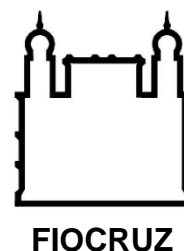




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO LPG NA ADESÃO E MIGRAÇÃO DE  
CÉLULAS HOSPEDEIRAS HUMANAS INFECTADAS POR  
*LEISHMANIA INFANTUM***

**GUSTAVO LIMA NERY**

**Salvador – Bahia  
2021**

**GUSTAVO LIMA NERY**

**IGM**  
**Avaliação do papel do LPG na adesão e migração de células hospedeiras  
humanas infectadas por *Leishmania infantum***

**2021**

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

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO LPG NA ADESÃO E MIGRAÇÃO DE  
CÉLULAS HOSPEDEIRAS HUMANAS INFECTADAS POR  
*LEISHMANIA INFANTUM***

**GUSTAVO LIMA NERY**

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Juliana Perrone Bezerra de Menezes Fullam

Dissertação apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em  
Patologia Experimental para a  
obtenção do grau de Mestre.

**Salvador – Bahia**

**2021**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

N443a Nery, Gustavo Lima.  
Avaliação do papel do LPG na adesão e migração de células hospedeiras humanas infectadas por *Leishmania infantum*. / Gustavo Lima Nery. - 2021.  
57 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dra. Juliana Perrone Bezerra de Menezes Fullam, Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro e Epidemiologia.  
Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2021.

1. Células Dendríticas. 2. Macrófagos. 3. Migração. 4. Leishmania. I. Título.

CDU 616.993.161:577.27

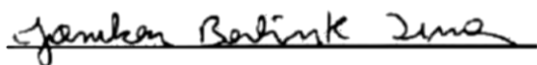
**“AVALIAÇÃO DO PAPEL DO LPG NA ADESÃO E MIGRAÇÃO DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS HUMANAS INFECTADAS POR *LEISHMANIA INFANTUM*”**

**Gustavo Lima Nery**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

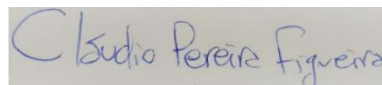
Salvador, 24 de março de 2021.

**COMISSÃO EXAMINADORA**



---

Dr. Jonilson Berlink Lima  
Professor  
UFOB



---

Dr. Cláudio Pereira Figueira  
Pesquisador  
IGM/FIOCRUZ



---

Dra. Juliana Perrone Bezerra de Menezes Fullam  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001  
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq  
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e minha família, por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado.

A minha futura esposa, Raphaela, pelo amor, carinho e por sempre me mostrar como ser uma pessoa melhor.

A minha orientadora, Juliana, pela orientação e por sempre me tranquilizar nas dificuldades.

A Amanda e Yasmin por todo o apoio durante a etapa final de experimentos e escrita.

A minha coorientadora, Dra. Beatriz Dias, pela ajuda e contribuição no trabalho.

A minha estudante de iniciação científica, Michele, pela companhia e ajuda durante todo o processo.

Aos meus amigos do LAIPHE, por serem os amigos que eu gosto e por tornarem mais fácil esses 3 anos.

A equipe de Dra. Valéria Borges, que nos cedeu as *Leishmanias* nocaute.

A Plataforma de microscopia do IGM pelos ensinamentos de microscopia e auxílio no uso dos equipamentos.

A coordenação do curso de Patologia.

A Banca, pelas contribuições e correções.

A equipe da Biblioteca do IGM.

A FAPESB, por financiar e tornar possível esse trabalho.

A todos que puderam contribuir para realização desse trabalho, sempre serei muito grato!

NERY, Gustavo Lima. Avaliação do papel do LPG na adesão e migração de células hospedeiras humanas infectadas por *Leishmania infantum*. 2021. 56 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A leishmaniose é uma zoonose causada pelo protozoário do gênero *Leishmania ssp.* que apresenta diferentes manifestações clínicas, a leishmaniose cutânea (LC) e a leishmaniose visceral (LV). A disseminação e *homing* de células infectadas contendo antígenos de *Leishmania* são fundamentais para a sobrevivência do parasito no hospedeiro e para o estabelecimento da lesão. Além de fatores do hospedeiro, fatores intrínsecos ao parasito são fatores importantes para a manutenção da infecção no hospedeiro. Estudos recentes já demonstraram a relevância da presença do LPG de *Leishmania* na interação com células hospedeiras, no mecanismo de sobrevivência do parasito, bem como no estabelecimento da infecção. Entretanto, a relação do LPG com a migração e adesão de células hospedeiras humanas ainda precisa ser elucidada. **OBJETIVO:** Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar o papel do LPG na adesão e migração de células hospedeiras humanas infectadas por *L. infantum*. **MATERIAL E MÉTODOS:** Para isso, células dendríticas e macrófagos humanos foram cultivados, infectados por *L. infantum* selvagem ou nocaute para o gene *lpg2* e submetidos à migração em sistema Transwell. Além disso, foram realizadas imunomarcações com os anticorpos para FAK e paxilina para avaliar a formação de complexos de adesão; e com anticorpos para Rac1, Cdc42, RhoA e faloidina para avaliar a polimerização de actina, utilizando microscopia confocal. **RESULTADOS:** Os resultados obtidos revelam um aumento da migração de células dendríticas após a infecção por *L. infantum* selvagem. Entretanto, observa-se uma redução da migração de células dendríticas após a infecção por *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2*, em comparação àquelas infectadas com o parasito selvagem. Os resultados mostram ainda um aumento da formação de complexos de adesão e da polimerização de actina em células dendrítica infectadas por *L. infantum* selvagem, em comparação àquelas infectadas por *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2*. Em macrófagos, observamos uma redução da migração de células infectadas por *L. infantum* selvagem. Entretanto, observa-se um aumento da migração de macrófagos após a infecção por *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2*, em



comparação àquelas infectadas com o parasito selvagem. Os resultados mostram ainda um aumento da formação de complexos de adesão em macrófagos infectados por *L. infantum* selvagem e por parasitos nocaute para o gene *lpg2*. Adicionalmente, foi observado uma redução da marcação de faloidina e Rac1 nas células infectadas por *L. infantum* selvagem e pelo parasito nocaute para o gene *lpg2*, em comparação as células não infectadas. Além disso, foi observado um aumento da expressão de RhoA nas células infectadas pela *L. infantum* selvagem, em relação a células não infectadas. Entretanto observa-se uma redução da expressão de RhoA em macrófagos infectados por *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2*, em comparação as células infectadas com o parasito selvagem. **CONCLUSÕES:** Os dados apresentados neste trabalho sugerem que o LPG de *L. infantum* apresenta um papel importante na modulação da migração de células hospedeiras humanas infectadas. Experimentos adicionais são importantes para confirmação e melhor entendimento do papel do LPG na migração de células infectadas por *L. infantum*.

**Palavras-chave:** Células Dendríticas, Macrófagos, Migração, Adesão, *Leishmania*, LPG.

NERY, Gustavo Lima. Evaluation of the role of LPG in the adhesion and migration of human host cells infected with *Leishmania infantum*. 2020. 56 f. Dissertation (Master in Pathology) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Leishmaniasis is a zoonosis caused by the protozoan parasite *Leishmania* spp., which presents different clinical manifestations such as cutaneous leishmaniasis and visceral leishmaniasis. The dissemination and homing of infected cells containing *Leishmania* antigens are crucial for the survival of the parasite inside the host and the establishment of infection. In addition to host factors, parasite factors are also important components for disease development. Recent studies have already demonstrated the relevance of LPG from *Leishmania* in host-parasite interaction, parasite survival inside the host, and the establishment of the infection. However, the role LPG plays in the migration and adhesion of human host cells is unknown. **AIM:** Thus, the main goal of this work is to evaluate the role of LPG in the adhesion and migration of human host cells infected by *L. infantum*. **MATERIAL AND METHODS:** For this, human dendritic cells and macrophages obtained from healthy donors were cultivated and infected by wildtype *L. infantum* or parasites knockout for the *lpg2* gene and submitted to migration using a transwell system. Additionally, we evaluated the formation of adhesion complexes through p-FAK and p-paxillin expression, the polymerization of the actin by phalloidin, and essential proteins in this process such as Cdc42, Rho and Rac-1, using confocal microscopy. **RESULTS:** Our results show an increase in the migration of dendritic cells after infection by wildtype *L. infantum*. However, there was a reduction in the migration of dendritic cells infected by *L. infantum* *lpg2* knockout when compared to those infected with the wildtype parasites. We also showed an increase in the adhesion complexes formation and polymerization of the actin cytoskeleton in dendritic cells infected by wildtype *L. infantum* when compared to those infected with the *lpg2* knockout parasites. On the other hand, we found a reduction in the migration of macrophages infected by wildtype *L. infantum*. However, there was an increase in the migration of macrophages infected by *L. infantum* *lpg2* knockout when compared to those infected with the wildtype parasites. Also, we found an increase in the adhesion complexes formation in macrophages

infected by wildtype *L. infantum* and parasites lpg2 knockout. We also show a reduction in phalloidin and Rac1 expression in macrophages infected by wildtype *L. infantum* and lpg2 knockout parasites compared to noninfected cells. We also found an increase in RhoA expression in macrophages infected by wild-type *L. infantum* compared to uninfected cells. However, there was a reduction in RhoA expression in macrophages infected by lpg2 knockout parasites when compared to those infected by the wildtype parasites. **CONCLUSIONS:** In conclusion, our results suggest that LPG from *L. infantum* is important for the modulation induced by these parasites in human host cells. Further experiments should be performed to confirm and better understand LPG's role in host cell migration during *L. infantum* infection.

**Keywords:** Dendritic Cells, Macrophages, Migration, Adhesion, *Leishmania*, LPG.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Manifestações clínicas da leishmaniose .....	17
<b>Figura 2.</b> Ciclo biológico da <i>Leishmania sp.</i> ....	18
<b>Figura 3.</b> Estrutura do LPG da <i>Leishmania</i> .....	20
<b>Figura 4.</b> Esquema das etapas da migração celular .....	25
<b>Figura 5.</b> Complexo de adesão .....	26
<b>Figura 6.</b> Avaliação da migração de células dendríticas na infecção por <i>Leishmania</i> .....	33
<b>Figura 7.</b> Avaliação da formação de complexos de adesão em células dendríticas infectadas por <i>Leishmania</i> .....	35
<b>Figura 8.</b> Avaliação da polimerização de actina em células dendríticas infectadas por <i>Leishmania</i> .....	38
<b>Figura 9.</b> Avaliação da migração de macrófagos na infecção por <i>Leishmania</i> .....	41
<b>Figura 10.</b> Avaliação da formação de complexos de adesão em macrófagos infectados por <i>Leishmania</i> .....	42
<b>Figura 11.</b> Avaliação da polimerização de actina em macrófagos infectados por <i>Leishmania</i> .....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABPs</b>	Actin Binding Proteíns
<b>BOD</b>	Biochemical Oxygen Demand
<b>CCL2/MCP-1</b>	Monocyte Chemoattractant Protein-1
<b>CCL3/MIP-1<math>\alpha</math></b>	Proteína 1- $\alpha$ Inflamatória de Macrófago
<b>CDC42</b>	Cell Division Cycle 42
<b>CDS</b>	Células Dendríticas
<b>FAK</b>	Focal Adhesion Kinase
<b>GIPLs</b>	Glicosilinositolfosfolípídeos
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
<b>GP63</b>	Glicoproteína De 63 Kda
<b>GPI</b>	Glicosilfosfatidilinositol
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon Gama
<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>LC</b>	Leishmaniose Cutânea
<b>LMC</b>	Leishmaniose Muco-Cutânea
<b>LPG</b>	Lipofosfoglicano
<b>LV</b>	Leishmaniose Visceral
<b>PBMC</b>	Peripheral Blood Mononuclear Cell
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PFA</b>	Paraformaldeído
<b>PPGs</b>	Proteofosfoglicanos
<b>RAC1</b>	Rac Family Small Gtpase 1
<b>RhoA</b>	Ras Homolog Family Member A
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute Medium
<b>sAP</b>	Fosfatases Ácidas Secretadas
<b>SBF</b>	Soro Bovino Fetal
<b>PGs</b>	Polímeros Livres De Fosfoglicanos
<b>TH1</b>	T Helper 1

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1	LEISHMANIOSE .....	13
1.2	CICLO BIOLÓGICO DA <i>LEISHMANIA</i> .....	14
1.3	MACRÓFAGOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS NA INFECÇÃO POR <i>LEISHMANIA</i> .....	15
1.4	LIPOFOSFOGLICANO (LPG).....	16
1.4.1	<b>Uso da edição gênica para estudo do LPG</b> .....	18
1.4.2	<b>Outras moléculas de superfície da <i>Leishmania</i></b> .....	19
1.5	MIGRAÇÃO CELULAR.....	20
1.5.1	<b>Adesão celular</b> .....	22
1.5.2	<b>Citoesqueleto de actina e Rho GTPases</b> .....	23
2	<b>JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE</b> .....	24
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	27
3.1	OBJETIVO GERAL.....	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
4.1	COMITÊ DE ÉTICA .....	27
4.2	SEPARAÇÃO DE PBMC E CULTIVO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E MACRÓFAGOS.....	27
4.3	CULTIVO DE PARASITOS E INFECÇÃO .....	28
4.4	AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS HUMANAS INFECTADAS POR <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> .....	28
4.5	AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE ADESÃO EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS HUMANAS INFECTADAS POR <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> .....	28
4.6	AVALIAÇÃO DA POLIMERIZAÇÃO DE ACTINA EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS HUMANAS INFECTADAS POR <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> .....	29

5	<b>RESULTADOS</b> .....	30
5.1	MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR <i>L. INFANTUM</i> SELVAGEM OU NOCAUTE PARA O GENE <i>Ipg2</i> .....	30
5.2	FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE ADESÃO EM DENDRÍTICAS INFECTADAS POR <i>L. INFANTUM</i> SELVAGEM OU NOCAUTE PARA O GENE <i>Ipg2</i> .....	32
5.3	AVALIAÇÃO DA POLIMERIZAÇÃO DE ACTINA EM CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR <i>L. INFANTUM</i> SELVAGEM OU NOCAUTE PARA O GENE <i>Ipg2</i> .....	35
5.4	MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS POR <i>L. INFANTUM</i> SELVAGEM OU NOCAUTE PARA O GENE <i>Ipg2</i> .....	38
5.5	FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE ADESÃO EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR <i>L. INFANTUM</i> SELVAGEM OU NOCAUTE PARA O GENE <i>Ipg2</i> .....	39
5.6	AVALIAÇÃO DA POLIMERIZAÇÃO DE ACTINA EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR <i>L. INFANTUM</i> SELVAGEM OU NOCAUTE PARA O GENE <i>Ipg2</i> .....	41
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	43
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	48
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	49

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 LEISHMANIOSE

A leishmaniose é uma zoonose urbana e periurbana causada pelo protozoário do gênero *Leishmania ssp.*, sendo transmitida para o hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo dos flebotomíneos fêmeas. Estima-se que 350 milhões de pessoas estão em risco de adquirir leishmaniose no mundo e cerca de 2 milhões de novos casos são identificados anualmente. Esta zoonose é classificada como uma doença negligenciada que acomete principalmente países em desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

A leishmaniose apresenta diferentes manifestações clínicas: a leishmaniose cutânea (LC), que frequentemente tem progressão limitada e geralmente cura espontânea e a leishmaniose visceral (LV), que é a forma mais grave da doença, podendo levar a morte quando não tratada (DESJEUX, 2004). Em estudo realizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2016, dentre os 25 países que apresentavam número de casos elevados de leishmaniose, 13 deles apresentavam número total elevado de casos reportados apenas para LV e os outros 11 apenas para LC, sendo o Brasil o único que apresentou para ambas as manifestações. Dentre as manifestações clínicas, a LC é classificada como a mais comum, tendo nas Américas um total de 940.396 casos (PAHO, 2018). Nesta forma clínica, as lesões são encontradas em regiões que são expostas a picada do flebótomo e inicialmente apresentam pápulas eritematosas, com cerca de 1 a 10 mm de diâmetro, que posteriormente formam as úlceras arredondadas com bordas bem definidas (Figura 1A) (ARENAS et al., 2017). Classificada como a forma mais grave, a LV teve nas Américas 59.769 casos registrados no período de 2001 a 2017, gerando uma média anual de 3.516 casos e sendo endêmica em 12 países (PAHO, 2018).





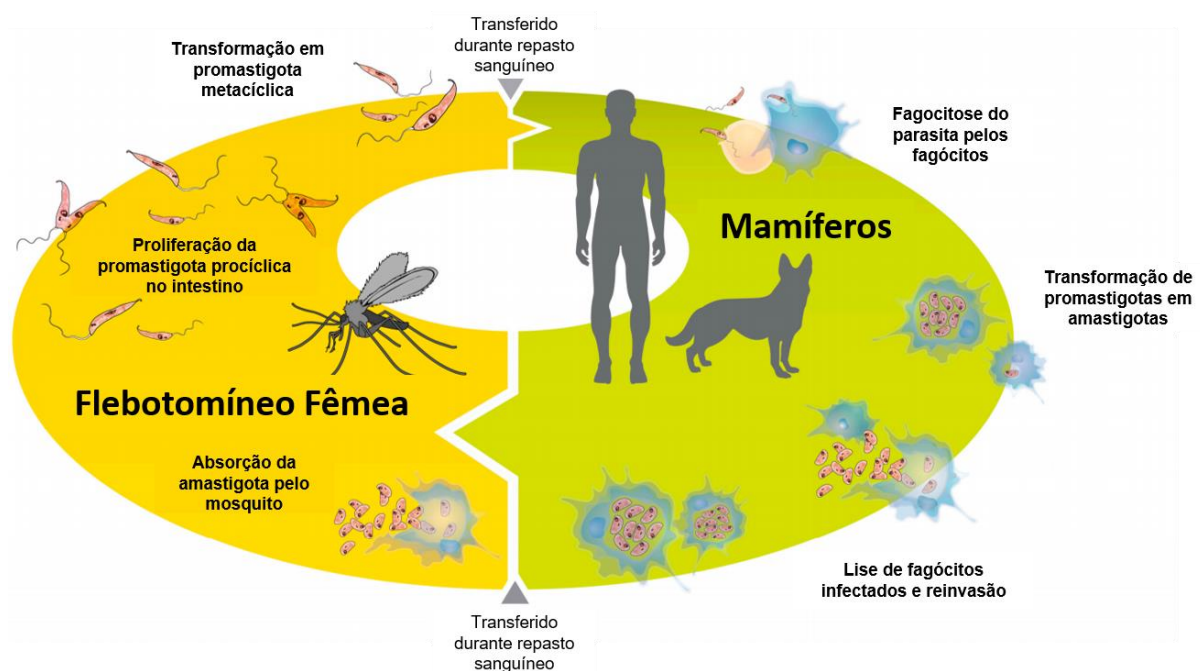
**Figura 1 – Manifestações clínicas da leishmaniose.** A leishmaniose é classificada com base na fisiopatologia, aspecto e localização da lesão. A doença geralmente apresenta diferentes manifestações clínicas: a leishmaniose cutânea (LC), que frequentemente tem progressão limitada e geralmente cura espontânea e a leishmaniose visceral (LV), que é a forma mais grave da doença (DESJEUX, 2004). (Imagens adaptadas de ARENAS et al., 2017 e [www.paho.org](http://www.paho.org))

## 1.2 CICLO BIOLÓGICO DA *LEISHMANIA*

As diferentes formas da leishmaniose estão associadas primariamente à espécie do parasito e a condições inerentes ao hospedeiro. Em todas as formas da leishmaniose, a infecção se inicia com a inoculação de formas promastigotas do parasito na pele do hospedeiro por diferentes espécies de flebotomíneos. No hospedeiro vertebrado, após ser reconhecido pelo macrófago ou células dendríticas, o parasito é internalizado e, no interior dessas células, as formas promastigotas sofrem transformações moleculares e estruturais dando origem às formas amastigotas. Nesse estágio de desenvolvimento, o parasito é obrigatoriamente intracelular e capaz de sobreviver e se multiplicar no interior de compartimentos fagolisossomais, denominados de vacúolos parasitóforos (ALEXANDER; RUSSELL, 1992). No interior dessas células, o parasito dissemina-se pelos diferentes tecidos do hospedeiro causando lesões (FIORINI; MESSINA; BARRACCHIA, 2002; LEÓN; LÓPEZ-BRAVO; ARDAVÍN, 2007; MOLL et al., 1993).

A partir de um hospedeiro vertebrado infectado, ocorre a infecção do flebotomíneo fêmea durante o repasto sanguíneo. As formas amastigotas ingeridas chegam ao intestino médio, onde sofrem transformações moleculares, transformando-

se na forma promastigota procíclica, que se multiplica por divisão binária. Progressivamente, durante o processo de diferenciação, denominado metaciclogênese, surgem formas promastigotas metacíclicas, estágio não proliferativo e com alta capacidade infectiva. Estas formas migram para a região do intestino anterior do vetor podendo ser transmitidas para um novo hospedeiro vertebrado durante segundo repasto sanguíneo. Em seguida, as formas promastigotas são internalizadas por células fagocíticas do hospedeiro vertebrado, reiniciando seu ciclo de vida (BATES, 2007; GUPTA; NISHI, 2011).



**Figura 2 - Ciclo biológico da *Leishmania sp.*** O ciclo biológico da leishmaniose tem início durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo fêmea, inoculando o hospedeiro vertebrado com formas promastigotas do parasita. Células mononucleares, como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, fagocitam e no interior de vacúolos parasitóforos o parasita sofre modificações e se multiplica, rompendo a membrana celular e promovendo a infecção de novas células (Adaptado de Veras e Menezes, 2016).

### 1.3 MACRÓFAGOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS NA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA*

Na infecção por *Leishmania*, os macrófagos são as principais células hospedeiras, tendo papel importante tanto na resistência contra o parasita como também na imunopatologia da doença (PRINA et al., 2017). No interior destas células, os parasitos são capazes de sobreviver por longo período e se multiplicar no interior

de compartimentos chamados de vacúolos parasitóforos (AFRIN; KHAN; HEMEG, 2019). A interação entre macrófagos e as diversas espécies de *Leishmania* é bastante complexa, tendo em vista que os parasitas expressam em sua superfície diferentes ligantes que podem interagir com múltiplos receptores da célula hospedeira, levando a diferentes desfechos para a infecção (MOSSER; ROSENTHAL, 1993; MOSSER; MILES, 2007). Os macrófagos participam diretamente do processo de reconhecimento, contenção e eliminação da *Leishmania*, através de suas funções imunes inatas e da indução da resposta Th1 (PRINA et al., 2017). Mesmo sendo uma célula apresentadora de antígeno, os macrófagos infectados por *Leishmania* não secretam a IL-12, importante citocina para a indução da resposta do tipo TH1 (VON STEBUT et al., 1998; KIMA ET AL., 1996). Além disso, a *Leishmania* desenvolveu mecanismos capazes de burlar o sistema imune e tornar possível a proliferação e disseminação do parasito no hospedeiro (PRINA ET AL., 2017; SHIO et al., 2011).

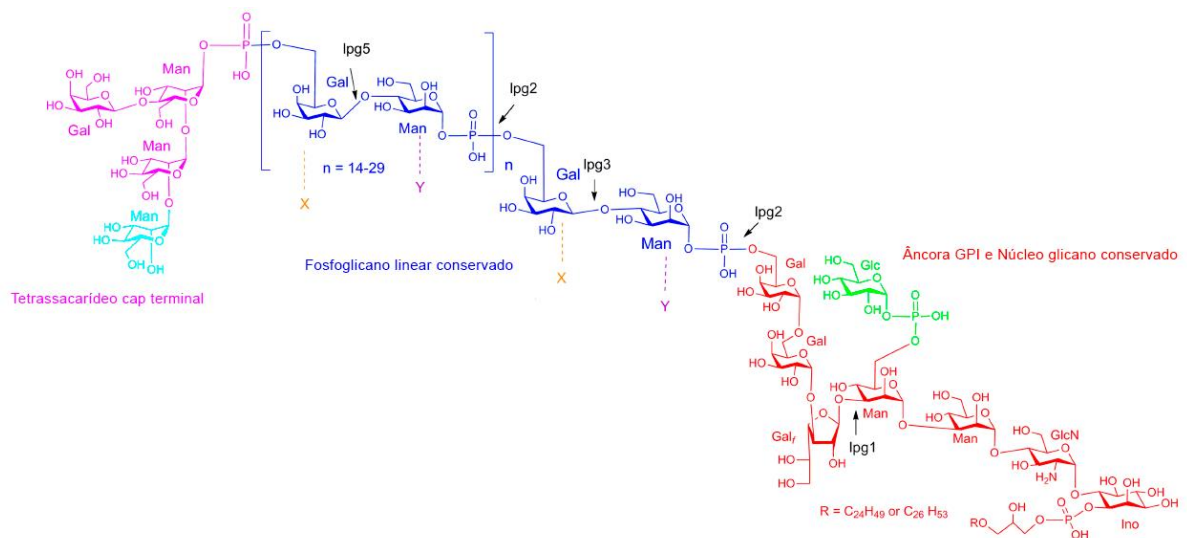
As células dendríticas são leucócitos derivados de células progenitoras da medula que são altamente heterogêneas e que estão presentes em todo o corpo, incluindo órgãos de filtração e órgãos linfoides (LIU and UZONNA, 2012; BANCHERAU et al., 2000). No tecido, estas células estão no estado imaturo e apresentam propriedades fagocíticas (BANCHERAU et al., 2000). As células imaturas, ao capturarem e processarem antígenos, tendem a migrar para o linfonodo para apresentar antígenos a linfócitos T (BARRAGAN et al., 2012). Interessantemente, dentre as populações de CDs, algumas são mais suscetíveis do que outras e essa infectividade diferente entre populações aparenta estar inversamente correlacionado com a capacidade de produção de IL-12 por parte dessas células infectadas (MAROVICH et al., 2000; HENRI ET AL., 2002). Adicionalmente, foi demonstrado que células dendríticas derivadas de monócitos são importantes para estabelecimento de uma resposta imune eficiente contra *Leishmania* (ASHOK; ACHA-ORBEA, 2014).

#### 1.4 LIPOFOSFOGLICANO (LPG)

Todos os parasitos da família Trypanosomatidae, assim como a *Leishmania*, são revestidos por uma camada formada por glicoconjugados, chamada glicocálice, que tem como principal função a interface do parasito com estruturas externas (SMITH; RANGARAJAN, 1995). A camada externa destes parasitos apresenta uma composição bastante variada, entretanto todas as moléculas da membrana da família Trypanosomatidae possuem uma ancora lipídica altamente conservada, o

glicosilfosfatidilinositol (GPI) (FORESTIER; GAO; BOONS, 2014). Na superfície das fases promastigotas metacíclicas e procíclicas da *Leishmania*, o LPG é o glicoconjugado mais abundante, estando presente em toda a superfície do parasita. Entretanto, na fase amastigota, está praticamente ausente (DE ASSIS et al., 2012).

O LPG é um glicoconjugado formado por quatro domínios: uma âncora lipídica de fosfatidilinositol, um núcleo fosfossacarídeo, uma região sacarídica fosforilada repetitiva e uma pequena região “cap” composta por oligossacarídeos (Figura 3) (DE ASSIS et al., 2012). A âncora de GPI é composta pelas seguintes estruturas: um 1-O-álquil-2-liso-fosfatidilinositol com uma cadeia alifática saturada única; um “core” glicano, que é um heptassacarídeo formado por dois galactopiranosídeos, um galactofuranosídeo, dois manosídeos e um resíduo de glucosamina ligado ao inositol (FORESTIER; GAO; BOONS, 2014). Os polimorfismos encontrados na estrutura do LPG vêm sendo bastante estudados bioquimicamente e podem ter um papel importante na especificidade das espécies de *Leishmania* com os inúmeros vetores (DE ASSIS et al., 2012; DESCOTEAUX; TURCO, 1999).



**Figura 3 – Estrutura do LPG da *Leishmania*.** Representação detalhada da estrutura molecular composta por quatro domínios, uma âncora GPI e um núcleo glicano que estão representados em vermelho, uma sequência linear de fosfoglicano, representada em azul e uma sequência terminadora “cap” representada em magenta. Os genes responsáveis pelos diferentes estágios de montagem molecular são rotulados como (lpg1, lpg2, lpg3 e lpg5). Gal, galactose; Man, mannose; Glc, glucose; Galf, galactofuranose; GlcN, glucosamine; Ino, Inositol (Adaptada de Forestier, 2015).

Em todas as espécies de *Leishmania*, o núcleo glicano, a âncora lipídica e as porções lineares do LPG são regiões que não apresentam alterações. Entretanto existem alterações relacionadas a forma do parasita e relacionadas a espécie (FORESTIER; GAO; BOONS, 2014). Essas alterações estão presentes na região “cap” terminal e nas cadeias laterais (DE ASSIS et al., 2012). Na *Leishmania infantum*, existem polimorfismos nas cadeias laterais, onde há adições de  $\beta$ Glc ao carbono C3 nos resíduos Gal. Essas variações ocorrem entre cepas da espécie *L. infantum*, gerando 3 tipos de cadeias laterais (COELHO-FINAMORE et al., 2011). O tipo I, que não apresenta substituições nas cadeias laterais; o tipo II, que possui somente uma adição de  $\beta$ Glc e o tipo III, que contém dois ou três substituições de  $\beta$ Glc (IBRAIM et al., 2013).

O papel do LPG já foi descrito na literatura em diversos pontos do ciclo de vida da *Leishmania* (SPÄTH et al., 2003a). Na etapa do hospedeiro invertebrado, o LPG é essencial em algumas espécies de *Leishmania* na ligação das formas promastigotas ao intestino médio do flebótomo e importante para a sobrevivência, protegendo o parasito contra destruição enzimática ou proteolítica (FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, 2012). Após o repasto sanguíneo e infecção do hospedeiro vertebrado, o LPG impede que o parasito seja lisado pelo sistema complemento, além de modular a síntese de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, impedir a fosforilação da p38 MAP quinase, interagir com receptores Toll-like (TLR) e também modular a síntese de citocinas (CHANDRA; NAIK, 2008; KAVOOSI; ARDESTANI; KARIMINIA, 2009; PUENTES et al., 1990).

#### **1.4.1 Uso da edição gênica para estudo do LPG**

Estudos avaliaram a importância do LPG como fator de virulência da *Leishmania* através principalmente da utilização do LPG purificado em ensaios *in vitro* ou de parasitas editados geneticamente para vias da biossíntese do LPG (FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, 2012). Entretanto, o uso da molécula purificada apresenta algumas desvantagens, como a dificuldade da obtenção de um purificado livre de contaminantes, da alta complexidade dos métodos de purificação e da discrepância entre a quantidade do LPG utilizada através do método *in vitro* e em condições fisiológicas. Portanto, o uso de métodos de edição genética se torna a forma mais adequada para avaliar a função e atividade do LPG (FORESTIER; GAO; BOONS, 2014).

Após serem descritos, os genes relacionados com a via de biossíntese do LPG nos protozoários do gênero *Leishmania*, foi possível produzir cepas nocautes para os genes *lpg1*, *lpg2*, *lpg3* e *lpg5* que levaram a inibição da expressão do LPG na superfície do parasito (FORESTIER; GAO; BOONS, 2014). O *lpg1* é responsável por codificar a glactofuranosiltransferase que tem a papel na produção do núcleo glicano do LPG. Com a cepa nocaute para o *lpg1*, alguns estudos foram capazes de revelar a importância do LPG na interação do parasito com o vetor e com o hospedeiro vertebrado (LODGE; DESCOTEAUX, 2005; SPÄTH et al., 2003a; SVÁROVSKÁ et al., 2010). Os estudos mostraram que cepas de *L. donovani* e *L. major* nocaute (*lpg1*<sup>-/-</sup>) são incapazes de inibir a fusão do fagossomo com o lisossomo, são susceptíveis a lise mediada pelo sistema complemento e não possuem resistência ao estresse oxidativo (FORESTIER; GAO; BOONS, 2014; FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, 2012). Outros trabalhos mostraram que cepas de *L. donovani* nocaute para o gene *lpg2* provoca uma redução no nível de infecção no fígado e baço de camundongos e torna a *Leishmania* incapaz de proliferar no interior de macrófagos murinos (GAUR et al., 2009). Para parasitos nocaute de *L. major* foi observado uma redução na síntese da citocina IL-4, IFN- $\gamma$  e IL-10 em células murinas e ausência do desenvolvimento de lesões cutâneas em ensaio *in vivo* (UZONNA et al., 2004). Entretanto, em nocautes para os genes *lpg1* e *lpg2* de *L. mexicana*, não foi observado uma redução na infecção tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo* (ILG, 2000; ILG; DEMAR; HARBECKE, 2001). Desta forma, é possível questionar o papel do LPG nas diversas espécies de *Leishmania*.

#### **1.4.2 Outras moléculas de superfície da *Leishmania***

Na superfície dos protozoários do gênero *Leishmania*, além do LPG, existem outras moléculas como os glicosilinositolfosfolipídeos (GIPLs), os proteofosfoglicanos (PPGs), os polímeros livres de fosfoglicanos (PGs), as fosfatases ácidas secretadas (sAP) e a gp63. Assim como o LPG, essas moléculas são importantes no contexto da interação parasito-hospedeiro.

Os GIPLs são um conjunto de glicolipídios que não fazem ligações com proteínas ou polissacarídeos e possuem baixo peso molecular. Estão altamente expressos tanto na forma promastigota como na forma amastigota e possuem poliformismos em sua estrutura. Alguns trabalhos evidenciaram que os GIPLs estão relacionados com a modulação negativa da produção de óxido nítrico em macrófagos

infectados por *L. major* (DE ASSIS et al., 2012; GUHA-NIYOGI; SULLIVAN; TURCO, 2001). Já os PPGs, os PGs e as sAP, são moléculas que, assim como o LPG, apresentam unidades repetitivas de fosfoglicano e tem papel importante na interação parasito-hospedeiro e na sobrevivência do parasito no ambiente intracelular, tendo sua expressão também afetada pelo nocaute no gene *lpg2* (MA et al., 1997; SPÄTH et al., 2003b). Além dessas moléculas, a gp63 é a mais importante glicoproteína da forma promastigota da *Leishmania*, tendo 63kDa de massa molecular e dependência de zinco, também está expressa na forma amastigota, em menor quantidade, e se concentra na bolsa flagelar do parasito (GUHA-NIYOGI; SULLIVAN; TURCO, 2001). O papel da GP63 no ciclo da *Leishmania* ainda não é bem definido, mas por ser proteoliticamente ativa contra diversos substratos, pode estar relacionada com a degradação de macromoléculas e desempenhar papel de ligante para receptores de macrófagos e impedir a lise mediada por complemento (GUHA-NIYOGI; SULLIVAN; TURCO, 2001).

### 1.5 MIGRAÇÃO CELULAR

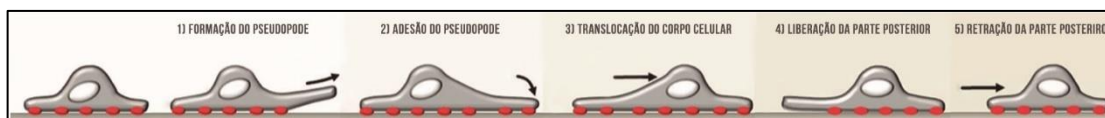
A migração celular é um processo fundamental presente em diversos organismos que envolve a interação e adesão da célula ao substrato por estruturas conhecidas como contatos focais ou adesões focais (JONES; BRUNTON; FRAME, 2000; VICENTE-MANZANARES; WEBB; HORWITZ, 2005). Em macrófagos, essas estruturas de contato podem ser de duas formas: complexos focais, que são estruturas semelhantes a contatos focais, mas sem fibras de estresse (ALLEN et al., 1997) ou podossomos, que são estruturas circulares distintas, restritas à linhagem mielóide e relacionadas com a degradação proteolítica da matriz extracelular (CORREIA et al., 1999; DEFIFE et al., 1999; WIESNER et al., 2014).

O processo migratório é um mecanismo cíclico que envolve diversos eventos organizados que promovem o deslocamento da célula e está envolvido com a homeostase do organismo, estando relacionado com o reparo tecidual, a vigilância imunológica e vários outros processos, além de também estar relacionado com processos patológicos (RIDLEY et al., 2003). Em resposta a um agente promotor da migração, a célula polariza e projeta protusões, conhecidas como lamelipódios ou filopódios, da região anterior para a direção da migração (1). Em seguida, as protusões aderem a matriz extracelular ou células adjacentes através de estruturas chamadas complexos focais (2). Esses pontos de adesão servirão para a contração da

actomiosina citoplasmática, direcionando a célula para o novo ponto de adesão (3). Os complexos focais na parte posterior da célula são então desfeitos, liberando o corpo da célula (4). Por fim, ocorre a retração da parte posterior (RIDLEY et al., 2003; WIESNER et al., 2014).

No âmbito da infecção por protozoários do gênero *Leishmania*, alguns estudos mostraram que em um ambiente bidimensional, a migração de macrófagos após a infecção por *Leishmania* é reduzida (BLEWETT; KADIVAR; SOULSBY, 1971; BRAY et al., 1983). Adicionalmente, outros autores mostram que a infecção por *Leishmania* altera a função de moléculas envolvidas com a adesão, tais como a VLA-4 e a beta-1 integrina, que são moléculas importantes para a migração macrofágica nos tecidos e na composição de sinapses imunológicas, levando a redução da adesão de macrófagos e possível disseminação in vivo do parasita (CARVALHAL et al., 2004; FIGUEIRA et al., 2015; PINHEIRO et al., 2006). Em concordância com esses trabalhos, um estudo realizado por de Menezes e colaboradores (2016) mostra uma redução da migração de macrófagos após a infecção por *L. amazonensis*. Adicionalmente, demonstra que a redução da migração observada nestas células após a infecção independe da carga parasitária, da expansão do vacúolo parasitóforo e de fatores solúveis liberados pelas células infectadas, mas envolve a modulação da expressão de moléculas sinalizadoras envolvidas em adesão celular, tais como paxilina e sua fosforilação, além da fosforilação de FAK (DE MENEZES; SARAIVA; DA ROCHA-AZEVEDO, 2016). Já para células dendríticas, que são células apresentadoras profissionais de antígeno, foi mostrado que a migração para o linfonodo tem papel importante na geração da resposta imune a leishmaniose (GORAK; ENGWERDA; KAYE, 1998; VON STEBUT et al., 1998). Além disso, foi mostrado que *L. amazonensis* pode reduzir a migração em células dendríticas murinas (HERMIDA et al., 2014) e que a redução da migração na infecção por *L. major* é provocada pelo bloqueio de moléculas de adesão (BALLET et al., 2014). Por outro lado, já foi descrito que células infectadas por *L. major* estimulam a expressão de receptores de quimiocinas promovendo a migração em resposta ao estímulo do CCL21 (STEIGARD & MOLL, 2005). Na infecção por *L. infantum*, foi observado que há um aumento na migração de células dendríticas, indicando um possível papel das CDs no processo de visceralização da doença (REBOUÇAS, 2020).



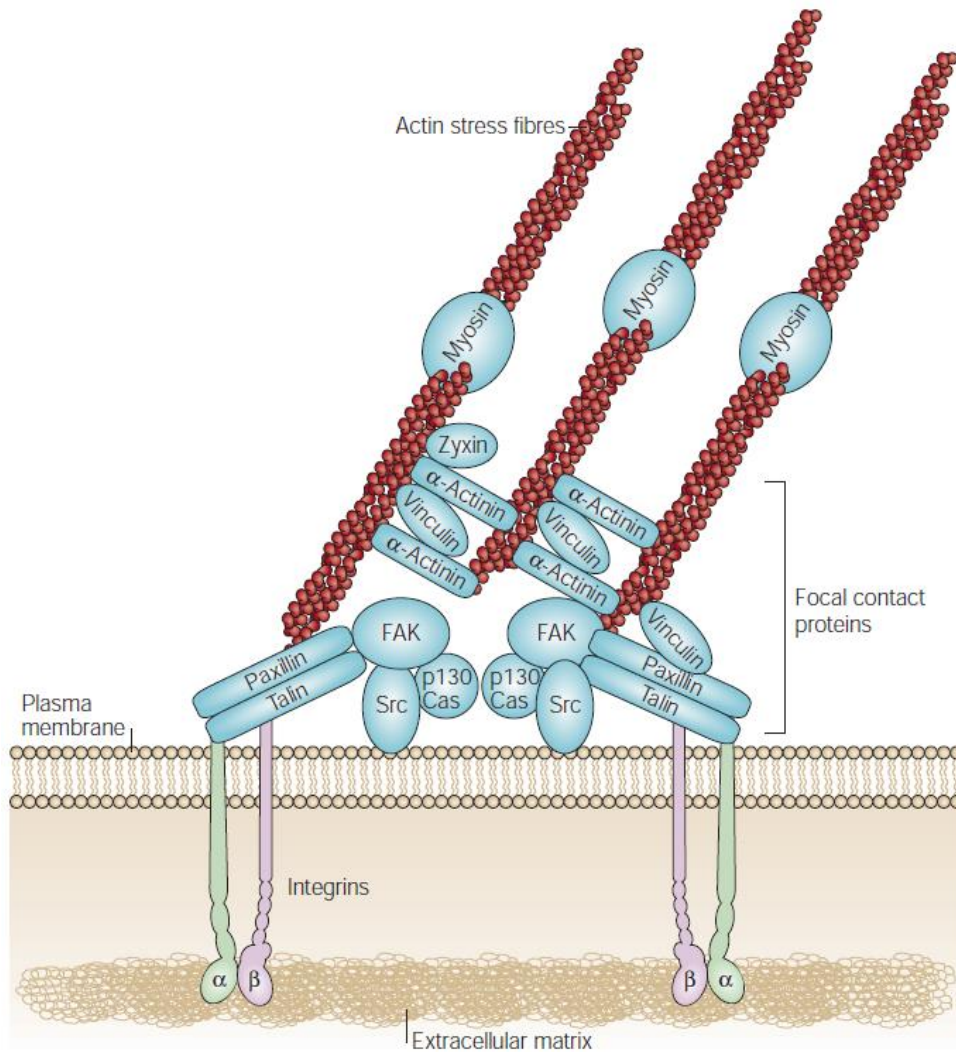


**Figura 4 – Esquema das etapas da migração celular.** O processo de migração celular é dividido em diversas etapas: formação da protrusão de membrana; adesão ao substrato; contração e desprendimento da parte posterior (Adaptado, WIESNER et al., 2014).

### 1.5.1 Adesão celular

Durante o processo de migração celular, dois mecanismos principais ocorrem de forma coordenada: a polimerização e reorganização do citoesqueleto de actina e a formação de complexos de adesão (ZAMIR; GEIGER, 2001). O complexo de adesão é uma estrutura complexa formada por cerca de 125 proteínas. Uma delas é a paxilina, que desempenha um papel fundamental na migração celular se associando a diversas proteínas de sinalização, como FAK, outras quinases e ativadores e efetores de pequenas GTPases (BROWN; TURNER, 2004; TACHIBANA et al., 1995; TURNER, 2000; TURNER; GLENNEY; BURRIDGE, 1990). Alguns estudos mostraram que fibroblastos embrionários de camundongos (MEFs) deficientes em paxilina apresentam defeitos no *spreading* e migração celular, remodelamento de adesões focais e formação de lamelipódios estáveis (WADE; BOHL; VANDE POL, 2002; WEBB et al., 2004). Foi mostrado ainda que a fosforilação de paxilina por FAK em Y31 e Y118 regula a motilidade celular e possibilita a interação com proteínas contendo domínios SH-2 (ROMANOVA et al., 2004; SCHALLER; PARSONS, 1995). Além disso, outros trabalhos mostraram que o bloqueio da interação da paxilina com a FAK provoca uma redução na adesão e na capacidade de invasão e migração de fibroblastos (DEREMAUDT, 2014).

Os mecanismos envolvidos na adesão de macrófagos infectados por parasitos intracelulares, como por exemplo *Leishmania*, e as moléculas envolvidas neste processo ainda são pouco conhecidos. Estudos anteriores mostraram que a infecção por *Leishmania* reduz a adesão de macrófagos e altera a função de moléculas envolvidas em adesão, como VLA-4, uma das moléculas relevantes para a migração macrofágica nos tecidos e que compõem sinapses imunológicas (CARVALHAL et al., 2004; PINHEIRO et al., 2006). Entretanto, pouco se conhece sobre a biologia celular da adesão e migração de células infectadas por *Leishmania*.



**Figura 5 - Complexo de adesão.** O complexo de adesão é uma estrutura formada por cerca de 125 proteínas, responsáveis pela comunicação entre as moléculas transmembranas, chamadas integrinas, e os filamentos de actina presentes no citoplasma (Wiesner, 2014).

### 1.5.2 Citoesqueleto de actina e Rho GTPases

O movimento celular é um mecanismo celular importantíssimo em inúmeros processos biológicos, incluindo a vigilância imunológica, morfogênese embrionária, angiogênese e separação e regeneração tecidual. O citoesqueleto de actina é fundamental para este processo, mediando a formação de estruturas celulares como lamellipodia, filopodia, fibras de estresse e adesões focais (BANERJEE; GARDEL; SCHWARZ, 2020; LEE; DOMINGUEZ, 2010).

Das proteínas que constroem a estrutura física da célula, a actina é sem dúvida a mais importante. Possui 42 kDa e sua principal característica é que sua forma monomérica (globular ou G-actina) pode se ligar a filamentos polares (filamentoso ou F-actina), que possui duas extremidades estruturalmente e bioquimicamente distintas. Estes filamentos podem formar diferentes estruturas na célula, incluindo redes ramificadas, malhas e feixes interligados e feixes de contração (BANERJEE; GARDEL; SCHWARZ, 2020). Em células eucarióticas, a actina é caracterizada por quatro subdomínios, sendo que o ATP tem afinidade com o subdomínio 3 e 4 (DOMINGUEZ, 2004). A polimerização dos filamentos acontece de acordo com três etapas: primeiramente ocorre a união das subunidades formando um agregado, caracterizando a etapa de nucleação; em seguida, novas subunidades são acrescentadas nas extremidades do filamento, etapa de alongamento; e por fim temos a etapa de equilíbrio, na qual para equilibrar a estrutura formada ocorre a dissociação de monômeros (HOLMES et al., 1990; EGELMAN et al., 1985). Os filamentos de actina são controlados e modulados em células por cerca de cem proteínas atreladas a eles (proteínas de ligação à actina – ABPs). A actina e as proteínas que se ligam a actina (ABPs) necessitam de ATP como fonte de energia para realizar adequadamente suas funções (BANERJEE; GARDEL; SCHWARZ, 2020). Dentre as ABPs podemos destacar as GTPases da família Rho que servem como interruptores moleculares dependentes de GTP. Dentre elas, podemos citar a Cdc42, Rac e RhoA, que controlam respectivamente a formação de filopódio, lamelipódio e fibras de estresse (LEE; DOMINGUEZ, 2010; POLLARD; BORISY, 2003; TAMBE et al., 2011; WU et al., 2009).

## **2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE**

A OMS classifica a leishmaniose como uma das mais importantes doenças tropicais negligenciadas. A doença é endêmica em quase todos os continentes, estimando-se que 12 milhões de indivíduos estejam infectados por *Leishmania* e que 350 milhões de indivíduos corram risco de serem infectados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). No Brasil, a leishmaniose cutânea é endêmica, sendo registrados cerca de 12.690 mil novos casos por ano, além da forma visceral da doença, que apresenta 3.200 mil novos casos por ano (PAHO, 2018).

Durante o ciclo de vida da *Leishmania*, os parasitos interagem com uma diversidade de tipos celulares, entretanto, pode-se destacar macrófagos e células dendríticas (GREGORY et al., 2005). Macrófagos são as principais células hospedeiras da *Leishmania*. No interior destas células, os parasitos sobrevivem e se multiplicam (PRINA et al., 2017). Células dendríticas são células apresentadoras profissionais de antígeno responsáveis pelo processamento e apresentação de antígenos à linfócitos T naive. Adicionalmente, a migração de células dendríticas para o linfonodo inicia a resposta imune e, associado a isso, estudos mostram o papel importante das DC na geração da resposta imune a leishmaniose (GORAK; ENGWERDA; KAYE, 1998; VON STEBUT et al., 1998).

A disseminação e *homing* de células infectadas contendo antígenos de *Leishmania* são fundamentais para a sobrevivência deste parasito no hospedeiro e para o estabelecimento da lesão e, ainda hoje, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na adesão da célula hospedeira e sua migração na infecção por este protozoário. Sabe-se que diferentes patógenos são capazes de modular a migração de células hospedeiras (BRAY et al., 1983; CARVALHAL et al., 2004; DE MENEZES et al., 2017; PINHEIRO et al., 2006; KANATANI AT AL., 2017). Em estudo realizado anteriormente, foi observada uma redução da migração de macrófagos após a infecção por *L. amazonensis*, associada a redução da formação de complexos de adesão e alteração da dinâmica de actina. Adicionalmente, em trabalho recente desenvolvido pelo nosso grupo, foi mostrado um aumento da migração de células dendríticas humanas infectadas por *L. infantum*, mas não por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, associada ao aumento da expressão de proteínas envolvidas em formação de complexos de adesão, assim como sua fosforilação. Mostramos ainda um aumento da polimerização de filamentos de actina e da expressão de CCR7 nas células infectadas por *L. infantum* (REBOUÇAS et al., 2020).

Além de fatores do hospedeiro, fatores intrínsecos ao parasito são componentes importantes para a manutenção da infecção no hospedeiro vertebrado (FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, 2012). Estudos recentes já demonstraram a relevância da presença do LPG de *Leishmania* na interação com células hospedeiras, no mecanismo de sobrevivência do parasito, bem como no estabelecimento da infecção (SCHLEIN; SCHNUR; JACOBSON, 1990). Entretanto, não se conhece o papel do LPG de *Leishmania* na adesão e migração de células do hospedeiro infectadas por

este parasito. Assim, para melhor entender os mecanismos inerentes ao parasito e sua associação com a migração e disseminação de células infectadas, este trabalho propõe avaliar o papel do fator de virulência LPG na adesão e migração de células dendríticas humanas infectadas por *Leishmania*. Utilizamos parasitos de *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2* e avaliamos o processo de adesão e migração de macrófagos e células dendríticas humanas infectadas por estes parasitos. Nossa hipótese é que o *lpg2* de *L. infantum* participa na modulação da migração de células dendríticas infectadas, mas não de macrófagos, contribuindo para a apresentação de antígenos em linfonodos drenantes, e para a disseminação da doenç a em hospedeiros vertebrados. Na leishmaniose, a relação entre disseminação do parasito e enfermidade é particularmente estreita. Estudos para melhor entender o processo de adesão e migração celular e sua relação com a sobrevivência intracelular do parasito e disseminação da doenç a são fundamentais para a concepção de novas estratégias terapêuticas contra a leishmaniose.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o papel do LPG na adesão e migração de células hospedeiras humanas infectadas por *L. infantum*.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a migração de células hospedeiras humanas infectadas por *L. infantum* selvagem ou nocaute para o gene *lpg2*;
- Investigar a formação de complexos de adesão em células hospedeiras humanas infectadas por *L. infantum* selvagem ou nocaute para o gene *lpg2*;
- Determinar a dinâmica de actina em células hospedeiras humanas infectadas por *L. infantum* selvagem ou nocaute para o gene *lpg2*.

### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1 COMITÊ DE ÉTICA**

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisas (CEP) do Instituto Gonçalo Moniz, conforme parecer de número 2.751.354 e segue com os princípios de ética na pesquisa definidos pela Resolução CNS 466/12 II.4.

#### **4.2 SEPARAÇÃO DE PBMC E CULTIVO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E MACRÓFAGOS**

Células mononucleares do sangue periférico de doadores saudáveis foram obtidas por separação de PBMC (células polimorfonucleares de sangue periférico) em Ficoll-Hystopaque (Sigma- Aldrich). Para a diferenciação em células dendríticas, os monócitos foram separados utilizando coluna magnética (MACS Mylteni Biotec) para isolamento de células CD14+, que então foram ressuspensas e plaqueadas em RPMI com GM-CSF [50ng/mL] + IL-4 [100UI/mL] (Peprotech) por 7 dias para diferenciação em células dendríticas. Já para a diferenciação em macrófagos, foi permitido que os monócitos coletados aderissem por 30 minutos em meio RPMI sem soro fetal bovino. Em seguida, foram removidas as células não aderentes e substituído o meio por RPMI completo contendo 10% de soro fetal bovino. A cada 2 dias, 50% do meio foi renovado para manutenção da cultura e após um total de 7 dias os macrófagos estavam prontos para utilização.

#### 4.3 CULTIVO DE PARASITOS E INFECÇÃO

Promastigotas de *L. infantum* (MCAN/BR/89/BA262) selvagens derivadas de amastigotas isoladas de baço de hamsters Golden Syrian, *L. Infantum* nocaute para o gene *lpg2* e reconstituídas com o gene *lpg2* (*add back*), disponibilizadas pelo grupo de Dra. Valéria Borges e Dr. Leonardo Paiva, foram cultivadas em meio Homem em estufa B.O.D. a 24°C. Para o cultivo da *L. infantum add back*, foi adicionado ao meio Homem 1µl do antibiótico Zeocin (Invitrogen – Carlsbad, CA) para cada mL de meio, com o objetivo de manutenção do fenótipo. Após cultura atingir a etapa estacionária de crescimento, os parasitos foram utilizados para realização dos experimentos até a 7ª passagem.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS HUMANAS INFECTADAS POR *LEISHMANIA INFANTUM*

A avaliação da migração de células hospedeiras humanas infectadas ou não por *Leishmania* selvagem, nocaute ou *add back* para o gene *lpg2* foi avaliada na presença de CCL3 para dendríticas e de CCL2 para macrófagos, utilizando câmaras Transwell com membranas de policarbonato (24 poços, 5µm Corning® Transwell® polycarbonate membrane cell culture inserts). Células infectadas ou não, na concentração de  $2 \times 10^5$  células, foram plaqueadas nos insertos por 4 horas, lavadas com PBS e fixadas com PFA 4%. A parte superior da membrana foi raspada com swab, a fim de remover as células que não migraram. Em seguida, as membranas foram removidas do inserto com auxílio de um bisturi. As membranas removidas foram então montadas em lâminas e posteriormente, coradas com ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen) para marcação nuclear. A análise da migração das células foi realizada de forma randômica pela contagem do núcleo de células que atravessaram a membrana do inserto da transwell (10 campos aleatórios por grupo), com auxílio de microscópio de fluorescência, em aumento de 100x com óleo de imersão (Olympus – DMI8).

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE ADESÃO EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS HUMANAS INFECTADAS POR *LEISHMANIA INFANTUM*

A avaliação da formação do complexo de adesão de células hospedeiras humanas infectadas ou não com *Leishmania* selvagem, nocaute ou *add back* para o gene *lpg2* foram realizadas através de ensaio de imunomarcação. As células foram

lavadas e fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e foi adicionado NH<sub>4</sub>Cl (50mM) em agitação por mais 20 minutos. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1X por 5 minutos e permeabilizadas com PBS-Saponina 0,15% em agitação por 15 minutos. Após o período de permeabilização, foi feito o bloqueio com PBS-Saponina 0,15%/BSA 3% por uma hora. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS-Saponina 0,15% e incubadas com anti-p-paxilina 1:100 ou anti-p-FAK 1:500 (pY<sup>118</sup>) (Invitrogen) por 1 hora. Posteriormente, as células foram lavadas 3 vezes e incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit Alexa Fluor 552 (Molecular Probes) por no mínimo 30 minutos. Por fim, as células foram lavadas e as lamínulas montadas em lâminas utilizando ProLong™ Gold Antifade Mountant com DAPI (Invitrogen) [10 mg/mL] para marcação nuclear. As imagens foram adquiridas em microscópio confocal Leica SP8 (Leica) em z-stack e feito o processamento de projeção máxima. As intensidades de fluorescência das 30 células adquiridas por grupo foram quantificadas individualmente utilizando o software ImageJ.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA POLIMERIZAÇÃO DE ACTINA EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS HUMANAS INFECTADAS POR *LEISHMANIA INFANTUM*

A avaliação da polimerização de actina de células hospedeiras humanas infectadas ou não com *Leishmania* selvagem, nocaute ou *add back* para o gene *lpg2* foram realizadas através de ensaio de imunomarcação. As células foram lavadas e fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e foi adicionado NH<sub>4</sub>Cl (50mM) em agitação por mais 20 minutos. Depois, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1X por 5 minutos e permeabilizadas com PBS-Saponina 0,15% em agitação por 15 minutos. Após o período de permeabilização, foi feito o bloqueio com PBS-Saponina 0,15%/BSA 3% por uma hora. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS-Saponina 0,15% e incubadas com anti-Rac-1, anti-RhoA, anti-Cdc42 (Invitrogen) por 1 hora. Posteriormente, as células foram lavadas 3 vezes e incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit Alexa Fluor 552 (Molecular Probes) ou anti-mouse Alexa Fluor 552 (Molecular Probes) e Faloidina (Invitrogen) por no mínimo 30 minutos. Por fim, as células foram lavadas e as lamínulas montadas em lâminas utilizando ProLong™ Gold Antifade Mountant com DAPI (Invitrogen) [10 mg/mL] para marcação nuclear. As imagens foram adquiridas em microscópio confocal Leica SP8 (Leica) em z-stack e



feito o processamento de projeção máxima. As intensidades de fluorescência das 30 células adquiridas por grupo foram quantificadas individualmente utilizando o software ImageJ.

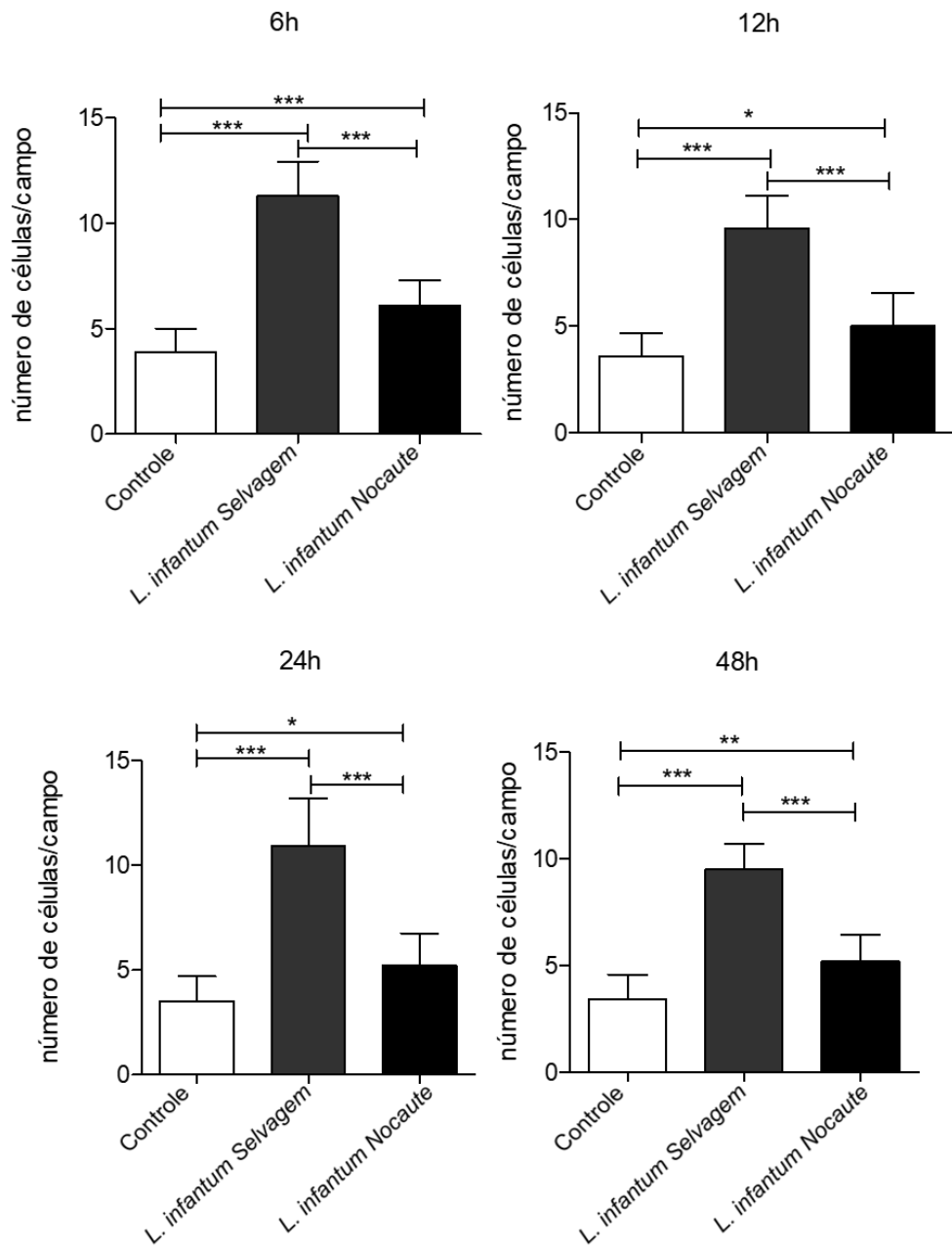
#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os gráficos e a análise estatística foram realizados utilizando o software GraphPad Prism, versão 8.0 e os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilke e D'Agostino e Person. Para a comparação entre grupos com distribuição normal, foi utilizado o teste *t* de Student e os gráficos foram representados em barras. Para os dados que não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste de Mann-Whitney (teste U) e os gráficos foram representados em violino. Os dados foram considerados estatisticamente significante quando apresentaram o valor de  $p < 0,05$ .

### 5. RESULTADOS

#### 5.1 MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR *L. INFANTUM* SELVAGEM OU NOCAUTE PARA O GENE LPG2

Para avaliar a migração de células dendríticas infectadas ou não por *L. infantum* selvagem ou nocaute para o gene *lpg2*, foram realizados ensaios de migração direcional na presença do quimioatratador específico (CCL3), utilizando câmaras Transwell. Os resultados mostram que nos tempos de 6, 12, 24 e 48 horas houve um aumento na migração das células dendríticas infectadas pela *L. infantum* selvagem quando comparadas ao grupo infectado com o *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2* e ao controle não infectado (Figura 6).



**Figura 6 - Avaliação da migração de células dendríticas na infecção por *Leishmania*.** Células dendríticas foram infectadas por *L. infantum* selvagem ou nocaute para o gene *lpg2* por 4 horas. E após o tempo de infecção, foi feita a cinética com os tempos de 6, 12, 24 ou 48h, as células foram submetidas a migração com CCL3/MIP-1 $\alpha$  em sistema *Transwell* por adicionais 4 horas. Os insertos foram lavados, fixados e marcados com Prolong antifade com DAPI para montagem das lâminas. As células migrantes, que se encontravam na parte inferior do inserto, foram contadas (10 campos aleatórios) em microscópio de fluorescência convencional. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  (teste de *t* student). Resultado representativo de 1 experimento.

## 5.2 FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE ADESÃO EM DENDRÍTICAS INFECTADAS POR *L. INFANTUM* SELVAGEM OU NOCAUTE PARA O GENE LPG2

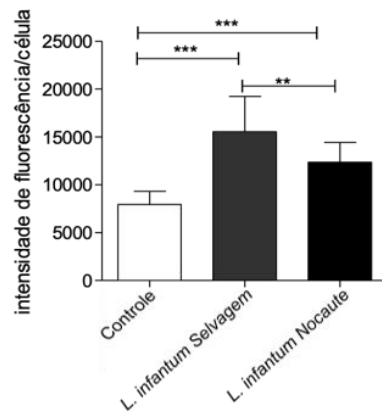
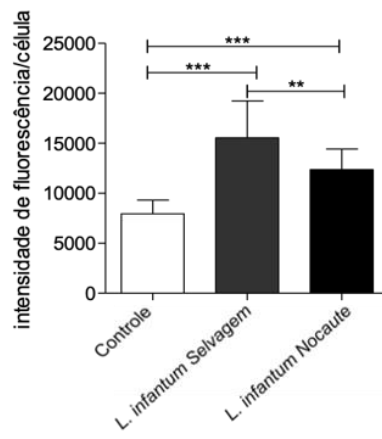
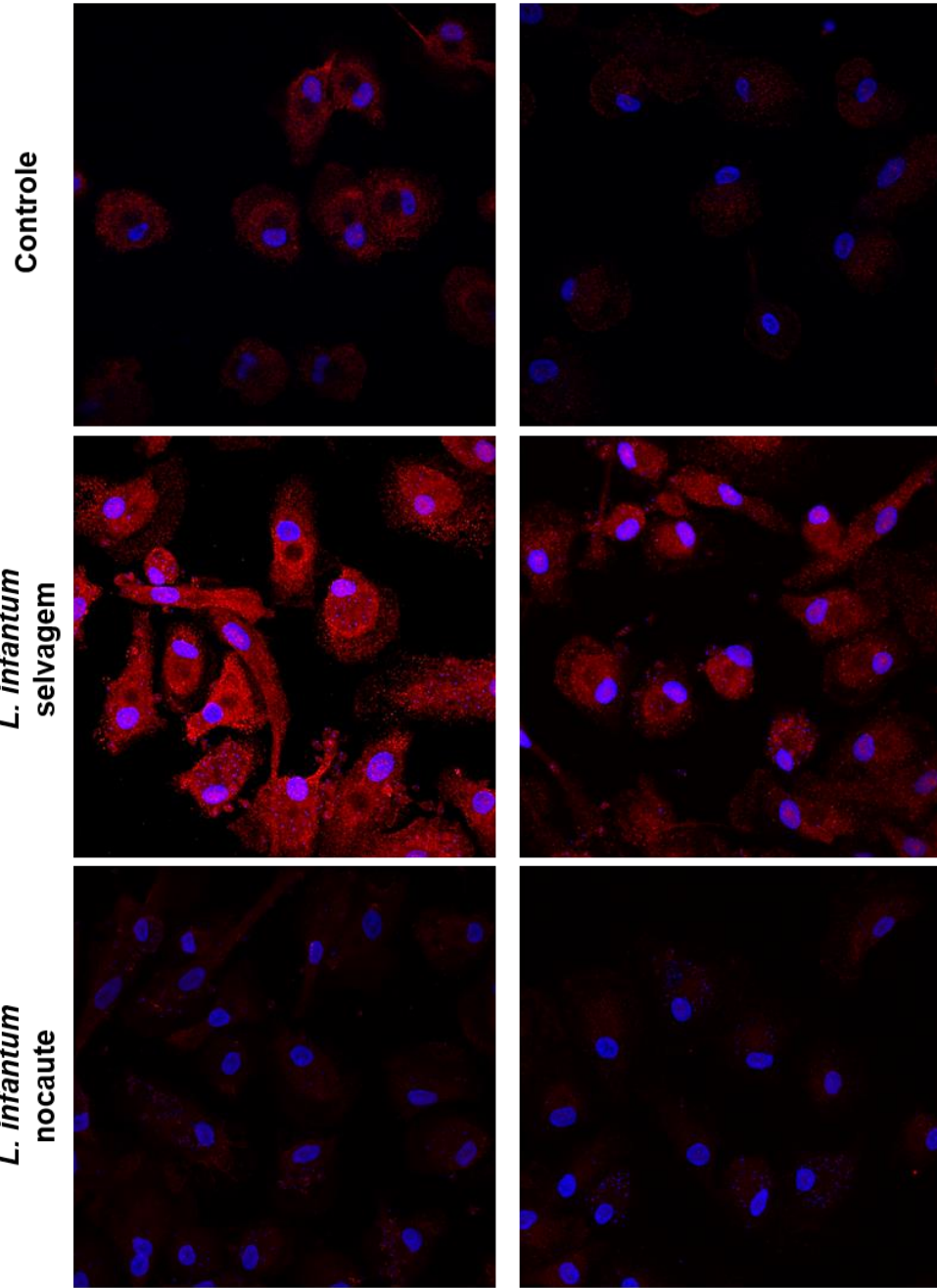
Para a avaliação da formação dos complexos de adesão em células dendríticas humanas infectadas ou não por *L. infantum* selvagem ou nocaute para o gene *lpg2*, foi realizada a imunomarcagem das células utilizando anticorpos específicos para FAK e paxilina fosforilada e, em seguida, foi feita a análise por microscopia confocal e quantificação através do software ImageJ. Os resultados mostram um aumento na expressão de FAK e paxilina em células dendríticas infectadas por *L. infantum* selvagem quando comparadas àquelas infectadas por *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2* e ao grupo controle não infectado (Figura 7A).

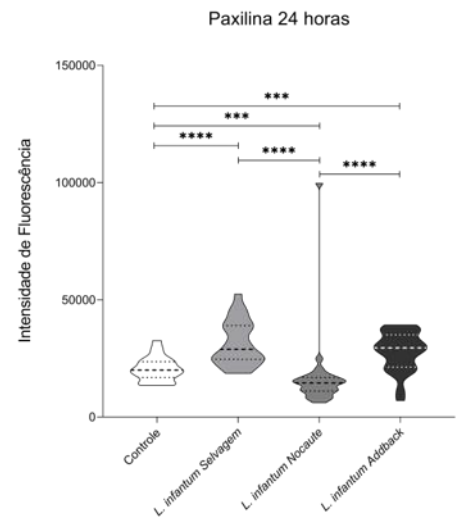
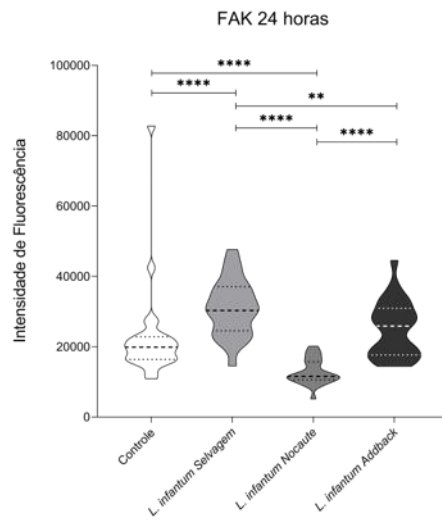
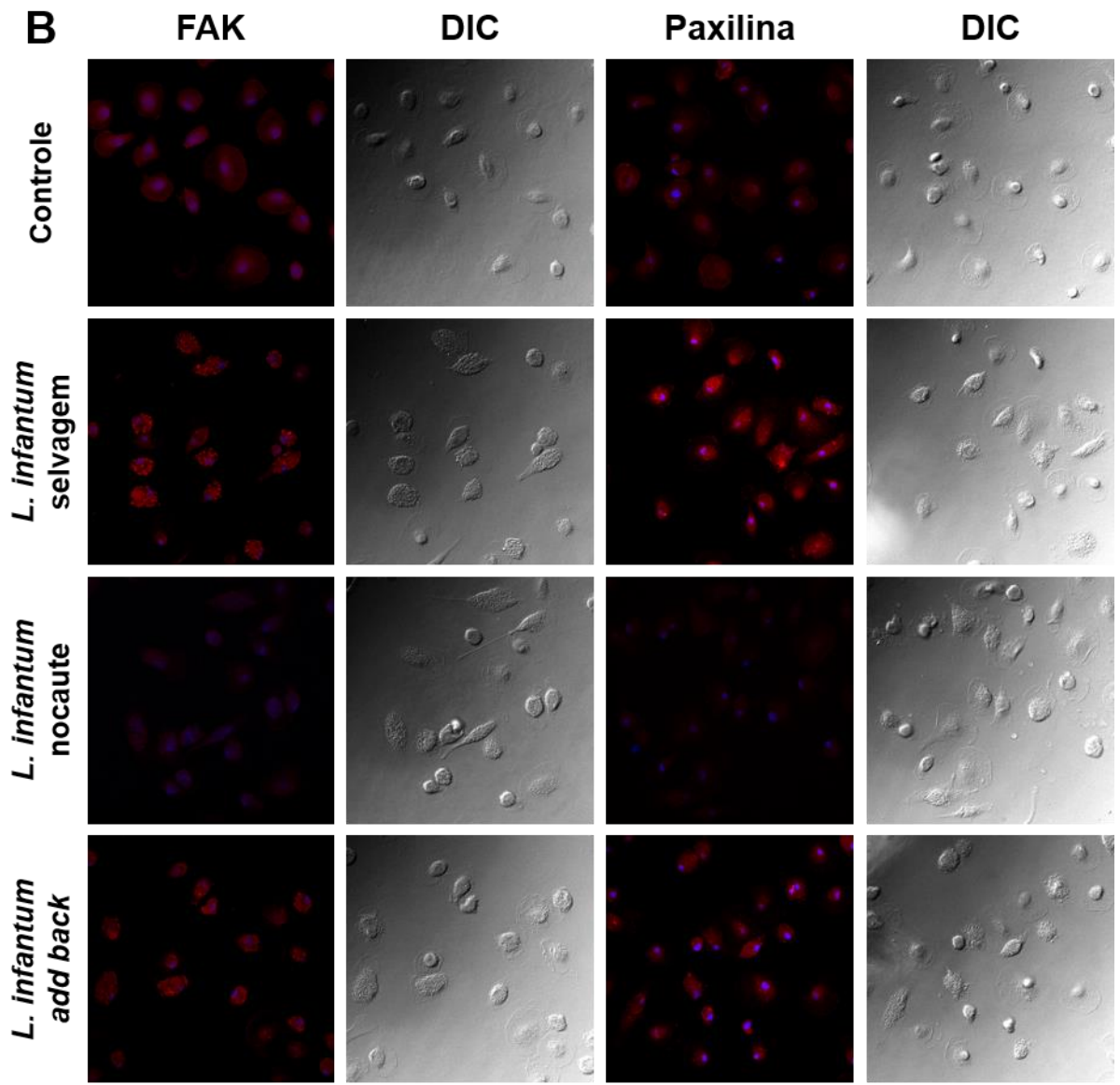
Foram realizados ainda ensaios adicionais de avaliação da formação do complexo de adesão com adição de um grupo de células infectadas com o parasito *add back*. Os resultados mostram um aumento na expressão de FAK e paxilina em células dendríticas infectadas por *L. infantum* selvagem, quando comparadas às células infectadas com *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2* e ao grupo controle não infectado. Os resultados mostram ainda que as células infectadas por *L. infantum add back* apresentaram uma expressão de FAK e paxilina maior do que aquelas infectadas por *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2* (Figura 7B).

**A**

**FAK**

**Paxilina**



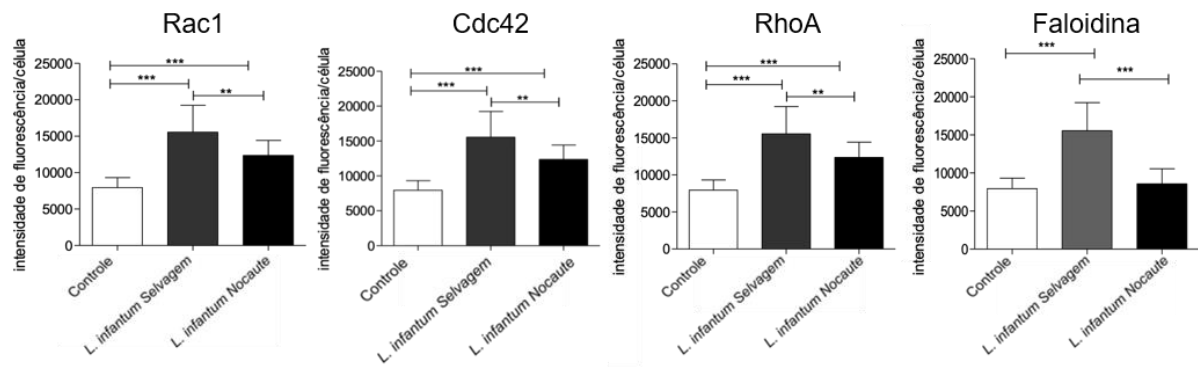
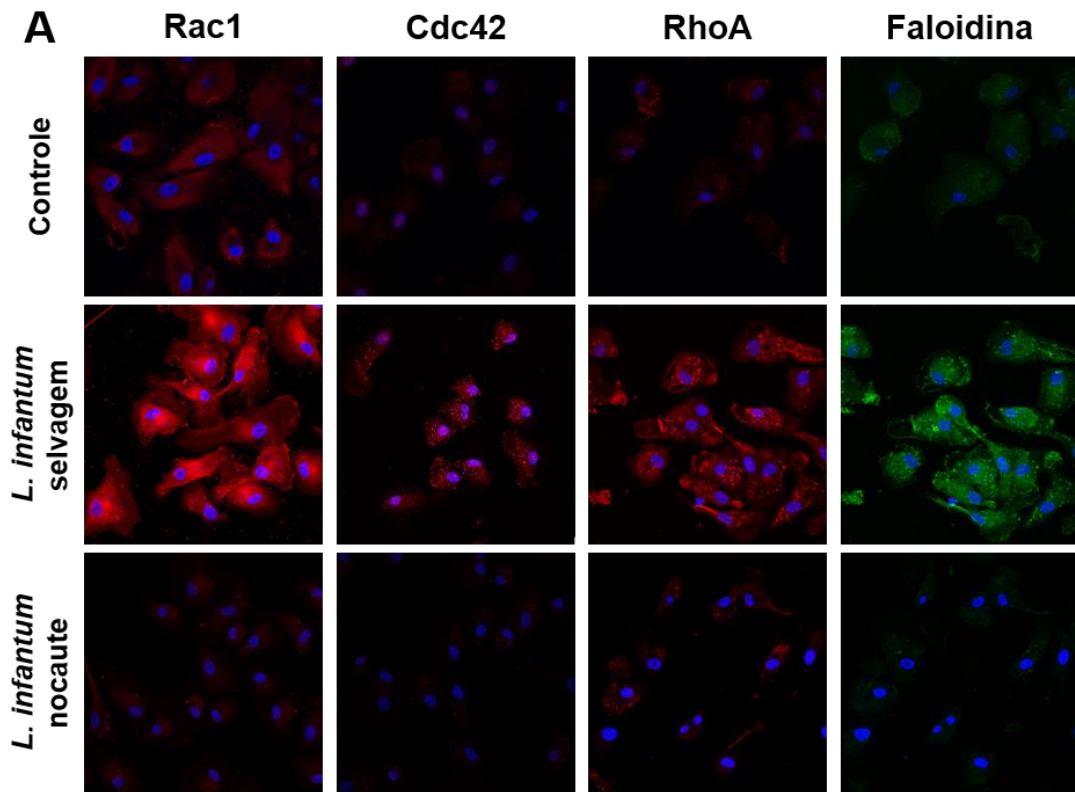


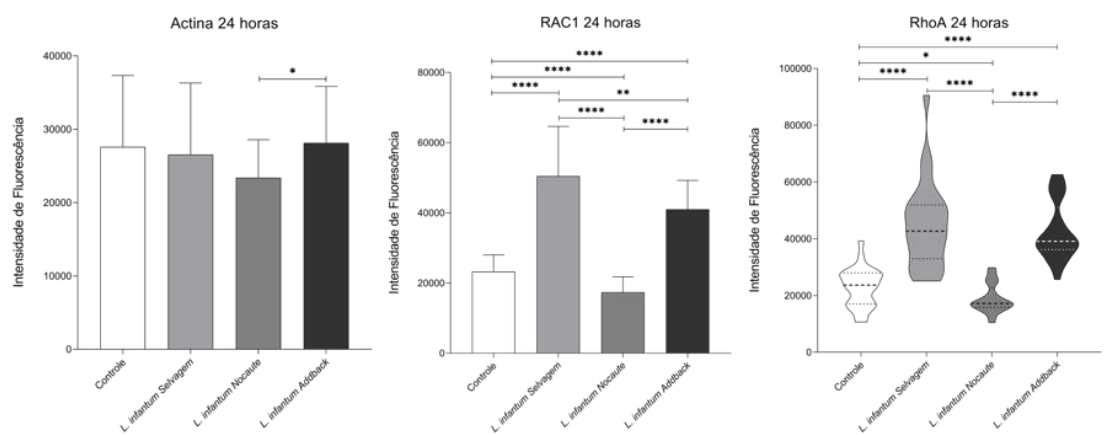
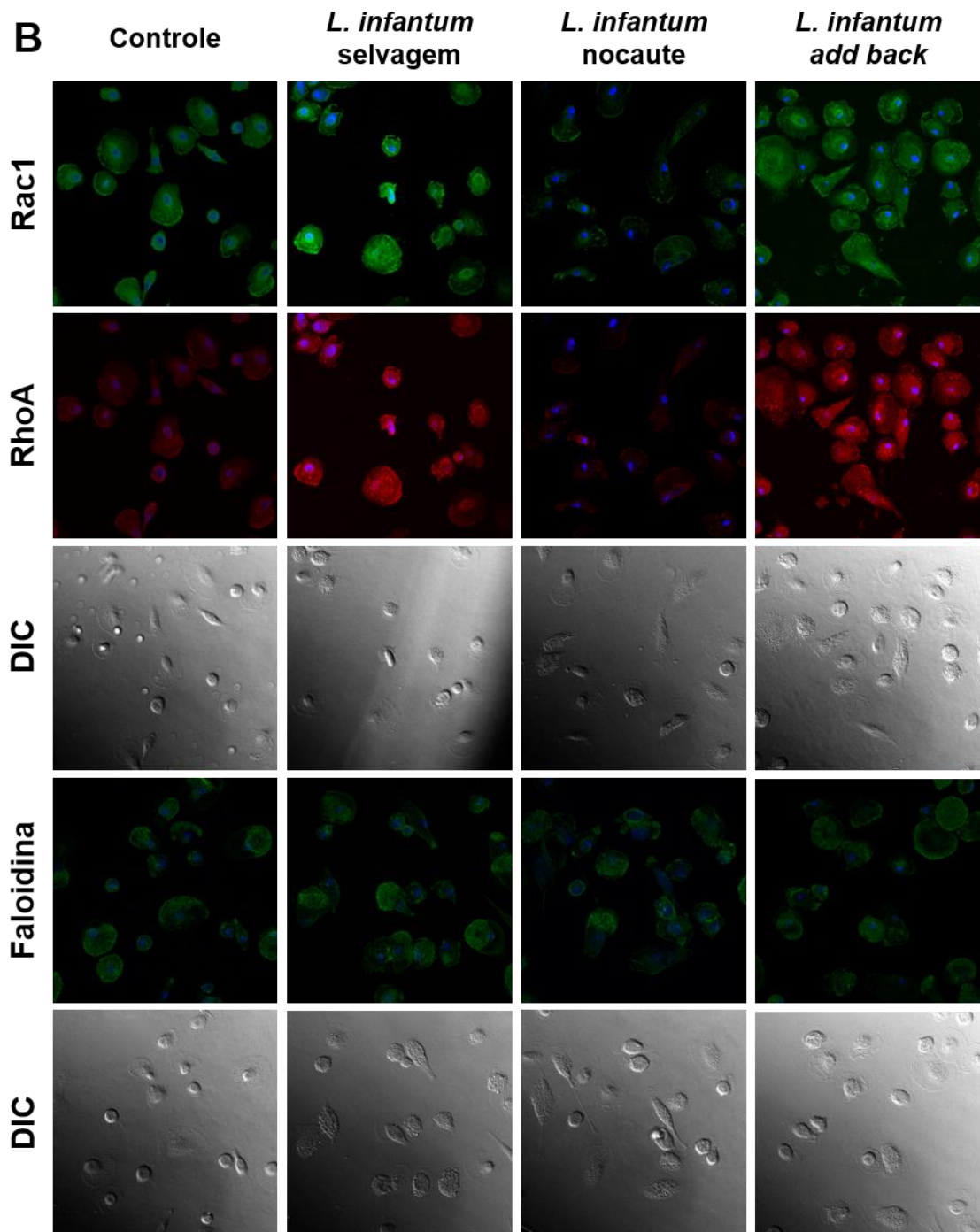
**Figura 7 - Avaliação da formação de complexos de adesão em células dendríticas infectadas por *Leishmania*.** Células dendríticas infectadas por *L. infantum* selvagem (A, B), nocaute para o gene *lpg2* (A, B) ou *add back* (B) por 4 horas e foram marcadas com anticorpo anti-FAK e anti-paxilina fosforiladas. Foram quantificadas de 25 a 30 células para cada grupo utilizando o software ImageJ. Vermelho - anti-FAK ou paxilina fosforilada; azul – DAPI. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; ; \*\*\*\*,  $p < 0,001$  (teste de *t* student). Os ensaios com dados paramétricos foram representados em graficos de barra e os não paramétricos com gráficos de violino. Resultado representativo de 2 experimentos. A e B representam ensaios diferentes de um mesmo objetivo.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA POLIMERIZAÇÃO DE ACTINA EM CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR *L. INFANTUM* SELVAGEM OU NOCAUTE PARA O GENE *LPG2*

Com o objetivo de avaliar a dinâmica da polimerização dos filamentos de actina, foi realizada a imunomarcagem das células com os anticorpos para Rac1, RhoA, Cdc42, além de faloidina. Os resultados mostram um aumento da expressão de Rac1, RhoA, Cdc42 e actina nas células dendríticas infectadas pela *L. infantum* selvagem quando comparadas àquelas infectadas por *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2* e ao grupo controle não infectado (Figura 8A).

Foram realizados ainda ensaios adicionais de avaliação da polimerização dos filamentos de actina com adição de um grupo de células infectadas com o parasito *add back*. Os resultados mostram um aumento da expressão de Rac1 e RhoA nas células dendríticas infectadas pela *L. infantum* selvagem quando comparadas àquelas infectadas por *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2* e ao grupo controle não infectado. Os resultados mostram ainda que as células infectadas por *L. infantum add back* apresentaram uma expressão de Rac1 e RhoA maior do que aquelas infectadas por *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2* (Figura 8B).



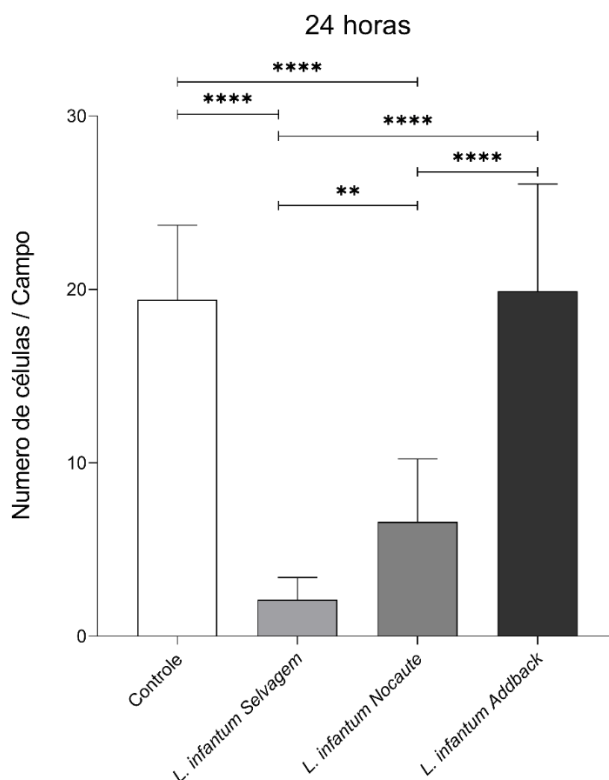




**Figura 8 - Avaliação da polimerização de actina em células dendríticas infectadas por *Leishmania*.** Células dendríticas infectadas por *L. infantum* selvagem (A e B), nocaute para o gene *lpg2* (A e B) e add back (B) por 4 horas e foram marcadas com anticorpo anti-Rac1, anti-RhoA e anti-Cdc42 (somente A). (A) Intensidade de fluorescência em marcação de RhoA, Rac1, Cdc42 e faloidina. (B) Intensidade de fluorescência em marcação de Rac1, RhoA e faloidina. A intensidade de fluorescência das marcações foi quantificada através da média de 25 a 30 células para cada grupo utilizando o software ImageJ. Vermelho, anti-Rac1, anti-RhoA ou anti-Cdc42; Verde, faloidina ou Rac1; azul, DAPI, núcleo da célula. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  (teste de *t* student). Resultado representativo de 2 experimentos. A e B representam ensaios diferentes de um mesmo objetivo.

#### 5.4 MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *L. INFANTUM* SELVAGEM OU NOCAUTE PARA O GENE *LPG2*

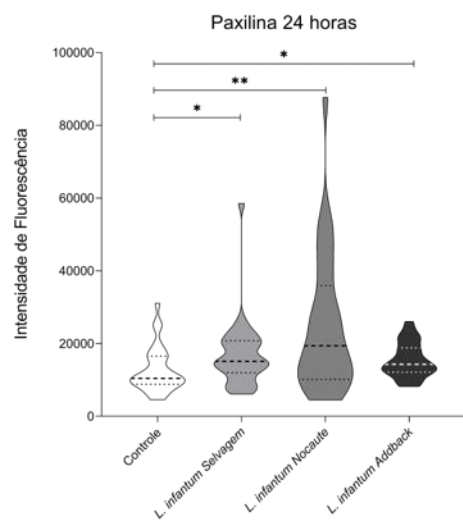
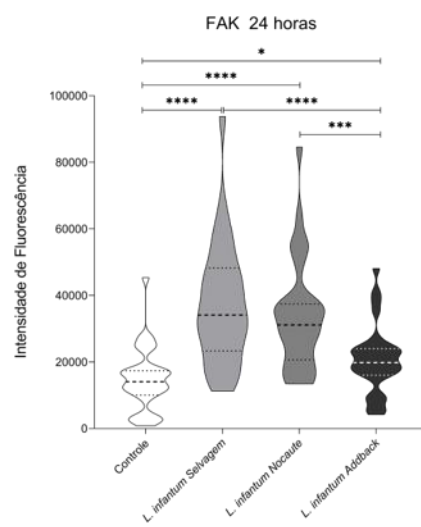
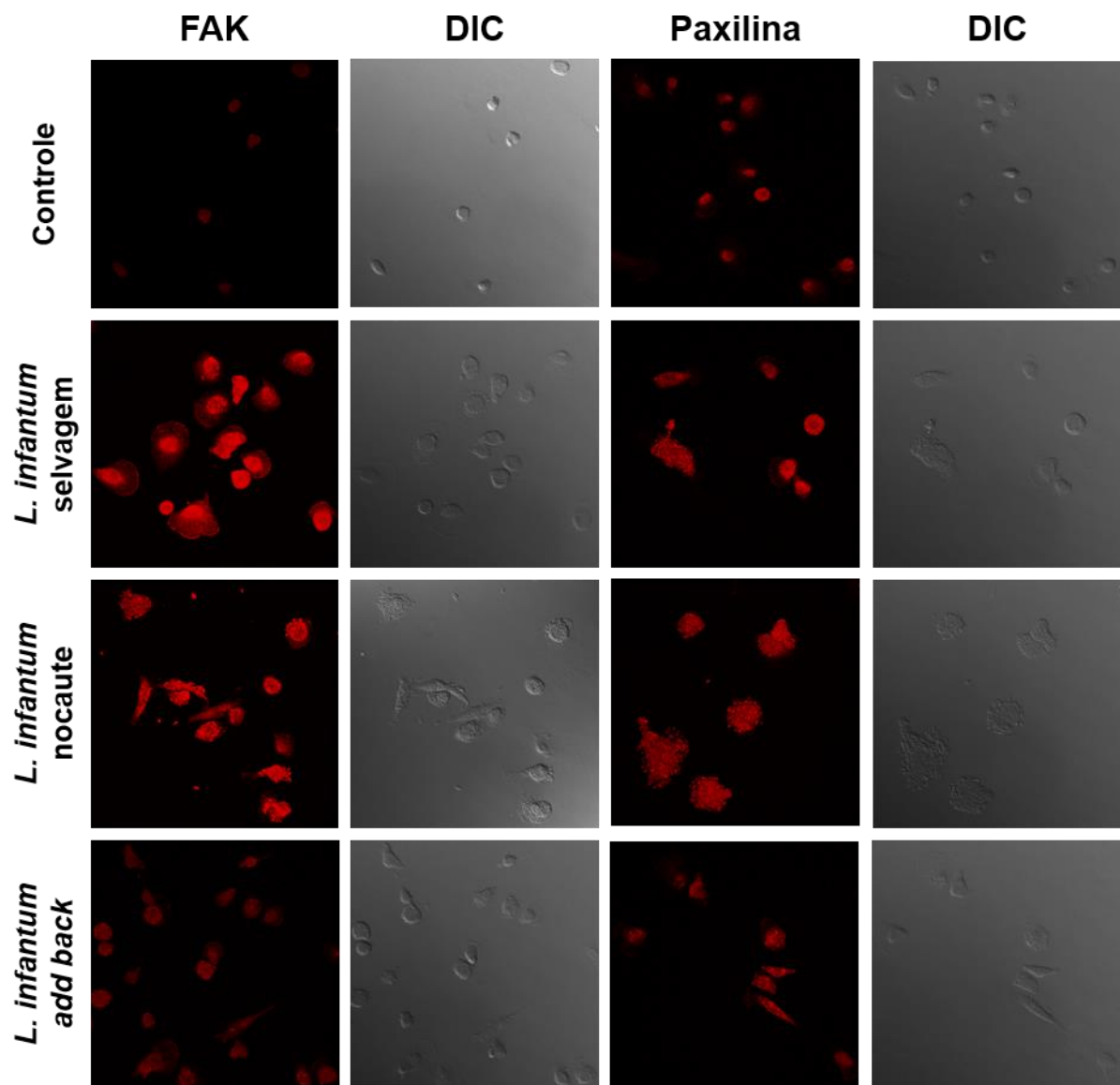
Para avaliar a migração de macrófagos infectados ou não por *L. infantum* selvagem ou nocaute para o gene *lpg2*, foram realizados ensaios de migração direcional na presença do quimioatrator específico (CCL2/MCP-1) utilizando câmaras Transwell. Os resultados mostram uma redução na migração de macrófagos humanos infectados por *L. infantum* selvagem quando comparadas àqueles infectados por *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2* (Figura 9).



**Figura 9 - Avaliação da migração de macrófagos na infecção por *Leishmania*.** Macrófagos foram infectadas por *L. infantum* selvagem, nocaute para o gene *lpg2* ou *add back* por 24 horas. Após a infecção, as células foram submetidas a migração com CCL2/MCP-1 em sistema *Transwell* por adicionais 5 horas. Os insertos foram lavados, fixados e marcados com DAPI. As células migrantes, que se encontravam na parte inferior do inserto, foram contadas (10 campos aleatórios) em microscópio de fluorescência convencional. \*\*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.001$  (teste de *t* student). Resultado representativo de 1 experimento.

#### 5.5 FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE ADESÃO EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *L. INFANTUM* SELVAGEM OU NOCAUTE PARA O GENE *LPG2*

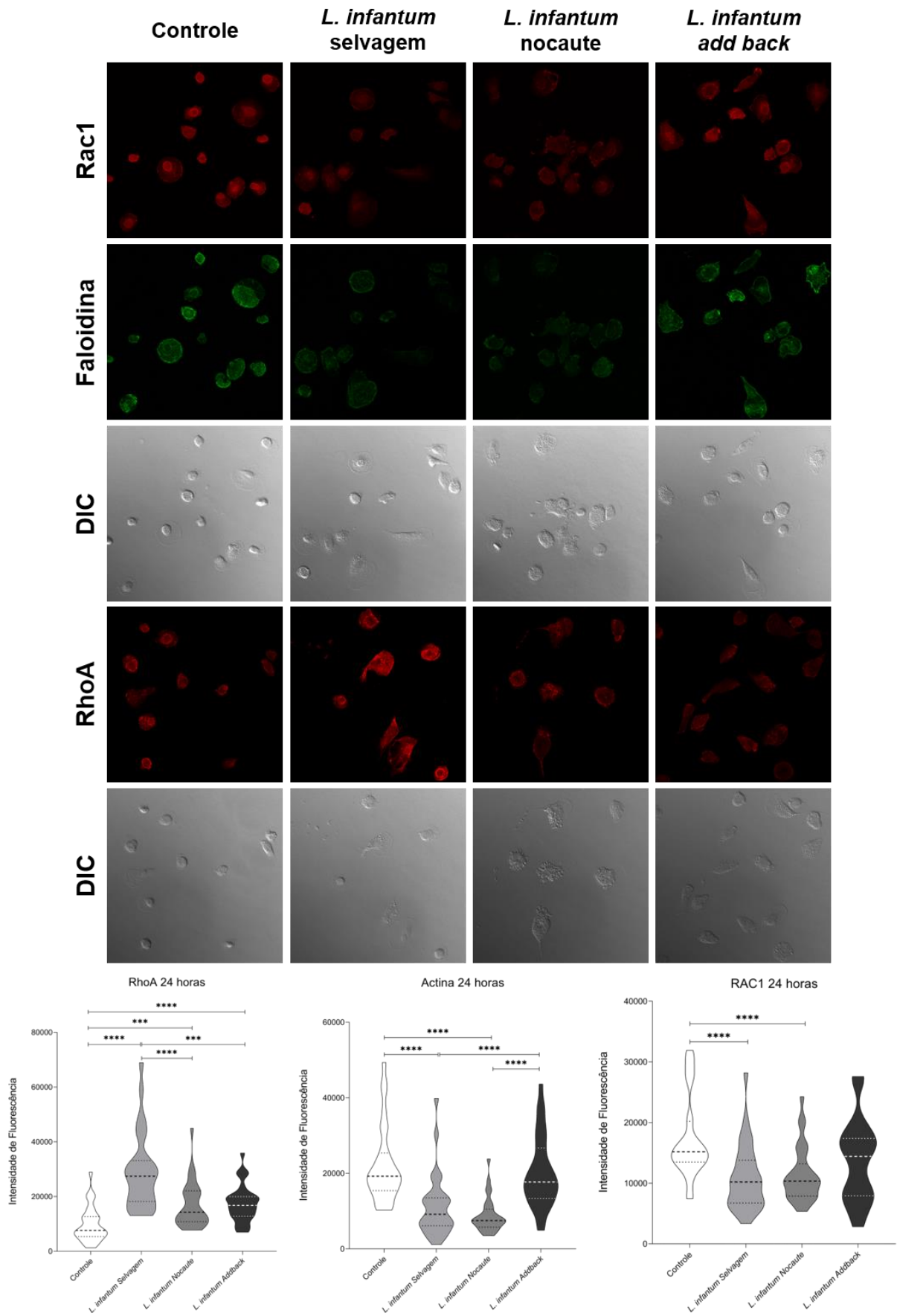
Para avaliar da formação dos complexos de adesão em macrófagos humanos infectados ou não por *L. infantum* selvagem, nocaute para o gene *lpg2* ou *add back*, foi feita a imunomarcção das células utilizando anticorpos para FAK e paxilina e, em seguida, foi feita a análise em microscopia confocal e quantificação através do software ImageJ. Os resultados mostram um aumento da expressão de FAK e paxilina em macrófagos infectados por *L. infantum* selvagem, *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2* e *L. infantum add back* quando comparadas ao grupo controle não infectado (Figura 10).



**Figura 10 - Avaliação da formação de complexos de adesão em macrófagos infectados por *Leishmania*.** Macrófagos infectados por 4 horas pela *L. infantum* selvagem, nocaute para o gene *lpg2* e *add back* foram marcados com anticorpo anti-FAK, anti-paxilina fosforiladas e DAPI. Foram quantificadas de 25 a 30 células para cada grupo utilizando o software ImageJ. Vermelho - anti-FAK ou paxilina fosforilada. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  , \*\*\*\*  $P < 0.001$  (teste de *t* student). Resultado representativo de 1 experimento.

## 5.6 AVALIAÇÃO DA POLIMERIZAÇÃO DE ACTINA EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *L. INFANTUM* SELVAGEM OU NOCAUTE PARA O GENE *LPG2*

Para avaliar a dinâmica da polimerização dos filamentos de actina em macrófagos humanos infectados ou não por *L. infantum* selvagem, nocaute para o gene *lpg2* ou *add back*, foi realizada a imunomarcação para Rac1, RhoA, além da marcação com faloidina. Os resultados mostram uma redução na marcação de faloidina e na expressão de Rac1 nas células infectadas pela *L. infantum* selvagem e nocaute para o gene *lpg2*, em comparação as células não infectadas (Figura 11). Adicionalmente, foi observado um aumento da expressão de RhoA nas células infectadas pela *L. infantum* selvagem, nocaute para o gene *lpg2* e *add back*, em comparação as células não infectadas (Figura 11).



**Figura 11 - Avaliação da polimerização de actina em macrófagos infectados por *Leishmania*.** Macrófagos infectados por *L. infantum* selvagem, nocaute para o gene *lpg2* ou *add back* foram marcados com anticorpo anti-Rac1 e anti-RhoA e faloidina, após 24 horas da infecção. A intensidade de fluorescência das marcações foi quantificada através da média de 25 a 30 células para cada grupo utilizando o software ImageJ. Vermelho - anti-FAK ou paxilina fosforilada; Verde, faloidina. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $P < 0,001$  (teste de *t* student). Resultado representativo de 1 experimento.

## 6. DISCUSSÃO

Na infecção por *Leishmania*, os macrófagos e as células dendríticas são células hospedeiras que desempenham um papel fundamental na resposta do hospedeiro à infecção e na imunopatologia da doença (ASHOK; ACHA-ORBEA, 2014; PRINA et al., 2017). A interação entre células hospedeiras e as diversas espécies de *Leishmania* é bastante complexa, tendo em vista que os parasitos expressam em sua superfície diferentes ligantes que podem interagir com múltiplos receptores da célula hospedeira, levando a diferentes desfechos da infecção (MOSSER; ROSENTHAL, 1993; MOSSER; MILES, 2007).

Além de fatores do hospedeiro, fatores intrínsecos ao parasito são componentes importantes para a manutenção da infecção no hospedeiro vertebrado (FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, 2012). Estudos recentes já demonstraram a relevância da presença do LPG de *Leishmania* na interação com células hospedeiras, no mecanismo de sobrevivência do parasito, bem como no estabelecimento da infecção (SCHLEIN; SCHNUR; JACOBSON, 1990). Entretanto, o papel do LPG de *Leishmania* na adesão e migração de células hospedeiras infectadas ainda é pouco descrito e compreendido.

Inicialmente, com o objetivo de tentar esclarecer o papel do LPG na migração de células hospedeiras infectadas, avaliamos a migração de células dendríticas e macrófagos humanos infectados por *L. infantum* selvagem ou nocaute para o gene *lpg2*. Os resultados mostram um aumento na migração das células dendríticas infectadas por *L. infantum* selvagem quando comparadas ao grupo controle não infectado, mas não de células dendríticas infectadas por *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2* nos tempos de 6, 12, 24 e 48 horas após infecção. Entretanto, em macrófagos infectados por *L. infantum* selvagem observa-se uma redução da

migração após a infecção por *L. infantum* selvagem, quando comparadas à macrófagos infectados por *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2* e ao grupo controle não infectado. Estes resultados sugerem não apenas um possível papel para células dendríticas humanas, mas não para macrófagos, na disseminação do parasito no hospedeiro, mas também um papel importante para o LPG na modulação da migração induzida por *L. infantum* nestas células.

Estudos anteriores já demonstraram que *Leishmania* é capaz de modular a adesão e migração de células hospedeiras (BRAY et al., 1983; CARVALHAL et al., 2004; PINHEIRO et al., 2006; FIGUEIRA et al., 2015; DE MENEZES et al., 2016). Em estudo prévio que avalia a migração de células dendríticas infectadas por *L. amazonensis*, os autores mostraram que a infecção por esta espécie de *Leishmania* promove uma redução na migração de células dendríticas do local da infecção para linfonodos drenantes (HERMIDA et al., 2014). Em contraste, outros autores mostram que a infecção por *Leishmania* promove um aumento do deslocamento de células dendríticas para os linfonodos drenantes (LAI et al., 2008; MISLITZ et al., 2004). Estudos anteriores mostraram ainda que a infecção por *L. major* estimula a capacidade da migração de células dendríticas a partir da modulação de receptores de quimionas, evidenciando uma relação entre o aumento da expressão de CCR7 com o aumento da migração de destas células (STEIGARD & MOLL, 2005). A importância da célula dendrítica na disseminação da doença (REBOUÇAS, 2020) já havia sido demonstrada pelo nosso grupo. Em estudo realizado recentemente, foi mostrado um aumento da migração de células dendríticas após a infecção por *L. infantum*, mas não por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, e por isolados de pacientes com a forma difusa e disseminada da doença, mas não de isolados daqueles que apresentam a forma localizada de Leishmaniose cutânea (manuscrito em preparação).

Com relação à migração de macrófagos no contexto da infecção por *Leishmania*, alguns trabalhos já evidenciaram uma redução da migração destas células após a infecção (BLEWETT; KADIVAR; SOULSBY, 1971; BRAY et al., 1983; DE MENEZES et al., 2016). Estes dados sugerem que macrófagos não apresentam um papel direto no processo de disseminação da doença. Adicionalmente, diversos trabalhos descrevem o papel do LPG na sobrevivência do parasita e no

estabelecimento da infecção no hospedeiro vertebrado (SCHLEIN; SCHNUR; JACOBSON, 1990; SPÄTH et al., 2003<sup>a</sup>).

Além disso, sabe-se que esta molécula confere proteção a lise mediada pelo complemento, interage com os receptores do tipo Toll-like (TLR), suprime a fosforilação da p38 MAP quinase, modula a produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico e de citocinas (CHANDRA; NAIK, 2008; CHAPARRO et al., 2019; JO et al., 2008; KAVOOSI; ARDESTANI; KARIMINIA, 2009; PUENTES et al., 1990). Entretanto a relação do LPG com a migração de células hospedeiras infectadas por *Leishmania* ainda precisa ser estudada. Este é o primeiro estudo que sugere um papel para o LPG na modulação da migração de células hospedeiras infectadas por *Leishmania*, caracterizando esta molécula como um dos possíveis mecanismos envolvidos na migração de células dendríticas infectadas por este parasito e, conseqüentemente, na disseminação da doença.

Um dos mecanismos importantes para processo de migração é a formação dos complexos de adesão, uma vez que promove a adesão da célula à matriz extracelular (ZAMIR, 2001; WIESNER, 2014). Buscando compreender os mecanismos envolvidos na modulação da migração de células dendríticas e macrófagos infectados por *L. infantum* selvagem ou nocaute para o gene *lpg2*, avaliamos a formação do complexo de adesão nestas células. Os resultados obtidos neste trabalho mostram um aumento na expressão de FAK e paxilina nas células dendríticas infectadas pela *L. infantum* selvagem quando comparadas àquelas infectadas por *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2* e ao grupo controle não infectado, sugerindo um aumento da formação de complexos de adesão nestas células. A associação entre o aumento da adesão celular e o aumento da migração já foi demonstrado anteriormente. Estudos avaliando a formação de complexos de adesão em células dendríticas infectadas por *T. cruzi* mostram um aumento da expressão de FAK associado ao aumento da migração destas células e a evolução da cardiomiopatia chagásica (MELO et al., 2019). Adicionalmente, foi demonstrado recentemente que o aumento da formação de complexos de adesão está relacionado ao aumento da migração de células dendríticas infectadas por *L. infantum*, mas não por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, e por isolados de pacientes com a forma difusa e disseminada da doença, mas não de isolados daqueles que apresentam a forma localizada de Leishmaniose cutânea (REBOUÇAS et al., 2020).



Com relação à formação de complexos de adesão em macrófagos humanos, trabalhos anteriores mostram que fibroblastos embriônicos de camundongos, portadores de mutação em FAK, impedindo a ligação com a paxilina, apresentam redução de FAK nos pontos de adesão e conseqüente redução de migração e adesão celular (DERAMAUDT, 2014). Além disso, foi demonstrada uma associação entre a redução da formação de complexos de adesão e a redução da migração em macrófagos murinos infectados por *Leishmania* (DE MENEZES et al., 2017; LUZ, 2021). Entretanto, interessante, nossos resultados mostram um aumento da formação de complexos de adesão em macrófagos humanos infectados tanto por *L. infantum* selvagem, quanto naqueles infectados por *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2*. Este dado sugere um papel de mecanismos adicionais à modulação da migração induzida por *Leishmania* nestas células. Estudos anteriores mostram uma relação entre LPG e aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície de células de Langherans (PONTE-SUCRE; HEISE; MOLL, 2001). Outros autores demonstraram que *Leishmania* modula a ativação de integrinas em macrófagos murinos infectados (CARVALHAL et al., 2004; PINHEIRO et al., 2006). Novos estudos para avaliar a expressão de integrinas e sua ativação podem auxiliar no esclarecimento de mecanismos envolvidos na modulação da migração associada a LPG de *L. infantum* em macrófagos humanos. A avaliação da sinalização induzida por LPG, assim como de seus mecanismos de ação, é fundamental para o entendimento dos possíveis mecanismos associados ao LPG que podem estar envolvidos na redução da migração de macrófagos humanos infectados por *L. infantum*.

Outro mecanismo importante para o processo de migração é a polimerização dos filamentos de actina, essencial para a contração das células e formação das protúrges (RIDLEY; HALL, 1992; WIESNER et al., 2014). Os filamentos de actina são controlados e modulados por cerca de cem proteínas atreladas a eles (proteínas de ligação à actina – ABPs). As GTPases da família Rho servem como interruptores moleculares dependentes de GTP, dentre elas, podemos citar a Cdc42, Rac1 e RhoA, que controlam respectivamente a formação de filopódio, lamelipódio e fibras de estresse (ALLEN et al., 1997; LEE; DOMINGUEZ, 2010; TAMBE et al., 2011; WU et al., 2009).

Com o objetivo de compreender os mecanismos envolvidos na migração de células dendríticas e macrófagos infectados por *L. infantum* selvagem ou nocaute para

o gene *lpg2*, foi avaliada a polimerização do citoesqueleto de actina. Em células dendríticas, nossos resultados mostram uma variação da marcação com faloidina entre os experimentos. Como a polimerização destes filamentos é um processo extremamente dinâmico, para melhor avaliar este fenômeno, partimos para avaliar a expressão de moléculas da família Rho. Observamos assim um aumento da expressão de Rac1, RhoA, Cdc42 em células dendríticas infectadas por *L. infantum* selvagem e uma redução da expressão dessas moléculas no grupo infectado pela *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2*. Este dado sugere que a modulação da dinâmica de actina é um possível mecanismo associado ao aumento da migração induzida por LPG de *L. infantum* nestas células.

Já os resultados de polimerização dos filamentos de actina em macrófagos infectados mostrou que a marcação por faloidina e a expressão de Rac1 estão reduzidas nas células infectadas por *L. infantum* selvagem e nocaute para o gene *lpg2*, em comparação com células controle não infectadas. Entretanto, RhoA mostrou-se aumentada nas células infectadas *L. infantum* selvagem, em relação às células infectadas por *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2*. Dados da literatura mostram que a inibição de Rho GTPases provoca uma modulação na migração celular (SANDER et al., 1999). Cdc2 e Rac1 são responsáveis pela indução da polimerização de actina, via complexo Arp2/3 (SPIERING; HODGSON, 2011). Além da Cdc42 e Rac1, RhoA é de extrema importância no processo de migração celular, uma vez que é responsável pela formação de fibras de estresse na região do corpo celular e região posterior da célula e tem associação com a inibição de protusões (RIDLEY; HALL, 1992; NOBES; HALL, 1999; ROTTNER; HALL; SMALL, 1999). Além disso, esta molécula está relacionada com a inibição da polimerização da actina, através da ativação de ROCK (ZEBDA et al., 2000). A expressão aumentada de RhoA em macrófagos infectados por *L. infantum* selvagem, em relação às células infectadas por *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2* observada neste trabalho, pode estar associada à redução da migração induzida pelo LPG de *L. infantum*.

Os mecanismos envolvidos na disseminação da *Leishmania* no hospedeiro e sua relação com a migração de células hospedeiras infectadas são pouco conhecidos. Além de fatores do hospedeiro, fatores intrínsecos ao parasito são componentes importantes para a manutenção da infecção no hospedeiro vertebrado e estabelecimento da lesão (FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, 2012). Estudos

recentes já demonstraram a relevância da presença do LPG de *Leishmania* na interação com células hospedeiras, no mecanismo de sobrevivência do parasito, bem como no estabelecimento da infecção (SCHLEIN; SCHNUR; JACOBSON, 1990). Entretanto, não se conhece o papel do LPG de *Leishmania* na adesão e migração de células do hospedeiro infectadas por este parasito. Este trabalho mostra, pela primeira vez, que o LPG de *L. infantum* participa na modulação da migração de células hospedeiras humanas infectadas, induzindo a migração de células dendríticas e reduzindo a migração de macrófagos, contribuindo para a apresentação de antígenos em linfonodos drenantes, e para a disseminação da doença em hospedeiros vertebrados. Estudos para melhor entender o papel do LPG no processo de adesão e migração celular e sua relação a disseminação da doença são fundamentais para a concepção de novas estratégias terapêuticas contra a leishmaniose.

## **7. CONCLUSÃO**

O LPG de *L. infantum* apresenta um papel importante na modulação da migração de células hospedeiras humanas infectadas.

## REFERÊNCIAS

AFRIN, F.; KHAN, I.; HEMEG, H. A. Leishmania-host interactions-an epigenetic paradigm. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 492 , 2019.

ALEXANDER, J.; RUSSELL, D. G. The interaction of Leishmania species with macrophages. **Advances in parasitology**, v. 31, p. 175–254, 1992.

ALLEN, W. E. *et al.* Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. **Journal Cell Science**, v. 110, Pt 6, p. 707–720, 1997.

ARENAS, R. *et al.* **Leishmaniasis: A review**F1000Research, 2017.

ASHOK, D.; ACHA-ORBEA, H. Timing is everything: Dendritic cell subsets in murine Leishmania infection. **Trends in Parasitology**, v. 30 (10), p. 490–507, 2014.

BANERJEE, S.; GARDEL, M. L.; SCHWARZ, U. S. The Actin Cytoskeleton as an Active Adaptive Material. **Annual Review of Condensed Matter Physics**, v. 11, p. 421–439, 2020.

BATES, P. A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand fliesInternational. **Journal for Parasitology**, v. 37, Pt 6, p. 1097–1106, 2007.

BLEWETT, T. M.; KADIVAR, D. M.; SOULSBY, E. J. Cutaneous leishmaniasis in the guinea pig. Delayed-type hypersensitivity, lymphocyte stimulation, and inhibition of macrophage migration. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 20, n. 4, p. 546–551, jul. 1971.

BRAY, R. S. *et al.* The effect of parasitization by Leishmania mexicana mexicana on macrophage function in vitro. **Acta Trop**, v. 40, n. 1, p. 29–38, 1983.

BROWN, M. C.; TURNER, C. E. Paxillin: adapting to change. **Physiol Review**, v. 84, n. 4, p. 1315–1339, 2004.

CARVALHAL, D. G. F. *et al.* The modelling of mononuclear phagocyte-connective tissue adhesion in vitro: Application to disclose a specific inhibitory effect of Leishmania infection. **Experimental Parasitology**, v. 107, n. 3–4, p. 189–199, 2004.

CHANDRA, D.; NAIK, S. Leishmania donovani infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 154, n. 2, p. 224–234, 2008.

CHAPARRO, V. *et al.* Leishmania donovani lipophosphoglycan increases Macrophage-Dependent chemotaxis of CXCR6-Expressing cells via CXCL16 induction. **Infection and Immunity**, v. 87, p. e00064-19 2019.

COELHO-FINAMORE, J. M. *et al.* Leishmania infantum: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 3, p. 333–342, 2011.

CORREIA, I. *et al.* Integrating the actin and vimentin cytoskeletons: Adhesion-dependent formation of fimbrin-vimentin complexes in macrophages. **Journal of Cell Biology**, v. 146, n. 4, p. 831–842, 1999.

DE ASSIS, R. R. *et al.* Glycoconjugates in New World species of Leishmania: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1820, n. 9, p. 1354–1365, 2012.

DE MENEZES, J. P. B. *et al.* Leishmania infection inhibits macrophage motility by altering F-actin dynamics and the expression of adhesion complex proteins. **Cellular Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 175–254, 2017.

DE MENEZES, J. P.; SARAIVA, E. M.; DA ROCHA-AZEVEDO, B. The site of the bite: Leishmania interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 264, 2016.

DEFIFE, K. M. *et al.* Cytoskeletal and adhesive structural polarizations accompany IL-13-induced human macrophage fusion. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 47, n. 1, p. 65–74, 1999.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in Leishmania infectivity. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1455, n. 2–3, p. 341–352, 1999.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

DOMINGUEZ, R. Actin-binding proteins - A unifying hypothesis. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 29 (11), n. 5, p. 572–8, 2004.

FIGUEIRA, C. P. *et al.* Leishmania infection modulates beta-1 integrin activation and alters the kinetics of monocyte spreading over fibronectin. **Scientific Reports**, v. 5, p. 12862, 2015.

FIORINI, M.; MESSINA, M. F.; BARRACCHIA, A. Peripheral intramonozytic and intraneutrophil leishmanias observed in a chronic myelomonocytic leukemia (CMMoL) patient. **Haematologica**, v. 87, n. 8, 2002.

FORESTIER, C. L.; GAO, Q.; BOONS, G. J. Leishmania lipophosphoglycan: How to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, n. January, p. 1–7, 2014.

FRANCO, L. H.; BEVERLEY, S. M.; ZAMBONI, D. S. Innate immune activation and subversion of mammalian functions by Leishmania lipophosphoglycan. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012.

GAUR, U. *et al.* Leishmania donovani lacking the Golgi GDP-Man transporter lpg2 exhibit attenuated virulence in mammalian hosts. **Experimental Parasitology**, v. 122, p. 182-91, 2009.

GORAK, P. M. A.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following Leishmania donovani infection. **European Journal of Immunology**, v. 28, p. 687-95, 1998.

GUHA-NIYOGI, A.; SULLIVAN, D. R.; TURCO, S. J. Glycoconjugate structures of parasitic protozoa. **Glycobiology**, v. 11, n. 4, 2001.

GUPTA, S.; NISHI. Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug discovery. **Indian Journal of Medical Research**, v. 133, p. 27-39, jan. 2011.

HOLMES, K. C. *et al* Atomic model of the actin filament. **Nature**, v. 347, p. 44-9, 1990.

IBRAIM, I. C. *et al* Two biochemically distinct lipophosphoglycans from Leishmania braziliensis and Leishmania infantum trigger different innate immune responses in murine macrophages. **Parasites and Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2013.

ILG, T. Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by Leishmania mexicana. **EMBO Journal**, v. 19, p. 1953-62, 2000.

ILG, T.; DEMAR, M.; HARBECKE, D. Phosphoglycan Repeat-deficient Leishmania mexicana Parasites Remain Infectious to Macrophages and Mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 7, p. 4988–4997, 2001.

JONES, R. J.; BRUNTON, V. G.; FRAME, M. C. Adhesion-linked kinases in cancer; emphasis on Src, focal adhesion kinase and PI 3-kinase. **European Journal of Cancer**, v. 36, n. 13, p. 1595–1606, 2000.

KAVOOSI, G.; ARDESTANI, S. K.; KARIMINIA, A. The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania major* phosphoglycans (PGs). **Parasitology**, v. 136, n. 10, p. 1193–1199, 2009.

LAI, G. N. *et al.* Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. **PLoS Pathogens**, v. 4, p. 11, 2008.

LEE, S. H.; DOMINGUEZ, R. Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. **Molecules and cells**, v. 29, n. 4, p. 311–325, 2010.

LEÓN, B.; LÓPEZ-BRAVO, M.; ARDAVÍN, C. Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against *Leishmania*. **Immunity**, v. 26, n. 4, p. 519–531, 2007.

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania donovani* promastigotes induce periphagosomal F-actin accumulation through retention of the GTPase Cdc42. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1647–1658, 2005.

LUZ, Y. **Avaliação da migração de macrófagos infectados por *Leishmania* em ambiente tridimensional**. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2021.

MA, D. *et al.* Golgi GDP-mannose uptake requires *leishmania* lpg2: A member of a eukaryotic family of putative nucleotide-sugar transporters. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 6, p. 3799–3805, 1997.

MELO, T. G. *et al.* *Trypanosoma cruzi* down-regulates mechanosensitive proteins in cardiomyocytes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, p. e180593, 2019.

MISSLITZ, A. C. *et al.* Two waves of antigen-containing dendritic cells in vivo in experimental *Leishmania major* infection. **European Journal of Immunology**, v. 34, p. 715-725, 2004.

MOLL, H. *et al.* Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. **European Journal of Immunology**, v. 23, n. 7, p. 1595–1601, 1993.

MOSSER, D. M.; ROSENTHAL, L. A. *Leishmania*-macrophage interactions: Multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 4, p.315-22, 1993.

NOBES, C. D.; HALL, A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. **Journal of Cell Biology**, v. 144, n. 6, p. 1235–1244, mar. 1999.

PAHO. Leishmanioses: Informe epidemiológico das américas. **Informe de Leishmanioses Nº 7**, v. 1, p. 1-27, 2019.

PINHEIRO, N. F. *et al.* Leishmania infection impairs  $\beta$ 1-integrin function and chemokine receptor expression in mononuclear phagocytes. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 7, p. 3912–3921, 2006.

POLLARD, T. D.; BORISY, G. G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. **Cell**, v. 112, p. 453-65, 2003.

PONTE-SUCRE, A.; HEISE, D.; MOLL, H. Leishmania major lipophosphoglycan modulates the phenotype and inhibits migration of murine Langerhans cells. **Immunology**, v. 104, p. 462-7, 2001.

PUENTES, S. M. *et al.* Serum resistance of metacyclic stage Leishmania major promastigotes is due to release of C5b-9. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 145, n. 12, p. 4311–6, 1990.

REBOUÇAS, A. **Avaliação da migração de células dendríticas infectadas por Leishmania spp.** Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2020.

RIDLEY, A. J. *et al.* Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. **Science**, v. 302, p. 1704-9, 2003.

RIDLEY, A. J.; HALL, A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. **Cell**, v. 70, n. 3, p. 389–399, ago. 1992.

ROMANOVA, L. Y. *et al.* Phosphorylation of paxillin tyrosines 31 and 118 controls polarization and motility of lymphoid cells and is PMA-sensitive. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. Pt 17, p. 3759–68, 2004.

ROTTNER, K.; HALL, A.; SMALL, J. V. Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. **Current Biology**, v. 9, n. 12, p. 640–648, jun. 1999.

SANDER, E. E. *et al.* Rac downregulates Rho activity: Reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. **Journal of Cell Biology**, v. 147, p. 1009-22, 1999.

SCHALLER, M. D.; PARSONS, J. T. pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, n. 5, p. 2635–2645, 1995.



SCHLEIN, Y.; SCHNUR, L. F.; JACOBSON, R. L. Released glycoconjugate of indigenous *Leishmania major* enhances survival of a foreign *L. major* in *Phlebotomus papatasi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 3, p. 353–355, 1990.

SMITH, D. F.; RANGARAJAN, D. Cell surface components of *Leishmania*: Identification of a novel parasite lectin? **Glycobiology**, v. 5, n. 2, p. 161–166, 1995.

SPÄTH, G. F. *et al* The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 16, p. 9536–9541, 2003a.

SPÄTH, G. F. *et al* Persistence without pathology in phosphoglycan-deficient *Leishmania major*. **Science**, v. 301, n. 5637, p. 1241–1243, 2003b.

SPIERING, D.; HODGSON, L. Dynamics of the rho-family small GTPases in actin regulation and motility. **Cell Adhesion and Migration**, v. 5,2, p. 170-80, 2011.

SVÁROVSKÁ, A. *et al*. *Leishmania major* glycosylation mutants require phosphoglycans (lpg2<sup>-</sup>) but not lipophosphoglycan (lpg1<sup>-</sup>) for survival in permissive sand fly vectors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. e580, 2010.

TACHIBANA, K. *et al*. Direct association of pp125FAK with paxillin, the focal adhesion-targeting mechanism of pp125FAK. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 4, p. 1089–99, 1995.

TAMBE, D. T. *et al*. Collective cell guidance by cooperative intercellular forces. **Nature Materials**, v. 10, p. 469- 75, 2011.

TURNER, C. E. Paxillin and focal adhesion signalling. **Nature Cell Biology**, v. 2, p. e231-6, 2000.

TURNER, C. E.; GLENNEY, J. R.; BURRIDGE, K. Paxillin: A new vinculin-binding protein present in focal adhesions. **Journal of Cell Biology**, v. 111, n. 3, p. 1059–1068, 1990.

UZONNA, J. E. *et al*. Vaccination with Phosphoglycan-Deficient *Leishmania major* Protects Highly Susceptible Mice from Virulent Challenge without Inducing a Strong Th1 Response . **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 6, p. 3793–3797, 2004.

VICENTE-MANZANARES, M.; WEBB, D., p. J.; HORWITZ, A. R. Cell migration at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 118, p. 4917-9, 2005.

VON STEBUT, E. *et al.* Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: Implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 188, p. 1547-52, 1998.

WADE, R.; BOHL, J.; VANDE POL, S. Paxillin null embryonic stem cells are impaired in cell spreading and tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase. **Oncogene**, v. 21, n. 1, p. 96–107, 2002.

WEBB, D. J. *et al.* FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. **Nature Cell Biology**, v. 6, n. 2, p. 154–61, 2004.

WIESNER, C. *et al.* Podosomes in space: Macrophage migration and matrix degradation in 2D and 3D settings. **Cell Adhesion and Migration**, v. 8, n. 3, p. 179–191, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniases. **World Health Organization Technical Report Series**, s.v., p. 1-186, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. v. 91, p. 285–296, 2016.

WU, Y. I. *et al.* A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. **Nature**, v. 467, p. 104-8, 2009.

ZAMIR, E.; GEIGER, B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. **Journal of cell science**, v. 114, n. Pt 20, p. 3583–3590, 2001.

ZEBDA, N. *et al.* Phosphorylation of ADF/cofilin abolishes EGF-induced actin nucleation at the leading edge and subsequent lamellipod extension. **Journal of Cell Biology**, v. 151, n. 5, p. 1119–1127, nov. 2000.