IL-12 e TNF- α , produzidos pelos macrófagos, inibindo a produção de NO e favorecendo a infecção. À vista disso, ao inibir a atividade de ADO a sobrevivência do parasita dentro dos macrófagos é diminuída (GOMES et al., 2015; BASU et al., 2020; BAJRACHARYA et al., 2022).

Os estudos de Figueiredo e colaboradores (2012) mostraram que em infecções por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major* houve aumento na expressão de CD39 e CD73 pelo parasita no momento da infecção, promovendo a hidrólise de ATP, ADP e AMP em DC, razão pela qual leva o aumento na produção de ADO. Logo, quanto maior a atividade das E-NTPDases maior o tamanho das lesões em camundongos infectados por *Leishmanias* (LEITE et al., 2012; PERES et al., 2018; PAES-VIEIRA et al., 2021).

Reforçando esses dados, foi descrito que o tratamento de camundongos vulneráveis (BALB/c) infectados com *L. donovani* utilizando inibidores de CD39 e CD73 resultou na diminuição da carga parasitária e aumentou a produção de citocinas inflamatórias (BASU et al., 2020). Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por De Almeida e colegas (2008), que identificou uma redução na hidrólise de AMP em camundongos infectados por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* quando utilizado um inibidor de 5'-nucleotidase, diminuindo a quantidade de ADO extracelular.

A função das nucleotidases na expressão de CD40 em DCs infectadas por espécies de *Leishmania* foi anteriormente vista em nosso laboratório. O estudo referente mostrou que a expressão de CD39 e CD73 aumentou em infecções por *L. braziliensis*, *L. major* e *L. amazonensis*. O aumento dessas enzimas pelo parasita no momento da infecção se correlacionou com a baixa expressão de CD40 na célula. (FIGUEIREDO et al., 2012).

A fim de aprofundar sobre as funções das E-NTPDases e a geração de ADO durante infecção por *L. amazonensis*, outro estudo mostrou que os macrófagos, quando infectados por essa espécie, aumentaram a produção de ADO decorrentes da expressão de CD39 e CD73 pelo macrófago, prejudicando a ativação deles. As Células J774 (monócitos que se diferenciam em macrófagos), ativadas por IFN- γ e LPS, induziram a produção de NO e de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-12) quando CD39 e CD73 foram inibidas (GOMES et al., 2015). Contudo, este trabalho não avaliou os efeitos da expressão dessas enzimas na expressão de CD40.

O processo inflamatório induzido por ATPe é caracterizado pela produção de citocinas inflamatórias, que estimula a migração, adesão e ativação das APCs, além de regular a sinalização dos receptores em monócitos. A hidrólise de ATPe promove a produção de ADO, que suprime a secreção da IL-12, TNF- α e a sinalização de receptores (KAUFMAN et al., 2005; BOURS et al., 2006; DUBOIS et al., 2014).

A adenosina gerada como resultado da quebra de ATP é comum em algumas doenças infecciosas, onde os mecanismos imunológicos são mediados por células. Dos papéis atribuídos a ADO estão incluídos: a modulação na expressão de moléculas como, CD40, CD80 e CD86, a captura de antígeno, e a diminuição da capacidade das células de ampliarem as respostas Th1 (PHANTER et al., 2003; IDZKO et al., 2014; BASU et al., 2020).

Pesquisas realizadas com DCs infectadas por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major* revelaram que as três espécies promovem a hidrólise de AMP, mas apenas a infecção por *L. amazonensis* ativa o receptor de adenosina A2b que inibe a expressão de CD40 (FIGUEIREDO et al., 2012). Dados semelhantes foram vistos em DCs infectadas por *L. infantum*, onde o bloqueio do receptor A2b levou a uma diminuição da lesão e da carga parasitária, além de restaurar a função das células, ou seja, o principal fator para a imunossupressão mediado pela ADO extracelular é devido a ativação dos receptores de adenosina (LIMA et al., 2017).

4. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O PAPEL DE CD40

Na literatura, o papel da expressão de CD40 fica evidente na ativação das respostas imunes a diversas doenças infecciosas e não infecciosas, onde a ligação CD40-CD40L é importante para ativar a resposta não somente do linfócito T CD4⁺ como também do próprio macrófago, conduzindo essas células a produzirem citocinas inflamatórias e NO.

A expressão elevada de CD40 é responsável por aumentar a proteção do hospedeiro mediante a produção de citocinas inflamatórias, ocasionando a morte do patógeno. Quando essa expressão ocorre de forma inadequada, seja através da baixa expressão ou devido à expressão defeituosa, a célula não é devidamente ativada (WAGNER et al., 1994; MARTIN et al., 2010).

A produção das citocinas inflamatórias induz a ativação de células de defesa que irão destruir os patógenos por meio da produção de NO e ROS, por isso a expressão de CD40 é tão importante. É através dessa ativação mediada pela interação CD40-CD40L que vai ocorrer a produção de IFN- γ pelo LT, e IL-12 e NO pelo macrófago.

Estudos evidenciam que o papel protetor das citocinas em algumas infecções é dependente de CD40. Em infecções por espécies de *Leishmania* apenas o tratamento com IFN- γ e IL-12 exógeno não forneceu imunidade prolongada aos camundongos. Neste caso, o efeito protetor das citocinas foi perdido quando a administração exógena dessas citocinas foi interrompida, o contrário ocorreu na presença de CD40, propiciando imunidade prolongada (WEINHEBER et al., 1998; OKWOR et al., 2015).

Nesse sentido, podemos analisar a expressão de CD40 como um forte aliado no combate a diversas infecções, como exemplo podemos citar um dado interessante — durante a sepse (Conjunto de manifestações graves em todo o organismo produzidas por uma infecção) o efeito protetor induzido por CD40 foi perdido quando ocorreu a transfusão de plaquetas obtidas de camundongos CD40L^{-/-}, o que favoreceu o aumento da lesão nos órgãos e piora no quadro clínico. A sepse foi controlada quando houve a transfusão de plaquetas obtidas de camundongos CD40L^{+/+}, que levou a liberação de NETs dependente de CD40L e contribuiu no controle da proliferação bacteriana (VALET et al., 2022).

A infecção por *T. gondii* também exigiu a expressão de CD40 na destruição do parasita. No entanto, o *T. gondii* possui cepas diversificadas onde algumas induzem a expressão de CD40 que leva ao controle do desenvolvimento do parasita e outras não induzem essa expressão, viabilizando a proliferação do parasita no meio intracelular (ZHU et al., 2019).

O CD40 pode apresentar função antitumoral, por outro lado, ele possui papel importante no desenvolvimento de doenças autoimunes provocadas por processo inflamatório exacerbado (AARTS et al., 2017; YAN et al., 2021).

Diante da duplicidade relacionada ao papel de CD40, a infecção por *T. cruzi* apresenta características intrigantes pois, ao mesmo tempo que a expressão dessa molécula é necessária para a produção de IFN- γ e NO, essenciais para a morte do parasita, o processo inflamatório decorrente da interação CD40-CD40L parece ser um indutor da cardiomiopatia chagas (MORENO et al., 2016). O papel duplo de CD40 visto em infecções por *T. cruzi* não é incomum, pois é visto também em infecções fúngicas por *Cryptococcus neoformans*, e em infecções virais (PIETRELLA et al., 2004; GODOT et al., 2020).

A interação CD40-CD40L também irá influenciar na via de ativação da célula, resultando em atividade imune compatível com uma resposta Th1 ou Th2, a depender da via de ativação induzida. A força da sinalização de CD40 vai definir a ativação da via p38MAPK, indutora da resposta inflamatória, ou ERK1/2, via que leva a produção de IL-10 (MATHUR et al., 2004).

Alguns patógenos ao infectarem macrófagos ativam mecanismos intracelulares que induzem a ativação da via que melhor se adequa a sua sobrevivência no meio intracelular. Um exemplo é o vírus da dengue (DENV), que induz a fosforilação de ERK1/2, relacionada ao aumento da apoptose celular. Ao passo que a inibição de ERK1/2 limitou a apoptose de hepatócitos e reduziu a lesão hepática induzida por DENV (SREEKANTH et al., 2014).

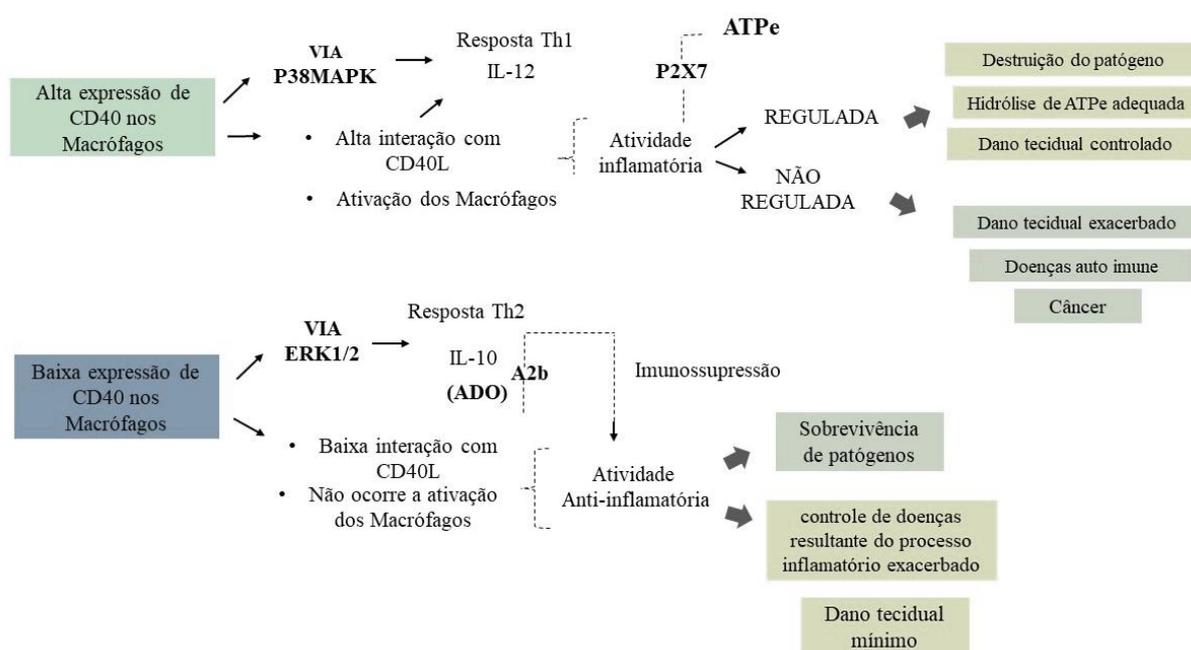
Apesar da via ERK1/2 demonstrar ser mais favorável à sobrevivência dos microrganismos, em doenças infecciosas nem sempre ela é a vilã, o que se deve ao fato dessa via não induzir ao processo inflamatório, que como visto anteriormente pode cooperar no desenvolvimento de doenças.

De outro modo, a ativação da via p38MAPK, apesar de promover o processo inflamatório que geralmente é favorável a destruição de patógenos, pode apresentar complicações em doenças não infecciosas. Foi observado que em linhagens de células de carcinoma de células renais a ativação da via p38MPAK juntamente com a ativação de fatores de transcrição NF- κ B, que representa a principal via de sinalização envolvida na proliferação e origem tumoral, foi elevada (PONTRELLI et al., 2021). Muito ainda precisa ser estudado sobre o papel de CD40 na contribuição do crescimento ou erradicação de células tumorais. No entanto, o caminho seguido até aqui através dos estudos direcionados ao CD40 expresso em APCs, indicam possibilidades que podem guiar novos avanços no tratamento e cura dessas e outras doenças (AARTS et al., 2017; YAN et al., 2021).

Outro fator relevante mostra que CD40 também pode ser reconhecido como indutor da sinalização purinérgica. A alta expressão de CD40 nos macrófagos, ao induzir resposta inflamatória, leva a ativação do receptor P₂X₇ que libera ATP e auxilia no estabelecimento da resposta inflamatória (CHAVES et al., 2019). Em compensação, a produção de ADO, decorrente da hidrólise do ATPe, leva a imunossupressão.

Diante disso, podemos inferir que nas mais diversas doenças a expressão de CD40, assim como a interação CD40-CD40L, possui um papel fundamental que vai definir o rumo da infecção. A expressão elevada de CD40, por ser um receptor que induz a resposta inflamatória, pode contribuir tanto na morte do patógeno como no desenvolvimento de sinais clínicos exacerbados, propiciando a ocorrência de danos teciduais e fisiológicos, contudo a baixa expressão de CD40 impede a ativação dos macrófagos e auxilia na sobrevivência de patógenos, porém colabora no controle de doenças resultante do processo inflamatório exacerbado (Figura 10). De toda forma, CD40 parece apresentar, em todos os casos, um potencial alvo terapêutico.

Figura 10 – Funções imunes desencadeadas por CD40



O papel de CD40 na infecção por *L. amazonensis*

Perante o exposto sobre as funções de CD40, a ativação das vias de sinalização induzida por espécies de *Leishmania* e o papel de CD40 na ativação do receptor P₂X₇, é possível especular sobre a suscetibilidade à infecção por *L. amazonensis*.

Foi mostrado por Chaves e colegas (2019) que a infecção por *L. amazonensis* leva a ativação do receptor P₂X₇. O instigante, é que mesmo regulando positivamente esse receptor a infecção por *L. amazonensis* não gera uma resposta inflamatória, indicando que a razão para a ausência de uma resposta pró-inflamatória durante a infecção está relacionada à modulação que ocorre após a ativação do receptor purinérgico P₂X₇, uma vez que o processo inflamatório induzido pelo ATPe é caracterizado pela produção de citocinas inflamatórias, que estimula a migração, adesão e ativação das APCs, além de regular a sinalização dos receptores em monócitos (KAUFMAN et al., 2005; BOURS et al., 2006; DUBOIS et al., 2014).

Figueiredo e colegas (2012) mostraram que em DCs infectadas por *L. amazonensis* ocorre expressão reduzida de CD40. A baixa interação de CD40 induz a ativação de ERK1/2, este por sua vez estimula a produção da IL-10 (MATHUR et al., 2004). No entanto, a IL-10 não possui parte na ativação reduzida de DCs infectadas por *L. amazonensis*. Nesse caso, mesmo o parasita fosforilando ERK1/2, a inibição da expressão de CD40 é relacionada a produção de cAMP e a ativação do receptor A2b, diferente de infecções por *L. braziliensis* e *L. major*, onde a IL-10 foi parcialmente responsável por inibir a ativação das células (FIGUEIREDO et al., 2012. FIGUEIREDO et al., 2017). É concebível que nos macrófagos a IL-10 tenha influência na inibição de CD40 e na ativação da célula, uma vez provado que essa citocina exerce função imunossupressora e é produzida durante a ativação da via ERK1/2, induzida durante infecção por *Leishmania*.

Quanto à análise dos TLRs na expressão de CD40 e suscetibilidade à infecções por *Leishmania*, esses não demonstram papel decisivo, uma vez que a relação mais direta com o CD40 parece estar associado ao TLR9, onde o CD40 influencia na sua expressão, e a expressão desse TLR influencia na expressão de CD40. O curioso, é que apesar do TLR9 ser expresso em infecções por *L. amazonensis* e apresentar um papel importante no controle da proliferação do parasita, ele não parece ser suficiente para controlar o desenvolvimento da doença, pois mesmo com a expressão do TLR9 o parasita consegue evitar a resposta imunológica inflamatória, indicando que as razões para a evasão do parasita possivelmente não estão relacionadas diretamente com a expressão de TLRs.

O enredo da infecção por *L. amazonensis* é mais conclusivo quando está relacionado à expressão das ectoenzimas no momento da infecção, que irão hidrolisar ATPe em ADP, AMP e ADO (BOURS et al., 2011; DI VIRGILIO et al., 2017; BASU et al., 2020). A produção de ADO suprime a secreção da IL-12, TNF- α e a sinalização de receptores (KAUFMAN et al., 2005; BOURS et al., 2006; DUBOIS et al., 2014).

É de conhecimento no meio científico que em infecções por *L. amazonensis* ocorre um aumento na expressão de ectonucleotidasas (FIGUEIREDO et al., 2012). A conversão de AMP em adenosina ocorre por meio de CD73, que irá regular a resposta da célula através dos receptores de adenosina (IDZKO et al., 2014; DUBOIS et al., 2014; BASU et al., 2020).

Diversos trabalhos do nosso laboratório mostraram que as enzimas participantes no metabolismo de nucleotídeos extracelulares possuem papel importante na infecção por *L. amazonensis*, atuando diretamente na sua adesão e nas células-alvo, modulando a produção de quimiocinas da célula hospedeira. Nesse contexto, os parasitas de *L. amazonensis* podem se ligar mais facilmente aos fagócitos devido à maior expressão de E-NTPDase (DE SOUZA et al., 2010). Comparações realizadas com macrófagos e DCs infectadas por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*, mostram que *L. amazonensis* hidrolisa maiores quantidades de ATP, ADP e AMP do que as outras duas espécies, uma razão aparente é a maior expressão de E-NTPDase na membrana do parasita. A hidrólise aumentada de AMP leva a geração de ADO, este, ao agir sobre os receptores induz função anti-inflamatória promovendo a evasão e a progressão da doença (DE ALMEIDA et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2012. GOMES et al., 2015).

Podemos pressupor que os resultados obtidos em DCs se repitam nos macrófagos infectados por *L. amazonensis*, porque as mesmas enzimas que hidrolisam AMP em DCs também estão presentes neles (DE ALMEIDA et al., 2008; GOMES et al., 2015; BASU et al., 2020; BAJRACHARYA et al., 2022).

Nos resultados obtidos por Figueiredo e colegas (2012), a imunossupressão mediada por ADO em DCs infectadas por *L. amazonensis* é dependente não somente da ação das E-NTPDase mas também da ativação do receptor A2b. O receptor A2b regula positivamente a produção de citocinas anti-inflamatórias e leva a inibição da expressão de moléculas MHC II, CD86 e CD40.

Outro estudo complementar aos dados anteriores mostrou que a infecção por *L. amazonensis* estimula o recrutamento do receptor A2b, mas não de A2a para a superfície das DCs infectadas. Outro fator mostra que A2b co-localizam com

CD39 e CD73 formando um “cluster purinérgico” que permite a produção de adenosina extracelular (FIGUEIREDO et al., 2021)

Ainda que somente o receptor A2b tenha sido relacionado a atividade imunossupressora em DCs, é aceitável que nos macrófagos o receptor A2a também exerça uma função importante, visto que ele é responsável por regular negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias e estimular a produção de IL-10. No mais, esse receptor ao ser bloqueado diminui a quantidade de células Treg, sugerindo que a inibição desse receptor pode aumentar as funções inflamatórias das células (LIMA et al., 2017).

Um outro fator que sustenta esse modelo é a recente publicação de Mann e colaboradores (2022), mostrando que um agonista do receptor A2a de ADO representa um potencial tratamento para pacientes com COVID-19. Uma vez que a inibição do receptor A2a permite que a célula conduza positivamente a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Perante as evidências apresentadas e discutidas, as quais foram: O CD40 é importante na ativação dos macrófagos e como indutor da resposta inflamatória; A infecção por *L. amazonensis* induz a ativação do receptor P₂X₇ que libera ATP; *L. amazonensis* apresenta expressão elevada de E-NTPDases responsáveis por hidrolisar ATPe; em DCs o receptor purinérgico de ADO, A2b, levou à imunossupressão que regulou negativamente a expressão de CD40; a infecção por *L. amazonensis* ativa a via ERK1/2 devido à baixa interação de CD40. Isto posto, foi proposto um modelo hipotético apresentando possíveis mecanismos de evasão usados pela *L. amazonensis* ao infectar macrófagos.

Alguns pontos foram levantados para simplificar a proposta sugerida:

- I. *Leishmania amazonensis* canaliza ATP para o meio extracelular para favorecer sua sobrevivência através da geração de adenosina.
- II. A expressão de CD40 é fundamental para definir o rumo da infecção, uma vez que esse receptor é necessário para a ativação do LT CD4⁺ e do próprio macrófago, principal célula hospedeira da *Leishmania*.

- III. Durante a infecção por *L. amazonensis* ocorre elevada expressão de CD39 e CD73, que leva a hidrólise de ATPe gerando ADO.

- IV. Os receptores de ADO precisam ser ativados para que a ADO exerça seu efeito na supressão imunológica. O receptor A2a regula negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias, mas também pode levar a produção de IL-10, assim como o receptor A2b. No entanto, os dados obtidos em DCs mostraram que a ADO exerce sua função somente através do receptor A2b. Nos macrófagos ainda não existem dados concretos, dessa forma, inferimos a ação desses receptores.

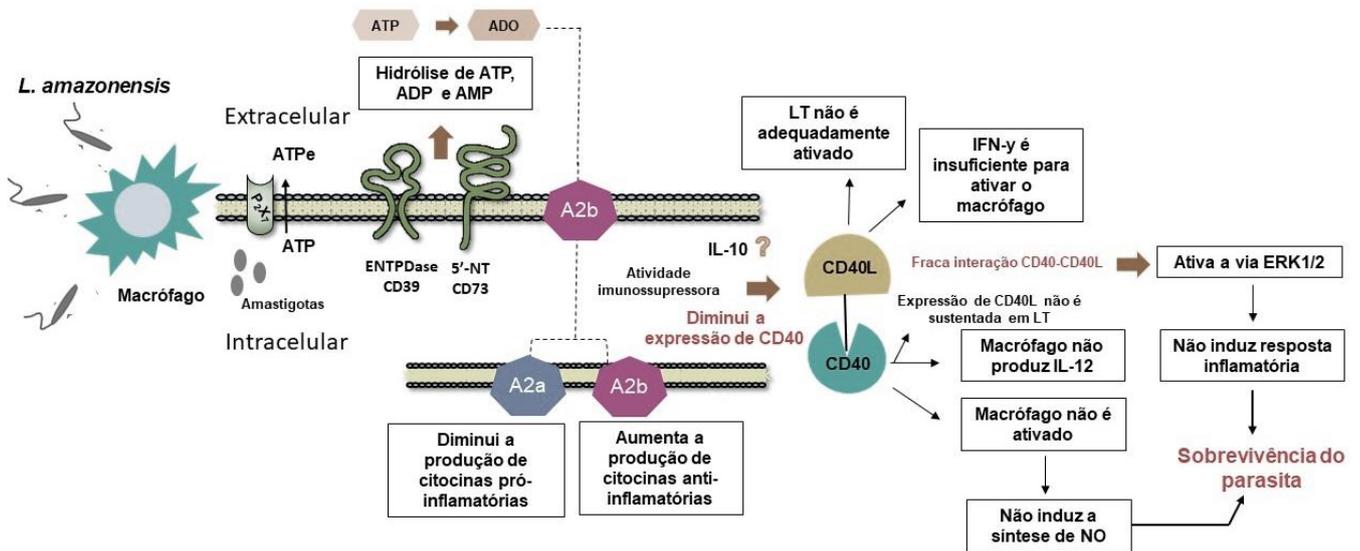
- V. O papel da IL-10 é especulativo, pois apesar dela ser produzida através da ativação de ERK1/2 e ter se mostrado relevante em infecções por algumas espécies de *Leishmania*, em DCs infectadas por *L. amazonensis* ela não apresenta interferência na supressão imunológica.

5. MODELO PROPOSTO

A *L. amazonensis* ao infectar macrófagos aumenta a expressão do receptor purinérgico P₂X₇ que libera ATP para o meio extracelular. Esse parasita, no entanto, aumenta a produção da ENTPDase CD39 e 5'NTPdase CD73 que irão hidrolisar ATPe em ADP, AMP e ADO. A ADO ao atuar sobre o receptor A2b assim como em DCs, ou sobre ambos receptores (A2a e A2b), induz atividade imunossupressora, que vai diminuir a expressão de CD40 na superfície dos macrófagos. A baixa sinalização de CD40 leva a ativação da via ERK1/2, esta via impulsiona a produção de IL-10, que pode contribuir, ou não, para a inativação da célula.

A inibição da expressão de CD40, independente do receptor de ADO requerido com a participação ou não da IL-10, interfere na produção das citocinas e prejudica a ativação do macrófago, que por sua vez deixa de produzir NO, por consequência o parasita se desenvolve.

Figura 11 – Modelo Proposto



6. CONCLUSÃO

O papel de CD40 expresso nos macrófagos é importante na ativação celular e na proteção do hospedeiro contra as infecções causadas por *Leishmanias*. Os dados mostraram que em infecções por *L. amazonensis* ocorre redução na expressão dessa molécula, portanto a função pró-parasita é aumentada. Apesar de não existirem dados efetivos que comprovem a ação da sinalização purinérgica na expressão de CD40 nos macrófagos, a produção de adenosina, decorrente da hidrólise de ATPe, mostra-se um forte fator que influencia negativamente na expressão de CD40 devido ao processo de imunossupressão, sendo essa uma razão aparente que pode contribuir no sucesso da infecção.

Ressaltamos que estudos responsáveis por avaliar a expressão de CD40 nos macrófagos durante a infecção por *L. amazonensis* com foco na produção de adenosina extracelular precisam continuar sendo investigados para que o modelo proposto seja atestado ou contestado.

FINANCIAMENTO: FAPEMIG - PRONEX-CBB-APQ-01419-14; Rede de Pesquisa em Doenças Infecciosas Humanas e Animais no Estado de Minas Gerais. CNPq – (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES – (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARTS, S. A., SEJKENS, T. T., VAN DORST, K. J., DIJKSTRA, C. D., KOUIJ, G., & LUTGENS, E. (2017). The CD40–CD40L dyad in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Frontiers in immunology*, 8, 1791.

ABBRACCHIO, MP, & CERUTI, S. (2007). Receptores P1 e secreção de citocinas. *Sinalização Purinérgica*, 3 (1), 13-25.

ADAMS, D. O., & HAMILTON, T. A. (1984). The cell biology of macrophage activation. *Annual review of immunology*, 2, 283-318.

AFONSO, L. C., & SCOTT, P. (1993). Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infection and immunity*, 61(7), 2952-2959.

AGALLOU, M., DOTSIKA, E., & KARAGOUNI, E. (2014). Low Cd40 Expression Levels in *Leishmania Infantum*-Infected Bone Marrow Dendritic Cells Evoke Regulatory Responses by down-Regulating Interleukin-12 Production: Role of Erk1/2. *European Journal of Inflammation*, 12(2), 315-328.

ALBINA, J. E., MILLS, C. D., HENRY, W. L., & CALDWELL, M. D. (1989). Regulation of macrophage physiology by L-arginine: role of the oxidative L-arginine deiminase pathway. *The Journal of Immunology*, 143(11), 3641-3646.

ALAM, R., & GORSKA, M. M. (2011). Mitogen-activated protein kinase signalling and ERK1/2 bistability in asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, 41(2), 149-159.

AMINI, M., GHORBAN, K., MOKHTARZADEH, A., DADMANESH, M., & BARADARAN, B. (2020). CD40 DNA hypermethylation in primary gastric tumors; as a novel diagnostic biomarker. *Life Sciences*, 254, 117774.

ANDRADE, R. M., WESSENDARP, M., & SUBAUSTE, C. S. (2003). CD154 activates macrophage antimicrobial activity in the absence of IFN- γ through a TNF- α -dependent mechanism. *The Journal of Immunology*, 171(12), 6750-6756.

ANDRADE, R. M., PORTILLO, J. A. C., WESSENDARP, M., & SUBAUSTE, C. S. (2005). CD40 signaling in macrophages induces activity against an intracellular pathogen independently of gamma interferon and reactive nitrogen intermediates. *Infection and immunity*, 73(5), 3115-3123.

AWASTHI, A., MATHUR, R., KHAN, A., JOSHI, B. N., JAIN, N., SAWANT, S., & SAHA, B. (2003). CD40 signaling is impaired in L. major-infected macrophages and is rescued by a p38MAPK activator establishing a host-protective memory T cell response. *The Journal of experimental medicine*, 197(8), 1037-1043.

AWASTHI, A., MATHUR, R. K., & SAHA, B. (2004). Immune response to Leishmania infection. *Indian Journal of Medical Research*, 119, 238-258.

BAJRACHARYA, B., SHRESTHA, D., TALVANI, A., GONÇALVES, R., & AFONSO, L. C. C. (2022). The Ecto-5nucleotidase/CD73 Mediates Leishmania amazonensis Survival in Macrophages. *BioMed Research International*, 2022.

BARROS, P. D. S. C., MOTA, C. M., DOS SANTOS MIRANDA, V., FERREIRA, F. B., RAMOS, E. L. P., SANTANA, S. S., ... & MINEO, T. W. P. (2019). Inducible nitric oxide synthase is required for parasite restriction and inflammatory modulation during *Neospora caninum* infection. *Veterinary parasitology*, 276, 108990.

BASU, M., GUPTA, P., DUTTA, A., JANA, K., & UKIL, A. (2020). Increased host ATP efflux and its conversion to extracellular adenosine is crucial for establishing *Leishmania* infection. *Journal of cell science*, 133(7), jcs239939.

BHARDWAJ, S., SRIVASTAVA, N., SUDAN, R., & SAHA, B. (2010). *Leishmania* interferes with host cell signaling to devise a survival strategy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010.

BISHOP, G. A., HOSTAGER, B. S., & BROWN, K. D. (2002). Mechanisms of TNF receptor-associated factor (TRAF) regulation in B lymphocytes. *Journal of leukocyte biology*, 72(1), 19-23.

BISHOP, G. A., MOORE, C. R., XIE, P., STUNZ, L. L., & KRAUS, Z. J. (2007). TRAF proteins in CD40 signaling. *TNF Receptor Associated Factors (TRAFs)*, 131-151.

BITTENCOURT, A. L., & BARRAL, A. (1991). Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86, 51-56.

BOGGIATTO, P. M., JIE, F., GHOSH, M., GIBSON-CORLEY, K. N., RAMER-TAIT, A. E., JONES, D. E., & PETERSEN, C. A. (2009). Altered dendritic cell phenotype in response to *Leishmania amazonensis* amastigote infection is mediated by MAP kinase, ERK. *The American journal of pathology*, *174*(5), 1818-1826.

BOURS, M. J., SWENNEN, E. L., DI VIRGILIO, F., CRONSTEIN, B. N., & DAGNELIE, P. C. (2006). Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology & therapeutics*, *112*(2), 358–404.

BOURS, M. J. L., DAGNELIE, P. C., GIULIANI, A. L., WESSELIUS, A., & DI VIRGILIO, F. (2011). P2 receptors and extracellular ATP: a novel homeostatic pathway in inflammation. *Frontiers in Bioscience-Scholar*, *3*(4), 1443-1456.

BRODSKYN, C. I., DEKREY, G. K., & TITUS, R. G. (2001). Influence of costimulatory molecules on immune response to *Leishmania major* by human cells in vitro. *Infection and immunity*, *69*(2), 665-672.

BRODSKYN, C., PATRICIO, J., OLIVEIRA, R., LOBO, L., ARNHOLDT, A., MENDONÇA-PREVIATO, L., ... & BARRAL-NETTO, M. (2002). Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* interfere with macrophages and dendritic cell responses. *Infection and immunity*, *70*(7), 3736-3743.

BROWN, K. D., HOSTAGER, B. S., & BISHOP, G. A. (2001). Differential signaling and tumor necrosis factor receptor–associated factor (Traf) degradation mediated by Cd40 and the Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 (Lmp1). *The Journal of experimental medicine*, *193*(8), 943-954.

BURNSTOCK, G., & BOEYNAEMS, J. M. (2014). Purinergic signalling and immune cells. *Purinergic signalling*, 10(4), 529-564.

CAMPBELL, K. A., OVENDALE, P. J., KENNEDY, M. K., FANSLOW, W. C., REED, S. G., & MALISZEWSKI, C. R. (1996). CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major*. *Immunity*, 4(3), 283-289

CAMPOS, M. B., LIMA, L. V. D. R., DE LIMA, A. C. S., VASCONCELOS DOS SANTOS, T., RAMOS, P. K. S., GOMES, C. M. D. C., & SILVEIRA, F. T. (2018). Toll-like receptors 2, 4, and 9 expressions over the entire clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (V.) braziliensis* and *Leishmania (L.) amazonensis*. *PLoS One*, 13(3), e0194383.

CASTES, M., TRUJILLO, D., ROJAS, M. E., FERNANDEZ, C. T., ARAYA, L., CABRERA, M., ... & CONVIT, J. (1993). Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Biological research*, 26(1-2), 233-238.

CHAKRABORTY, S., SRIVASTAVA, A., JHA, M. K., NAIR, A., PANDEY, S. P., SRIVASTAVA, N., KUMARI, S., SINGH, S., KRISHNASASTRY, M. V., & SAHA, B. (2015). Inhibition of CD40-induced N-Ras activation reduces leishmania major infection. *Journal of immunology* 194(8), 3852–3860.

CHALLAGUNDLA, N., SHAH, D., DALAI, S. K., & AGRAWAL-RAJPUT, R. (2022). IFN γ insufficiency during mouse intravaginal *Chlamydia trachomatis* infection exacerbates alternative activation in macrophages with compromised CD40 functions. *bioRxiv*.

CHANDEL, H. S., PANDEY, S. P., SHUKLA, D., LALSARE, K., SELVARAJ, S. K., JHA, M. K., & SAHA, B. (2014). Toll-like receptors and CD40 modulate each other's expression affecting *Leishmania major* infection. *Clinical & Experimental Immunology*, 176(2), 283-290.

CHAUHAN, P., DANDAPAT, J., SARKAR, A., & SAHA, B. (2020). March of Mycobacterium: miRNAs intercept host cell CD40 signalling. *Clinical & Translational Immunology*, 9(10), e1179.

CHAVES, M. M., SINFLORIO, D. A., THORSTENBERG, M. L., MARTINS, M. D. A., MOREIRA-SOUZA, A. C. A., RANGEL, T. P., ... & COUTINHO-SILVA, R. (2019). Non-canonical NLRP3 inflammasome activation and IL-1 β signaling are necessary to *L. amazonensis* control mediated by P2X7 receptor and leukotriene B4. *PLoS pathogens*, 15(6), e1007887.

CHAVES, M. M., SAVIO, L. E. B., & COUTINHO-SILVA, R. (2021). Purinergic signaling: A new front-line determinant of resistance and susceptibility in leishmaniasis. *biomedical journal*.

CHAUSSABEL, D., JACOBS, F., DE JONGE, J., DE VEERMAN, M., CARLIER, Y., THIELEMANS, K., ... & VRAY, B. (1999). CD40 ligation prevents *Trypanosoma cruzi* infection through interleukin-12 upregulation. *Infection and immunity*, 67(4), 1929-1934.

CHEN, L., CHENG, W., SHIVSHANKAR, P., LEI, L., ZHANG, X., WU, Y., ... & ZHONG, G. (2009). Distinct roles of CD28-and CD40 ligand-mediated costimulation in the development of protective immunity and pathology during *Chlamydia muridarum* urogenital infection in mice. *Infection and immunity*, 77(7), 3080-3089.

CHEN, G. H., OSTERHOLZER, J. J., CHOE, M. Y., MCDONALD, R. A., OLSZEWSKI, M. A., HUFFNAGLE, G. B., & TOEWS, G. B. (2010). Dual roles of CD40 on microbial containment and the development of immunopathology in response to persistent fungal infection in the lung. *The American journal of pathology*, 177(5), 2459-2471.

CHIN, V. K., CHONG, W. C., HANIZA, H., & BASIR, R. (2021). modulating effects of il-4, il-10 and il-13 on the course of plasmodium berghei malaria infection in mice. *Journal of Health and Translational Medicine*, 24(2), 92-105.

CLASSEN, A., LLOBERAS, J., & CELADA, A. (2009). Macrophage activation: classical vs. alternative. In *Macrophages and Dendritic Cells* (pp. 29-43). Humana Press.

COOKE, P. W., JAMES, N. D., GANESAN, R., WALLACE, M., BURTON, A., & YOUNG, L. S. (1999). CD40 expression in bladder cancer. *The Journal of pathology*, 188(1), 38-43.

DAVIS, M. J., TSANG, T. M., QIU, Y., DAYRIT, J. K., FREIJ, J. B., HUFFNAGLE, G. B., & OLSZEWSKI, M. A. (2013). Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *MBio*, 4(3), e00264-13.

DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA, E., DE OLIVEIRA, J. C., FIGUEIREDO, A. B., JÚNIOR, D. D. S. L., CARNEIRO, C. M., FIETTO, J. L. R., & AFONSO, L. C. C. (2008). Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. *Microbes and Infection*, 10(8), 850-857.

DE SOUZA, M. C., DE ASSIS, E. A., GOMES, R. S., DA SILVA, E. D. A. M., MELO, M. N., FIETTO, J. L. R., & AFONSO, L. C. C. (2010). The influence of ecto-nucleotidases on *Leishmania amazonensis* infection and immune response in C57B/6 mice. *Acta tropica*, 115(3), 262-269.

DECHANET, J., GROSSET, C., TAUPIN, J. L., MERVILLE, P., BANCHEREAU, J., RIPOCHE, J., & MOREAU, J. F. (1997). CD40 ligand stimulates proinflammatory cytokine production by human endothelial cells. *The Journal of Immunology*, 159(11), 5640-5647.

DI VIRGILIO, F., CHIOZZI, P., FERRARI, D., FALZONI, S., SANZ, JM, MORELLI, A., ... & BARICORDI, OR (2001). Receptores de nucleotídeos: uma família emergente de moléculas reguladoras nas células sanguíneas. *Sangue, The Journal of the American Society of Hematology*, 97 (3), 587-600.

DI VIRGILIO, F., DAL BEN, D., SARTI, A. C., GIULIANI, A. L., & FALZONI, S. (2017). The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity*, 47(1), 15–31.

DJUREINOVIC, D., WANG, M., & KLUGER, H. M. (2021). Agonistic CD40 antibodies in cancer treatment. *Cancers*, 13(6), 1302.

DOHERTY, C. M., ROMERO, A. D., & DENKERS, E. Y. (2022). Impact of IFN- γ and CD40 signalling on *Toxoplasma gondii* cyst formation in differentiated Neuro-2a neuroblastoma cells. *Parasite Immunology*, 44(1-2), e12897.

DUBOIS-COLAS, N., PETIT-JENTREAU, L., BARREIRO, L. B., DURAND, S., SOUBIGOU, G., LECOINTE, C., ... & TAILLEUX, L. (2014). Extracellular adenosine triphosphate affects the response of human macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of infectious diseases*, 210(5), 824-833.

DUSHANE, J. K., WILCZEK, M. P., MAYBERRY, C. L., & MAGINNIS, M. S. (2018). ERK is a critical regulator of JC polyomavirus infection. *Journal of Virology*, 92(7), e01529-17.

DUGO, L., BELLUOMO, M. G., FANALI, C., RUSSO, M., CACCIOLA, F., MACCARRONE, M., & SARDANELLI, A. M. (2017). Effect of cocoa polyphenolic extract on macrophage polarization from proinflammatory M1 to anti-inflammatory M2 state. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017.

FERLIN, W. G., VON DER WEID, T., COTTREZ, F., FERRICK, D. A., COFFMAN, R. L., & HOWARD, M. C. (1998). The induction of a protective response in *Leishmania major*-infected BALB/c mice with anti-CD40 mAb. *European journal of immunology*, 28(2), 525-531.

FIGUEIREDO, A. B., SERAFIM, T. D., MARQUES-DA-SILVA, E. A., MEYER-FERNANDES, J. R., & AFONSO, L. C. (2012). *Leishmania amazonensis* impairs DC function by inhibiting CD 40 expression via A 2B adenosine receptor activation. *European journal of immunology*, 42(5), 1203-1215.

FIGUEIREDO, A. B., SOUZA-TESTASICCA, M. C., MINEO, T. W. P., & AFONSO, L. C. C. (2017). *Leishmania amazonensis*-induced cAMP triggered by adenosine A2B receptor is important to inhibit dendritic cell activation and evade immune response in infected mice. *Frontiers in immunology*, 8, 849.

FIGUEIREDO, A. B., DE OLIVEIRA E CASTRO, R. A., NOGUEIRA-PAIVA, N. C., MOREIRA, F., GONÇALVES, F. Q., SOARES, R. P., ... & AFONSO, L. C. C. (2021). Clustering of adenosine A2B receptors with ectonucleotidases in caveolin-rich lipid rafts underlies immunomodulation by *Leishmania amazonensis*. *The FASEB Journal*, 35(5), e21509

FIRMINO-CRUZ, L., RAMOS, T. D., DA FONSECA-MARTINS, A. M., MACIEL-OLIVEIRA, D., OLIVEIRA-SILVA, G., PRATTI, J. E. S., ... & DE MATOS GUEDES, H. L. (2018). Immunomodulating role of IL-10-producing B cells in *Leishmania amazonensis* infection. *Cellular Immunology*, 334, 20-30.

FLORIDO, M., APPELBERG, R., ORME, I. M., & COOPER, A. M. (1997). Evidence for a reduced chemokine response in the lungs of beige mice infected with *Mycobacterium avium*. *Immunology*, 90(4), 600-606.

FREDHOLM, B. B., IJZERMAN, A. P., JACOBSON, K. A., KLOTZ, K. N., & LINDEN, J. (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological reviews*, 53(4), 527-552.

GHOSH, S., MAY, M. J., & KOPP, E. B. (1998). NF-(kappa) B and REL proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology*, 16, 225.

GHOSH, S., BHATTACHARYYA, S., SIRKAR, M., SA, G. S., DAS, T., MAJUMDAR, D., ... & MAJUMDAR, S. (2002). *Leishmania donovani* suppresses activated protein 1 and NF-κB activation in host macrophages via ceramide generation: involvement of extracellular signal-regulated kinase. *Infection and Immunity*, 70(12), 6828-6838.

GIUDICE, A., VENDRAME, C., BEZERRA, C., CARVALHO, L. P., DELAVECHIA, T., CARVALHO, E. M., & BACELLAR, O. (2012). Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC infectious diseases*, *12*, 75.

GOMES, R. S., DE CARVALHO, L. C. F., DE SOUZA VASCONCELLOS, R., FIETTO, J. L. R., & AFONSO, L. C. C. (2015). E-NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) of *Leishmania amazonensis* inhibits macrophage activation. *Microbes and Infection*, *17*(4), 295-303.

GÓMEZ-OLARTE, S., BOLAÑOS, N. I., CUÉLLAR, A., PUERTA, C. J., & GONZÁLEZ, J. M. (2020). Diminished mitogen-induced T cell proliferation by *Trypanosoma cruzi* antigens associated with antigen-presenting cell modulation and CD3 signaling. *Cellular Immunology*, *348*, 103974.

GODOT, V., TCHERAKIAN, C., GIL, L., CERVERA-MARZAL, I., LI, G., CHENG, L., ... & LÉVY, Y. (2020). TLR-9 agonist and CD40-targeting vaccination induces HIV-1 envelope-specific B cells with a diversified immunoglobulin repertoire in humanized mice. *PLoS pathogens*, *16*(11), e1009025.

GORDON S. (2007). The macrophage: past, present and future. *European journal of immunology*, *37 Suppl 1*, S9–S17.

HARHAY, M. O., OLLIARO, P. L., COSTA, D. L., & COSTA, C. H. N. (2011). Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends in parasitology*, *27*(9), 403-409.

HASKO, G. (2004). Cronstein BN. *Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. Trends Immunol*, 25, 33-39.

HASHEM, A. M., GRAVEL, C., CHEN, Z., YI, Y., TOCCHI, M., JAENTSCHKE, B., ... & LI, X. (2014). CD40 ligand preferentially modulates immune response and enhances protection against influenza virus. *The Journal of Immunology*, 193(2), 722-734.

HAYASHI, T., RAO, S. P., MEYLAN, P. R., KORNBLUTH, R. S., & CATANZARO, A. (1999). Role of CD40 ligand in Mycobacterium avium infection. *Infection and Immunity*, 67(7), 3558-3565.

HEUFLER, C., KOCH, F., STANZL, U., TOPAR, G., WYSOCKA, M., TRINCHIERI, G., ... & SCHULER, G. (1996). Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon- γ production by T helper 1 cells. *European journal of immunology*, 26(3), 659-668.

HU, H. M., O'ROURKE, K., BOGUSKI, M. S., & DIXIT, V. M. (1994). A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40. *Journal of Biological Chemistry*, 269(48), 30069-30072.

HU, X., CHAKRAVARTY, S. D., & IVASHKIV, L. B. (2008). Regulation of IFN and TLR signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms. *Immunological reviews*, 226, 41.

HUSEIN, A., JAMAL, A., AHMED, M. Z., ARISH, M., ALI, R., TABREZ, S., ... & RUB, A. (2018). Leishmania donovani infection differentially regulates small G-proteins. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(9), 7844-7854.

IBORRA, S., SOTO, M., STARK-AROEIRA, L., CASTELLANO, E., ALARCÓN, B., ALONSO, C., ... & FERNÁNDEZ-MALAVÉ, E. (2011). H-ras and N-ras are dispensable for T-cell development and activation but critical for protective Th1 immunity. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 117(19), 5102-5111.

IDZKO, M., FERRARI, D., & ELTZSCHIG, H. K. (2014). Nucleotide signalling during inflammation. *Nature*, 509(7500), 310-317.

IMADOME, K. I., SHIMIZU, N., ARAI, A., MIURA, O., WATANABE, K., NAKAMURA, H., ... & FUJIWARA, S. (2005). Coexpression of CD40 and CD40 Ligand in Epstein-Barr Virus-Infected T and NK Cells and Their Role in Cell Survival. *The Journal of infectious diseases*, 192(8), 1340-1348.

IMAIZUMI, K., KAWABE, T., ICHIYAMA, S., KIKUTANI, H., YAGITA, H., SHIMOKATA, K., & HASEGAWA, Y. (1999). Enhancement of tumoricidal activity of alveolar macrophages via CD40-CD40 ligand interaction. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 277(1), L49-L57.

IWASAKI, A., & MEDZHITOV, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology*, 5(10), 987-995.

JHA, M. K., SARODE, A. Y., BODHALE, N., MUKHERJEE, D., PANDEY, S. P., SRIVASTAVA, N., ... & SAHA, B. (2020). Development and characterization of an avirulent *Leishmania major* strain. *The Journal of Immunology*, 204(10), 2734-2753.

JAKOVLJEVIC, M., LAVRNJA, I., BOZIC, I., MILOSEVIC, A., BJELOBABA, I., SAVIC, D., ... & LAKETA, D. (2019). Induction of NTPDase1/CD39 by reactive microglia and macrophages is associated with the functional state during EAE. *Frontiers in neuroscience*, 13, 410.

KASHIWADA, M., SHIRAKATA, Y., INOUE, J. I., NAKANO, H., OKAZAKI, K., OKUMURA, K., ... & TAKEMORI, T. (1998). Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity in CD40 signaling along a Ras-independent pathway. *The Journal of experimental medicine*, 187(2), 237-244.

KAUFMANN, A., MUSSET, B., LIMBERG, S. H., RENIGUNTA, V., SUS, R., DALPKE, A. H., ... & HANLEY, P. J. (2005). "Host tissue damage" signal ATP promotes non-directional migration and negatively regulates toll-like receptor signaling in human monocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(37), 32459-32467.

KAMIJO, R., SHAPIRO, D., LE, J., HUANG, S., AGUET, M., & VILCEK, J. (1993). Generation of nitric oxide and induction of major histocompatibility complex class II antigen in macrophages from mice lacking the interferon gamma receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(14), 6626-6630.

KAYE, P. M., ROGERS, N. J., CURRY, A. J., & SCOTT, J. C. (1994). Deficient expression of co-stimulatory molecules on Leishmania-infected macrophages. *European journal of immunology*, 24(11), 2850-2854.

KOO, S. J., SZCZESNY, B., WAN, X., PUTLURI, N., & GARG, N. J. (2018). Pentose phosphate shunt modulates reactive oxygen species and nitric oxide production controlling Trypanosoma cruzi in macrophages. *Frontiers in immunology*, 9, 202.

LAI, Y., & GALLO, R. L. (2008). Toll-like receptors in skin infections and inflammatory diseases. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*, 8(3), 144-155.

LEE, B. O., HAYNES, L., EATON, S. M., SWAIN, S. L., & RANDALL, T. D. (2002). The biological outcome of CD40 signaling is dependent on the duration of CD40 ligand expression: reciprocal regulation by interleukin (IL)-4 and IL-12. *The Journal of experimental medicine*, 196(5), 693-704.

LEITE, P. M., GOMES, R. S., FIGUEIREDO, A. B., SERAFIM, T. D., TAFURI, W. L., DE SOUZA, C. C., MOURA, S. A., FIETTO, J. L., MELO, M. N., RIBEIRO-DIAS, F., OLIVEIRA, M. A., RABELLO, A., & AFONSO, L. C. (2012). Ecto-nucleotidase activities of promastigotes from Leishmania (Viannia) braziliensis relates to parasite infectivity and disease clinical outcome. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(10), e1850.

LEVY, O., SUTER, E. E., MILLER, R. L., & WESSELS, M. R. (2006). Unique efficacy of Toll-like receptor 8 agonists in activating human neonatal antigen-presenting cells. *Blood*, 108(4), 1284-1290.

LÉVESQUE, S. A., KUKULSKI, F., ENJYOJI, K., ROBSON, S. C., & SÉVIGNY, J. (2010). NTPDase1 governs P2X7-dependent functions in murine macrophages. *European journal of immunology*, 40(5), 1473-1485.

LIMA, M. H., SACRAMENTO, L. A., QUIRINO, G. F., FERREIRA, M. D., BENEVIDES, L., SANTANA, A. K., ... & CARREGARO, V. (2017). Leishmania infantum parasites subvert the host inflammatory response through the adenosine A2A receptor to promote the establishment of infection. *Frontiers in immunology*, 8, 815.

LIU, Y., ZHU, H., SU, Z., SUN, C., YIN, J., YUAN, H., ... & XU, H. (2012). IL-17 contributes to cardiac fibrosis following experimental autoimmune myocarditis by a PKC β /Erk1/2/NF- κ B-dependent signaling pathway. *International immunology*, 24(10), 605-612.

LORÍA-CERVERA, E. N., & ANDRADE-NARVAEZ, F. (2020). The role of monocytes/macrophages in Leishmania infection: A glance at the human response. *Acta tropica*, 207, 105456.

LOUZIR, H., MELBY, P. C., BEN SALAH, A., MARRAKCHI, H., AOUN, K., BEN ISMAIL, R., & DELLAGI, K. (1998). Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to Leishmania major. *Journal of Infectious Diseases*, 177(6), 1687-1695.

MANN, B. J., CHHABRA, P., MA, M., BROVERO, S. G., JONES, M. K., LINDEN, J., & BRAYMAN, K. L. (2022). Adenosine A2A Receptor (A2AR) agonists improve survival in K28-hACE2 mice following SARS CoV-2 infection. *bioRxiv*.

MARRIOTT, I., THOMAS, E. K., & BOST, K. L. (1999). CD40-CD40 ligand interactions augment survival of normal mice, but not CD40 ligand knockout mice, challenged orally with *Salmonella dublin*. *Infection and immunity*, 67(10), 5253-5257.

MARQUES-DA-SILVA, C., CHAVES, M. M., RODRIGUES, J. C., CORTE-REAL, S., COUTINHO-SILVA, R., & PERSECHINI, P. M. (2011). Differential modulation of ATP-induced P2X7-associated permeabilities to cations and anions of macrophages by infection with *Leishmania amazonensis*. *PLoS One*, 6(9), e25356.

MARTIN, S., AGARWAL, R., MURUGAIYAN, G., & SAHA, B. (2010). CD40 expression levels modulate regulatory T cells in *Leishmania donovani* infection. *The Journal of Immunology*, 185(1), 551-559.

MARTINEZ, F. O. (2011). Regulators of macrophage activation. *European journal of immunology*, 41(6), 1531-1534.

MATHUR, R. K., AWASTHI, A., WADHONE, P., RAMANAMURTHY, B., & SAHA, B. (2004). Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses. *Nature medicine*, 10(5), 540-544.

MATHUR, R. K., AWASTHI, A., & SAHA, B. (2006). The conundrum of CD40 function: host protection or disease promotion?. *Trends in parasitology*, 22(3), 117-122.

MAUËL, J. (1990). Macrophage-parasite interactions in leishmania infections. *Journal of leukocyte biology*, 47(2), 187-193.

MCCONVILLE, M. J., & NADERER, T. (2011). Metabolic pathways required for the intracellular survival of Leishmania. *Annual review of microbiology*, 65(1), 543-561.

MELICHAR, B., PATENIA, R., GALLARDO, S., MELICHAROVÁ, K., HU, W., & FREEDMAN, R. S. (2007). Expression of CD40 and growth-inhibitory activity of CD40 ligand in ovarian cancer cell lines. *Gynecologic oncology*, 104(3), 707-713.

MIRZAEI, A., MALEKI, M., MASOUMI, E., & MASPI, N. (2021). A historical review of the role of cytokines involved in leishmaniasis. *Cytokine*, 145, 155297.

MOENS, L., WUYTS, G., BOON, L., DEN HARTOG, M. T., CEUPPENS, J. L., & BOSSUYT, X. (2008). The human polysaccharide-and protein-specific immune response to *Streptococcus pneumoniae* is dependent on CD4+ T lymphocytes, CD14+ monocytes, and the CD40–CD40 ligand interaction. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122(6), 1231-1233.

MORENO AYALA, M. A., CASASCO, A., GONZÁLEZ, M., POSTAN, M., CORRAL, R. S., & PETRAY, P. B. (2016). Trypanosoma cruzi infection induces the expression of CD40 in murine cardiomyocytes favoring CD40 ligation-dependent production of cardiopathogenic IL-6. *Parasitology research*, 115(2), 779-785.

MORGADO, P., SUDARSHANA, D. M., GOV, L., HARKER, K. S., LAM, T., CASALI, P., ... & LODOEN, M. B. (2014). Type II *Toxoplasma gondii* induction of CD40 on infected macrophages enhances interleukin-12 responses. *Infection and immunity*, 82(10), 4047-4055.

MOSSER, D. M., & EDWARDS, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews immunology*, 8(12), 958-969.

MÜLLER, F., AUKRUST, P., NORDØY, I., & FRØLAND, S. S. (1998). Possible role of interleukin-10 (IL-10) and CD40 ligand expression in the pathogenesis of hypergammaglobulinemia in human immunodeficiency virus infection: modulation of IL-10 and Ig production after intravenous Ig infusion. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 92(10), 3721-3729.

MURRAY, H. W., LU, C. M., BROOKS, E. B., FICHTL, R. E., DEVECCHIO, J. L., & HEINZEL, F. P. (2003). Modulation of T-cell costimulation as immunotherapy or immunochemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *Infection and immunity*, 71(11), 6453-6462.

MUXEL, S. M., ACUÑA, S. M., AOKI, J. I., ZAMPIERI, R. A., & FLOETER-WINTER, L. M. (2018). Toll-like receptor and miRNA-let-7e expression alter the inflammatory response in leishmania amazonensis-infected macrophages. *Frontiers in Immunology*, 9, 2792.

NAIR, A., CHAKRABORTY, S., BANERJI, L. A., SRIVASTAVA, A., NAVARE, C., & SAHA, B. (2020). Ras isoforms: signaling specificities in CD40 pathway. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 1-12.

NASHLEANAS, M., & SCOTT, P. (2000). Activated T cells induce macrophages to produce NO and control Leishmania major in the absence of tumor necrosis factor receptor p55. *Infection and immunity*, 68(3), 1428-1434.

NEVES, B. M., SILVESTRE, R., RESENDE, M., OUAISSI, A., CUNHA, J., TAVARES, J., ... & DA SILVA, A. C. (2010). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/akt and impairment of nuclear factor- κ B: molecular mechanisms behind the arrested maturation/activation state of *Leishmania infantum*-infected dendritic cells. *The American journal of pathology*, *177*(6), 2898-2911.

NILES, M. A., GOGESCH, P., KRONHART, S., ORTEGA IANNAZZO, S., KOCHS, G., WAIBLER, Z., & ANZAGHE, M. (2021). Macrophages and dendritic cells are not the major source of pro-inflammatory cytokines upon SARS-CoV-2 infection. *Frontiers in Immunology*, *12*, 647824.

NISHAT, S., & WUESCHER, L. M. (2018). Worth RG Platelets Enhance Dendritic Cell Responses against *Staphylococcus Aureus* through CD40-CD40L. *Infect. Immun*, *86*, e00186-18.

NUNES, M. P., CYSNE-FINKELSTEIN, L., MONTEIRO, B. C., DE SOUZA, D. M., GOMES, N. A., & DOSREIS, G. A. (2005). CD40 signaling induces reciprocal outcomes in *Leishmania*-infected macrophages; roles of host genotype and cytokine milieu. *Microbes and infection*, *7*(1), 78–85.

OKWOR, I., JIA, P., & UZONNA, J. E. (2015). Interaction of macrophage antigen 1 and CD40 ligand leads to IL-12 production and resistance in CD40-deficient mice infected with *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*, *195*(7), 3218-3226.

OLIVEIRA, F. A. D., BARRETO, A. S., BOMFIM, L. G., LEITE, T. R. S., DOS SANTOS, P. L., ALMEIDA, R. P. D., ... & RIBEIRO DE JESUS, A. (2015). Soluble CD40 ligand in sera of subjects exposed to *Leishmania infantum* infection reduces the parasite load in macrophages. *PLoS One*, *10*(10), e0141265.

OVALLE-BRACHO, C., FRANCO-MUÑOZ, C., LONDOÑO-BARBOSA, D., RESTREPO-MONTOYA, D., & CLAVIJO-RAMÍREZ, C. (2015). Changes in Macrophage Gene Expression Associated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection. *PloS one*, *10*(6), e0128934.

PAES-VIEIRA, L., ROCCO-MACHADO, N., FREITAS-MESQUITA, A. L., DOS SANTOS EMILIANO, Y. S., GOMES-VIEIRA, A. L., DE ALMEIDA-AMARAL, E. E., & MEYER-FERNANDES, J. R. (2021). Differential regulation of E-NTPdases during *Leishmania amazonensis* lifecycle and effect of their overexpression on parasite infectivity and virulence. *Parasitology international*, *85*, 102423.

PANDEY, S. P., DOYEN, N., MISHRA, G. C., SAHA, B., & CHANDEL, H. S. (2015). TLR9-deficiency reduces TLR1, TLR2 and TLR3 expressions in *Leishmania major*-infected macrophages. *Experimental parasitology*, *154*, 82-86.

PANTHER, E., CORINTI, S., IDZKO, M., HEROUY, Y., NAPP, M., LA SALA, A., ... & NORGAUER, J. (2003). Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *101*(10), 3985-3990.

PAULIKAT, A. D., TÖLKEN, L. A., JACHMANN, L. H., BURCHHARDT, G., HAMMERSCHMIDT, S., & SIEMENS, N. (2022). *Streptococcus pneumoniae* Impairs Maturation of Human Dendritic Cells and Consequent Activation of CD4+ T Cells via Pneumolysin. *Journal of Innate Immunity*, 1-12.

PERES, N. T. D. A., CUNHA, L. C. S., BARBOSA, M. L. A., SANTOS, M. B., OLIVEIRA, F. A. D., JESUS, A. M. R. D., & DE ALMEIDA, R. P. (2018). Infection of human macrophages by leishmania infantum is influenced by ectonucleotidases. *Frontiers in Immunology*, 8, 1954.

PIETRELLA, D., LUPO, P., PERITO, S., MOSCI, P., BISTONI, F., & VECCHIARELLI, A. (2004). Disruption of CD40/CD40L interaction influences the course of *Cryptococcus neoformans* infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 40(1), 63-70.

PODINOVSKAIA, M., & DESCOTEAUX, A. (2015). Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future microbiology*, 10(1), 111-129.

POE, J. C., WAGNER, D. H., MILLER, R. W., STOUT, R. D., & SUTTLES, J. (1997). IL-4 and IL-10 modulation of CD40-mediated signaling of monocyte IL-1beta synthesis and rescue from apoptosis. *The Journal of Immunology*, 159(2), 846-852.

POLARI, L. P., CARNEIRO, P. P., MACEDO, M., MACHADO, P. R., SCOTT, P., CARVALHO, E. M., & BACELLAR, O. (2019). Leishmania braziliensis infection enhances toll-like receptors 2 and 4 expression and triggers TNF- α and IL-10 production in human cutaneous leishmaniasis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 120.

PONTRELLI, P., GIGANTE, M., SPADACCINO, F., NETTI, G. S., SALDARELLI, M., BALDUCCI, L., ... & RANIERI, E. (2021). CD40 Cross-Linking Induces Migration of Renal Tumor Cell through Nuclear Factor of Activated T Cells (NFAT) Activation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8871.

PORTILLO, J. A. C., LOPEZ CORCINO, Y., MIAO, Y., TANG, J., SHEIBANI, N., KERN, T. S., ... & SUBAUSTE, C. S. (2017). CD40 in retinal Müller cells induces P2X7-dependent cytokine expression in macrophages/microglia in diabetic mice and development of early experimental diabetic retinopathy. *Diabetes*, 66(2), 483-493.

PRAETORIUS, H. A., & LEIPZIGER, J. (2009). ATP release from non-excitabile cells. *Purinergic signalling*, 5(4), 433-446.

PRATTI, J., DA FONSECA MARTINS, A. M., DA SILVA, J. P., RAMOS, T. D., PEREIRA, J. C., FIRMINO-CRUZ, L., OLIVEIRA-MACIEL, D., VIEIRA, T., LACERDA, L. L., VALE, A. M., FREIRE-DE-LIMA, C. G., GOMES, D., SARAIVA, E. M., ROSSI-BERGMANN, B., & DE MATOS GUEDES, H. L. (2019). The role of TLR9 on *Leishmania amazonensis* infection and its influence on intranasal LaAg vaccine efficacy. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(2), e0007146.

PYPE, S., DECLERCQ, W., IBRAHIMI, A., MICHIELS, C., VAN RIETSCHOTEN, J. G., DEWULF, N., DE BOER, M., VANDENABEELE, P., HUYLEBROECK, D., & REMACLE, J. E. (2000). TTRAP, a novel protein that associates with CD40, tumor necrosis factor (TNF) receptor-75 and TNF receptor-associated factors (TRAFs), and that inhibits nuclear factor-kappa B activation. *The Journal of biological chemistry*, 275(24), 18586–18593.

QIAN, Y., ZHAO, Z., JIANG, Z., & LI, X. (2002). Role of NFκB activator Act1 in CD40-mediated signaling in epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(14), 9386-9391.

RAMANUJAM, M., STEFFGEN, J., VISVANATHAN, S., MOHAN, C., FINE, J. S., & PUTTERMAN, C. (2020). Phoenix from the flames: Rediscovering the role of the CD40–CD40L pathway in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Autoimmunity Reviews*, 19(11), 102668.

REICHMANN, G., WALKER, W., VILLEGAS, E. N., CRAIG, L., CAI, G., ALEXANDER, J., & HUNTER, C. A. (2000). The CD40/CD40 ligand interaction is required for resistance to toxoplasmic encephalitis. *Infection and immunity*, 68(3), 1312-1318.

RINCÓN, M., FLAVELL, R. A., & DAVIS, R. A. (2000). The Jnk and P38 MAP kinase signaling pathways in T cell–mediated immune responses. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(9), 1328-1337.

ROGERS, K. J., SHTANKO, O., STUNZ, L. L., MALLINGER, L. N., ARKEE, T., SCHMIDT, M. E., BOHAN, D., BRUNTON, B., WHITE, J. M., VARGA, S. M., BUTLER, N. S., BISHOP, G. A., & MAURY, W. (2021). Frontline Science: CD40 signaling restricts RNA virus replication in Mφs, leading to rapid innate immune control of acute virus infection. *Journal of leukocyte biology*, 109(2), 309–325.

RUSSELL, D. G., HUANG, L., & VANDERVEN, B. C. (2019). Immunometabolism at the interface between macrophages and pathogens. *Nature Reviews Immunology*, 19(5), 291-304.

SABEL, M. S., YAMADA, M., KAWAGUCHI, Y., CHEN, F. A., TAKITA, H., & BANKERT, R. B. (2000). CD40 expression on human lung cancer correlates with metastatic spread. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 49(2), 101-108.

SAMANT, M., SAHU, U., PANDEY, S. C., & KHARE, P. (2021). Role of cytokines in experimental and human visceral Leishmaniasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 624009.

SCHOENBORN, JAMIE R.; WILSON, CHRISTOPHER B. (2007) Regulation of interferon- γ during innate and adaptive immune responses. *Advances in immunology*, v. 96, p. 41-101.

SACRAMENTO, L., TREVELIN, S. C., NASCIMENTO, M. S., LIMA-JÚNIOR, D. S., COSTA, D. L., ALMEIDA, R. P., ... & CARREGARO, V. (2015). Toll-like receptor 9 signaling in dendritic cells regulates neutrophil recruitment to inflammatory foci following *Leishmania infantum* infection. *Infection and immunity*, 83(12), 4604-4616.

SAHA, B., DAS, G., VOHRA, H., GANGULY, N. K., & MISHRA, G. C. (1995). Macrophage-T cell interaction in experimental visceral leishmaniasis: failure to express costimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immunity. *European journal of immunology*, 25(9), 2492-2498.

SAKAKI, H., TSUKIMOTO, M., HARADA, H., MORIYAMA, Y., & KOJIMA, S. (2013). Autocrine regulation of macrophage activation via exocytosis of ATP and activation of P2Y11 receptor. *PloS one*, 8(4), e59778.

SAMIUL ALAM, M., & COSTALES, M. G. (2015). Cavanaugh@ fda CH, Gov CC, et al. *Extracellular adenosine generation in the regulation of pro-inflammatory responses and pathogen colonization. Biomolecules*, 5, 775-92.

SANTOS, C. D. O., COSTA, S. F., SOUZA, F. S., MENDES, J. M. F., DE PINHEIRO, C. G. M., MOREIRA, D. R. D. M., ... & DE SÁ OLIVEIRA, G. G. (2021). Blocking IL-10 signaling with soluble IL-10 receptor restores in vitro specific lymphoproliferative response in dogs with leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *Plos one*, *16*(1), e0239171.

SASAI, M., PRADIPTA, A., & YAMAMOTO, M. (2018). Host immune responses to *Toxoplasma gondii*. *International Immunology*, *30*(3), 113-119.

SASAI, M., & YAMAMOTO, M. (2019). Innate, adaptive, and cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Experimental & molecular medicine*, *51*(12), 1-10.

SAVIO, L. E. B., & COUTINHO-SILVA, R. (2019). Immunomodulatory effects of P2X7 receptor in intracellular parasite infections. *Current Opinion in Pharmacology*, *47*, 53-58.

SILVA, D., MOREIRA, D., CORDEIRO-DA-SILVA, A., QUINTAS, C., GONÇALVES, J., & FRESCO, P. (2020). Intracellular adenosine released from THP-1 differentiated human macrophages is involved in an autocrine control of *Leishmania* parasitic burden, mediated by adenosine A2A and A2B receptors. *European Journal of Pharmacology*, *885*, 173504.

SMETS, I., FIDDES, B., GARCIA-PEREZ, J. E., HE, D., MALLANTS, K., LIAO, W., ... & SAWCER, S. (2018). Multiple sclerosis risk variants alter expression of co-stimulatory genes in B cells. *Brain*, *141*(3), 786-796.

SOONG, L., XU, J. C., GREWAL, I. S., KIMA, P., SUN, J., LONGLEY JR, B. J., ... & FLAVELL, R. A. (1996). Disruption of CD40–CD40 ligand interactions results in an enhanced susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection. *Immunity*, 4(3), 263-273.

SREEKANTH, G. P., CHUNCHARUNEE, A., SIRIMONTAPORN, A., PANAAMPON, J., SRISAWAT, C., MORCHANG, A., ... & LIMJINDAPORN, T. (2014). Role of ERK1/2 signaling in dengue virus-induced liver injury. *Virus research*, 188, 15-26.

STEINBERG, T. H., & DI VIRGILIO, F. (1991). Cell-mediated cytotoxicity: ATP as an effector and the role of target cells. *Current opinion in immunology*, 3(1), 71-75.

SU, H., MCCLARTY, G., DONG, F., HATCH, G. M., PAN, Z. K., & ZHONG, G. (2004). Activation of Raf/MEK/ERK/cPLA2 signaling pathway is essential for chlamydial acquisition of host glycerophospholipids. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10), 9409-9416.

SU, N., HU, C. B., SHAO, T., JIN, C. Y., LI, H., JI, J. F., ... & SHAO, J. Z. (2021). Functional role of CD40 and CD154 costimulatory signals in IgZ-mediated immunity against bacterial infection. *Fish and Shellfish Immunology Reports*, 2, 100038.

SUBAUSTE, C. S., & WESSENDARP, M. (2006). CD40 restrains in vivo growth of *Toxoplasma gondii* independently of gamma interferon. *Infection and immunity*, 74(3), 1573-1579.

SUBAUSTE, C. S. (2009, October). CD40 and the immune response to parasitic infections. In *Seminars in immunology* (Vol. 21, No. 5, pp. 273-282). Academic Press.

SUBAUSTE, C. S. (2017). CD40, a novel inducer of purinergic signaling: Implications to the pathogenesis of experimental diabetic retinopathy. *Vision*, 1(3), 20.

SUBAUSTE, C. S. (2021). Recent Advances in the Roles of Autophagy and Autophagy Proteins in Host Cells During *Toxoplasma gondii* Infection and Potential Therapeutic Implications. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 1335.

SUNTER, J., & GULL, K. (2017). Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open biology*, 7(9), 170165.

TAVARES, N. M., ARAÚJO-SANTOS, T., AFONSO, L., NOGUEIRA, P. M., LOPES, U. G., SOARES, R. P., ... & BRODSKYN, C. (2014). Understanding the mechanisms controlling *Leishmania amazonensis* infection in vitro: the role of LTB4 derived from human neutrophils. *The Journal of infectious diseases*, 210(4), 656-666.

TONG, A. W., PAPAYOTI, M. H., NETTO, G., ARMSTRONG, D. T., ORDONEZ, G., LAWSON, J. M., & STONE, M. J. (2001). Growth-inhibitory effects of CD40 ligand (CD154) and its endogenous expression in human breast cancer. *Clinical cancer research*, 7(3), 691-703.

VALENCIA, H. J., MENDONÇA, D. C., MARINHO, P. E. S., HENRIQUES, L. R., DRUMOND, B. P., & BONJARDIM, C. A. (2022). MEK/ERK activation plays a decisive role in Zika virus morphogenesis and release.

VALINS, W., AMINI, S., & BERMAN, B. (2010). The expression of toll-like receptors in dermatological diseases and the therapeutic effect of current and newer topical toll-like receptor modulators. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, 3(9), 20.

VOGEL, D., VEREYKEN, E. J., GLIM, J. E., HEIJNEN, P. D., MOETON, M., VAN DER VALK, P., ... & DIJKSTRA, C. D. (2013). Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. *Journal of neuroinflammation*, 10(1), 1-12.

XIA, H., FAN, H., LONG, M., CHENG, J., CHEN, W., YU, D., ... & LU, Y. (2021). CD40 induces an antimicrobial response against the intracellular pathogen *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fish Diseases*, 44(1), 45-52.

WAGNER JR, D. H., STOUT, R. D., & SUTTLES, J. (1994). Role of the CD40-CD40 ligand interaction in CD4+ T cell contact-dependent activation of monocyte interleukin-1 synthesis. *European journal of immunology*, 24(12), 3148-3154.

WEAGEL, E., SMITH, C., LIU, P. G., ROBISON, R., & O'NEILL, K. (2015). Macrophage polarization and its role in cancer. *J Clin Cell Immunol*, 6(4), 338.

WEINHEBER, N., WOLFRAM, M., HARBECKE, D., & AEBISCHER, T. (1998). Phagocytosis of *Leishmania mexicana* amastigotes by macrophages leads to a sustained suppression of IL-12 production. *European journal of immunology*, 28(8), 2467-2477.

WEINKOPFF, T., MARIOTTO, A., SIMON, G., HAUYON-LA TORRE, Y., AUDERSET, F., SCHUSTER, S., ... & TACCHINI-COTTIER, F. (2013). Role of Toll-like receptor 9 signaling in experimental *Leishmania braziliensis* infection. *Infection and immunity*, 81(5), 1575-1584.

YAN, C., & RICHMOND, A. (2021). Hiding in the dark: pan-cancer characterization of expression and clinical relevance of CD40 to immune checkpoint blockade therapy. *Molecular cancer*, 20(1), 1-5.

ZANIN, R. F., BRAGANHOL, E., BERGAMIN, L. S., CAMPESATO, L. F. I., FILHO, A. Z., MOREIRA, J. C. F., ... & BATTASTINI, A. M. O. (2012). Differential macrophage activation alters the expression profile of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase. *PLoS One*, 7(2), e31205.

ZHU, W., LI, J., PAPPOE, F., SHEN, J., & YU, L. (2019). Strategies Developed by *Toxoplasma gondii* to Survive in the Host. *Frontiers in Microbiology*, 10, 899.

