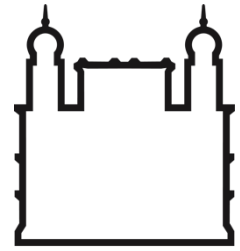




**UFBA**

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



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS POR  
*LEISHMANIA* EM AMBIENTE TRIDIMENSIONAL**

**YASMIN DA SILVA LUZ**

**Salvador - Bahia**

**2020**

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

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS POR  
*LEISHMANIA* EM AMBIENTE TRIDIMENSIONAL**

**YASMIN DA SILVA LUZ**

Orientadora: Juliana Perrone Bezerra de Menezes Fullam

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

**Salvador - Bahia**

**2020**

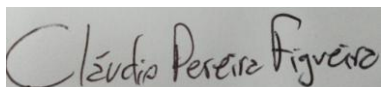
**“AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS POR LEISHMANIA EM AMBIENTE TRIDIMENSIONAL”.**

**YASMIN DA SILVA LUZ**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Salvador, 15 de janeiro de 2021.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

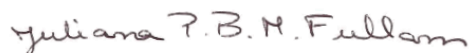


---

Dr. Cláudio Pereira Figueira  
Pesquisador  
IGM/FIOCRUZ

---

Dra. Karine Araújo Damasceno  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ



---

Dra. Juliana Perrone Bezerra de Menezes Fullam  
Pesquisadora  
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”

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB

## DEDICATÓRIA

Aos psiconautas que deleitam na entalpia,  
pois mais importante que conhecer as lacunas do universo,  
é aprender a conviver com o vazio que se encontra dentro de nós.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Dra. Juliana Perrone Bezerra de Menezes Fullam, pelo aprendizado e dedicação a minha formação científica;

A Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras, pelas colaborações ao projeto;

Aos estudantes de Iniciação Científica Henrique Cesar Saleh de Souza e Carla Polyana Oliveira Silva Bernardes que me ajudaram e me aturam durante o desenvolvimento do projeto;

À MSc. Rosidete Bastos, MSc. Amanda Rebouças e Taíse Santos Machado, pelas contribuições e padronizações do modelo de migração 3D;

Ao grupo de pesquisa JP pelos momentos de aprendizados e discussões enriquecedoras, além dos momentos de companheirismo e união;

Aos amigos do LaIPHE pelos momentos de ajuda e aprendizado, mas também pelos momentos de descontração que tornaram a rotina menos monótona;

Ao Centro de Biotecnologia e Terapia Celular (CBTC), em especial a Dr. Bruno Solano de Freitas Souza e a Erik Aranha Rossi, pelas análises no Operetta e pelas discussões de resultados enriquecedoras;

À Plataforma de Microscopia do IGM pelos ensinamentos em microscopia e auxílio no uso dos equipamentos;

À biblioteca pelas colaborações na correção e diagramação da dissertação

À banca examinadora pelas colaborações e enriquecimento do trabalho;

À todos os professores e à coordenação do Programa de Pós Graduação em Patologia Humana, pelos ensinamentos e oportunidade para desenvolver meu projeto;

À FAPESB e a CAPES pelo financiamento do projeto e minha bolsa de estudo;

Aos professores que contribuíram para minha formação, pela paciência e compreensão para me ensinar;

À minha mãe pelo amor que me deu durante toda minha vida além do apoio e suporte estrutural e emocional que permite que hoje eu tenha maturidade e compreensão para trilhar meu próprio caminho;

Aos meus amigos, pelo apoio emocional durante toda minha jornada e por todos os momentos alegres que me proporcionaram;

Aos meus animais e todo momento de conforto que me prestaram quando eu precisei.

## **Congresso Internacional do Medo**

Carlos Drummond de Andrade

Provisoriamente não cantaremos o amor,  
que se refugiou mais abaixo dos subterrâneos.  
Cantaremos o medo, que esteriliza os abraços,  
não cantaremos o ódio, porque este não existe,  
existe apenas o medo, nosso pai e nosso companheiro,  
o medo grande dos sertões, dos mares, dos desertos,  
o medo dos soldados, o medo das mães, o medo das igrejas,  
cantaremos o medo dos ditadores, o medo dos democratas,  
cantaremos o medo da morte e o medo de depois da morte.

Depois morreremos de medo  
e sobre nossos túmulos nascerão flores amarelas e medrosas.



LUZ, Yasmin da Silva. Avaliação da migração de macrófagos infectados por *Leishmania* em ambiente tridimensional. 2020. 68 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** As leishmanioses podem apresentar diferentes manifestações clínicas, que variam de lesões na pele no local da inoculação até lesões disseminadas para órgãos internos como baço e fígado. A disseminação e *homing* de células infectadas contendo antígenos de *Leishmania* são fundamentais para a sobrevivência e estabelecimento do parasito no hospedeiro. Entretanto, ainda hoje, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na adesão da célula hospedeira e sua migração na infecção por este protozoário. Em estudo realizado em ambiente bidimensional, foi observada 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. Entretanto, o processo de migração transendotelial de macrófagos envolve sinais regulatórios oriundos de um ambiente tridimensional. **OBJETIVO:** Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a migração de macrófagos infectados por *Leishmania* e os mecanismos envolvidos neste processo, em ambiente tridimensional. **METODOLOGIA:** Para isso, macrófagos derivados de medula óssea foram infectados por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou *L. infantum* e colocados em matriz de colágeno I para avaliação da migração utilizando High-Content Analysis System do modelo Operetta (PerkinElmer). Adicionalmente, avaliamos a formação de complexos de adesão pela imunomarcagem de p-FAK e p-paxilina, a polimerização do citoesqueleto de actina por faloidina, Cdc42, RhoA, Rac1 e gelsolina, utilizando microscopia confocal ou quantificação da intensidade média de fluorescência por poço através do Operetta. Além disso, utilizando matrigel, avaliamos a secreção de proteases por estas células. **RESULTADOS:** Nossos resultados mostram redução da migração de macrófagos infectados por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* em ambiente tridimensional. Adicionalmente, as análises mostram redução da formação de complexos de adesão nessas células. Em relação a organização de actina, houve aumento da expressão de Rac1 após a infecção por *L. braziliensis* e *L. infantum*, e redução da expressão de Cdc42. Mostramos ainda que houve uma redução da expressão de RhoA e gelsolina após a infecção por *L. amazonensis* e *L. infantum*. Por fim, nossos resultados mostram que a infecção por diferentes espécies de *Leishmania* não altera a área de degradação de matriz extracelular por macrófagos. **CONCLUSÃO** Nossos dados em conjunto mostram que a infecção por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou *L. infantum* leva à redução da migração de macrófagos em ambiente tridimensional. Esta redução na migração está associada à alteração da dinâmica de actina e redução formação de complexos de adesão nessas células.

**Palavras-chave:** Macrófagos, Migração Celular, *Leishmania*.

LUZ, Yasmin da Silva. Evaluation of migration of macrophages infected by *Leishmania* in a three-dimensional environment. 2020. 68 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Leishmaniasis present different clinical manifestations. Some *Leishmania* spp. cause chronic, slow-to-heal diseases that are known as cutaneous or mucocutaneous leishmaniasis. Other *Leishmania* spp. disseminate to internal organs such as the liver, spleen, and bone marrow to cause visceral leishmaniasis, leading to death if left untreated. The dissemination and homing of infected cells containing *Leishmania* antigens are essential for the survival of this parasite in the host. However, the mechanisms involved in the adhesion and migration of host cells during *Leishmania* infection is still poorly understood. A previous study showed that *Leishmania* infection inhibits macrophage motility by altering actin dynamics and impairing the expression of proteins that function in plasma membrane–extracellular matrix interactions. However, in the tissues, cells migrate through the extracellular matrix, a three-dimensional fiber mesh. **AIM:** Thus, the present study aims to evaluate the migration of macrophages infected by *Leishmania* and the mechanisms involved in this process, using a three-dimensional environment. **METHODOLOGY:** For this, bone marrow-derived macrophages were infected by *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, or *L. infantum* and placed in a collagen I matrix to assess migration using Operetta. Additionally, we evaluated adhesion complexes formation by the immunostaining of p-FAK and p-paxillin and actin polymerization by phalloidin, Cdc42, RhoA, Rac1, and gelsolin, using confocal microscopy or Operetta. Also, using matrigel, we evaluated the secretion of proteases by these cells. **RESULTS:** Our results show a reduced migration of macrophages infected by *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, and *L. infantum* in a three-dimensional environment. In addition, we show that infected macrophages have lower levels of phosphorylated paxillin and FAK when compared to noninfected macrophages. Analysis of the dynamics of actin polymerization show an increase Rac1 expression in *L. braziliensis*- and *L. infantum* infected cells, in contrast with a reduction in Cdc42 in these cells. In addition, we show a reduced expression of RhoA and gelsolin in *L. amazonensis*- and *L. infantum*- infected cells. We also showed that the infection by *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, and *L. infantum* does not alter the degradation area of extracellular matrix by macrophages. **CONCLUSIONS:** Taken together, our results show that *Leishmania* infection inhibits macrophage motility by altering actin dynamics and impairing the expression of proteins that function in plasma membrane–extracellular matrix interactions in a three-dimensional environment.

**Keywords:** Macrophages, Cell Migration, *Leishmania*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> .....	18
<b>Figura 2.</b> Esquema do modelo clássico de migração celular .....	20
<b>Figura 3.</b> Esquema representativo do complexo de adesão e das proteínas envolvidas na organização do citoesqueleto de actina.....	22
<b>Figura 4.</b> Esquema dos modos de migração .....	23
<b>Figura 5.</b> Esquema da organização dos podossomos em ambiente 2D e 3D .....	24
<b>Figura 6.</b> Representação da quantificação da área de degradação na matriz.....	35
<b>Figura 7.</b> Avaliação da cinética de infecção de macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> ou <i>L. infantum</i> .....	37
<b>Figura 8.</b> Estrutura das matrizes tridimensionais de colágeno I e matrigel.....	38
<b>Figura 9.</b> Avaliação da velocidade de migração de macrófagos após a infecção por diferentes espécies de <i>Leishmania</i> .....	39
<b>Figura 10.</b> Formação do complexo de adesão em macrófagos após infecção por <i>Leishmania</i> em ambiente tridimensional.....	41
<b>Figura 11.</b> Organização do citoesqueleto de actina em macrófagos após infecção por <i>Leishmania</i> em ambiente tridimensional.....	46
<b>Figura 12.</b> Avaliação da degradação de matriz densa por macrófagos após infecção por <i>Leishmania</i> em ambiente tridimensional.....	58

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Cepas de *Leishmania* utilizadas nos experimentos .....31

**Tabela 2.** Anticorpos utilizados nos experimentos .....35

## LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

<b>BOD</b>	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
<b>BMM<math>\Phi</math></b>	<i>Bone marrow macrophages</i>
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CR</b>	<i>Complement receptor</i>
<b>CR1</b>	<i>Complement receptor 1</i>
<b>CR3</b>	<i>Complement receptor 3</i>
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
<b>F-actina</b>	Actina filamentosa
<b>FAK</b>	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
<b>Fc<math>\gamma</math>R</b>	<i>Fc-gamma receptors</i>
<b>FITC</b>	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
<b>G-actina</b>	Monômero de actina ou actina globular
<b>Gp63</b>	Glicoproteína de 63 KDa
<b>GPI</b>	Glicosil Fosfatidil Inusitol
<b>HEPES</b>	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>KDa</b>	kilodalton
<b>LC</b>	Leishmaniose cutânea
<b>LM</b>	Leishmaniose mucocutânea

<b>LPG</b>	Lipofosfoglicano
<b>LV</b>	Leishmaniose Visceral
<b>M-CSF</b>	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MMPs</b>	<i>Matrix metalloproteinases</i>
<b>NADPH+</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
<b>NNN</b>	<i>Novy-Nicolle-MacNeall</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PFA</b>	Paraformaldeído
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i>
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute médium</i>
<b>SBF</b>	Soro bovino fetal
<b>SNARES</b>	<i>Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive attachment receptor</i>
<b>TNF</b>	<i>Tumor necrosis factor</i>
<b>uPA</b>	<i>Urokinase plasmin activator</i>
<b>VAMP-3</b>	<i>Vesicle associated membrane proteins 3</i>
<b>VAMP-8</b>	<i>Vesicle associated membrane proteins 8</i>
<b>VP</b>	Vacúolos parasitóforos

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1	ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE.....	16
1.2	O PARASITO, O VETOR E O CICLO DE VIDA.....	16
1.3	INTERAÇÃO MACRÓFAGO- <i>LEISHMANIA</i> .....	18
1.4	MIGRAÇÃO CELULAR.....	19
1.1.4	<b>Etapas da migração celular</b> .....	19
1.4.2	<b>Formação do complexo de adesão</b> .....	20
1.4.3	<b>Família Rho GTPases e a organização do citoesqueleto de actina</b> .....	21
1.4.4	<b>Tipos de migração em ambiente 3D</b> .....	22
1.4.5	<b>Migração celular na infecção por patógeno</b> .....	25
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	26
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	28
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	29
4.1	OBJETIVO GERAL.....	29
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
5.1	ANIMAIS.....	30
5.2	CULTIVO DE CÉLULAS L929.....	30
5.3	CULTIVO DE <i>LEISHMANIA</i> E MANUTENÇÃO DAS CEPAS.....	30
5.4	OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA.....	31
5.5	CINÉTICA DE INFECÇÃO.....	32
5.6	PADRONIZAÇÃO DAS MATRIZES.....	32
5.7	AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS POR <i>LEISHMANIA</i> EM AMBIENTE TRIDIMENSIONAL.....	33
5.8	AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE ADESÃO E POLIMERIZAÇÃO DE ACTINA EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR <i>LEISHMANIA</i> EM AMBIENTE TRIDIMENSIONAL.....	33
5.9	AVALIAÇÃO DO PAPEL DE PROTEASES EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR <i>LEISHMANIA</i> .....	35
5.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36

<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	37
6.1	CINÉTICA DE INFECÇÃO POR <i>LEISHMANIAS</i> EM BMM $\Phi$ .....	37
6.2	PADRONIZAÇÃO DAS MATRIZES TRIDIMENSIONAIS.....	38
6.3	MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS POR <i>LEISHMANIAS</i> EM AMBIENTE TRIDIMENSIONAL.....	38
6.4	FORMAÇÃO DOS COMPLEXO DE ADESÃO EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR <i>LEISHMANIA</i> EM AMBIENTE TRIDIMENSIONAL.....	39
6.5	AVALIAÇÃO DA POLIMERIZAÇÃO DE FILAMENTOS DE ACTINA EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR <i>LEISHMANIA</i> EM AMBIENTE TRIDIMENSIONAL.....	41
6.6	DEGRADAÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR POR MACRÓFAGOS INFECTADOS POR <i>LEISHMANIAS</i> EM AMBIENTE TRIDIMENSIONAL.....	47
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	50
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	55
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	56
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	57



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por mais de 20 espécies diferentes de protozoário do gênero *Leishmania*, caracterizando-se como uma doença negligenciada, endêmica em 98 países. Estima-se que ocorram de 700.000 a 1 milhão de novos casos e 30.000 mortes anualmente (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018). Entretanto, mais de 90% dos casos novos tem ocorrência em apenas 13 países: Afeganistão, Argélia, Bangladesh, Bolívia, Brasil, Colômbia, Etiópia, Índia, Irã, Peru, Sudão do Sul, Sudão e Síria (STEVERDING, 2017).

O agente causador da leishmaniose, a *Leishmania*, é um protozoário intracelular que pode causar um largo espectro de doenças. As principais formas clínicas da leishmaniose são leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose muco-cutânea (LCM) e leishmaniose visceral (LV) (DESJEUX, 2004; KAYE; SCOTT, 2011b; PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015). A LC pode ser causada pelas espécies *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana* ou *L. braziliensis*, sendo caracterizada por lesões na pele de caráter ulcerativo, tamanho variado e fundo necrótico. Já na LCM, causada por *L. braziliensis*, há o aparecimento de lesões em tecidos da orofaringe. A LV, manifestação clínica mais grave da enfermidade e causada por *L. donovani* e *L. infantum*, afeta órgãos internos como fígado, baço e medula óssea e pode levar à morte se não tratada (ASHFORD, 2000).

No Brasil, a LC possui ampla distribuição, com cerca de 21.000 casos ao ano. A região Norte do país é a que apresenta a maior incidência desta forma clínica (46,4 casos/100.000 habitantes), seguida da região Centro-Oeste (17,2 casos/10.000 habitantes) e Nordeste (8 casos/100.000 habitantes) em 2019 (BRASIL, 2020). Já a LV apresenta cerca de 3.500 casos por ano, com o coeficiente de incidência de 2,0 casos/100.000 habitantes. A letalidade da LV vem aumentando gradativamente nos últimos anos no Brasil, passando de 3,1 % em 2000 para 7,1 em 2012 (BRASIL, 2020).

## 1.2 O PARASITO, O VETOR E O CICLO DE VIDA

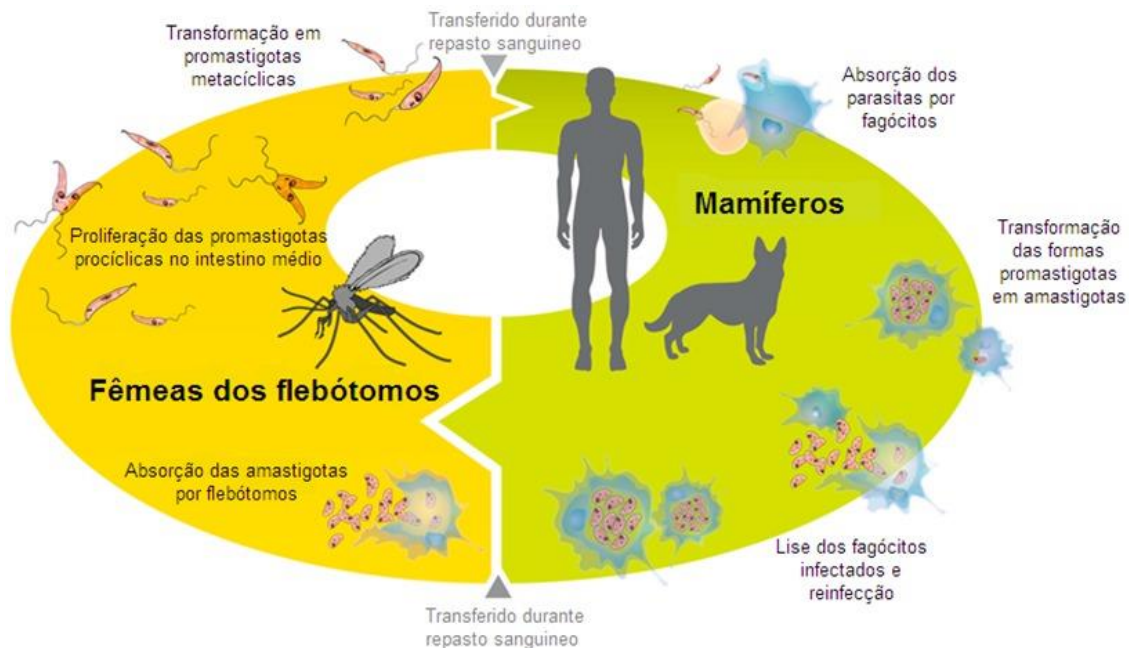
A leishmaniose é causada por um protozoário da ordem Kinetoplastida, família

Trypanosomatidae e do gênero *Leishmania* (GRIMALDI; TESH, 1993). A *Leishmania*, assim como outros protozoários, possui ciclo de vida digênico, tendo um hospedeiro mamífero e um vetor flebótomo, e apresenta diferentes formas adaptadas ao hospedeiro e ao vetor (SUNTER; GULL, 2017).

Os flebótomos pertencem à ordem Diptera, sub-ordem Nematocera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (AKHOUNDI *et al.*, 2016). Existem mais de 800 espécies de flebotomíneos, sendo 464 espécies encontradas no Novo Mundo e 375 no Velho Mundo. Entretanto, há evidências que apenas 30 espécies tenham capacidade vetorial para *Leishmania* (BATES, 2007; LANE, 1993).

O ciclo biológico da *Leishmania* é dividido em dois estágios: um flagelado, no qual os parasitos possuem alta motilidade, e um aflagelado, obrigatoriamente intracelular (KAYE; SCOTT, 2011). A infecção se inicia com a inoculação de formas promastigotas metacíclicas do parasito na pele do hospedeiro por fêmeas de flebotomíneos durante o repasto sanguíneo. No hospedeiro vertebrado, após ser reconhecido pelo macrófago, o parasito é internalizado e, no interior destas 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, chamados de vacúolos parasitóforos (ALEXANDER; RUSSELL, 1992). No interior das células hospedeiras, o parasito dissemina-se pelos diferentes tecidos do hospedeiro causando lesões (LEÓN; LÓPEZ-BRAVO; ARDAVÍN, 2007; MOLL *et al.*, 1993).

A infecção do vetor por *Leishmania* ocorre durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo fêmea em hospedeiro vertebrado infectado. As formas amastigotas ingeridas pelo inseto vetor chegam ao seu intestino médio, transformando-se em formas promastigotas procíclicas, que se multiplicam por divisão binária. Progressivamente, durante o processo de diferenciação, denominado metaciclogênese, surgem formas promastigotas metacíclicas, estágio não proliferativo e infectivo. Estas formas migram para a região do intestino anterior do vetor, podendo ser transmitidas para um novo hospedeiro vertebrado durante o segundo repasto sanguíneo. Em seguida, as formas promastigotas são internalizadas por células fagocíticas do hospedeiro vertebrado, reiniciando seu ciclo de vida (Figura 1) (BATES, 2007; GUPTA; NISHI, 2011).



**Figura 1. Ciclo biológico da *Leishmania*.** Durante o repasto sanguíneo, fêmeas de flebotomos infectados irão transmitir a forma promastigota metacíclica do parasito para o hospedeiro vertebrado. Esses parasitos serão reconhecidos por fagócitos presentes no local da inoculação. Uma vez dentro das células hospedeiras as promastigotas metacíclicas irão se transformar em amastigotas, essa forma é capaz de sobreviver e se replicar dentro dos vacúolos parasitóforos. A replicação da amastigota pode causar uma ruptura da célula hospedeira, permitindo a infecção de outros fagócitos. Quando o fagócito infectado é sugado por um flebotomo durante o repasto sanguíneo, as amastigotas irão transformar-se em promastigotas procíclicas no intestino do flebotomo. As promastigotas procíclicas, irão se diferenciar em metacíclica, que é a forma infectante (VERAS; BEZERRA DE MENEZES, 2016).

### 1.3 INTERAÇÃO MACRÓFAGO-*LEISHMANIA*

Os macrófagos são as principais células hospedeiras da *Leishmania*. No interior dessas células, os parasitos são capazes de sobreviver por longo período e se multiplicar no interior de vacúolos parasitóforos (AFRIN; KHAN; HEMEG, 2019). Estes compartimentos são caracterizados como fagolisossomas, pois tem pH ácido, enzimas lisossomais, e suas membranas apresentam marcadores de endossomo tardio e lisossomo, incluindo microsialina, rab 7, LAMP-1, LAMP-2, ATPase vacuolar e moléculas de MHC classe I e II (ANTOINE et al., 1991; LANG et al., 1994; ANTOINE et al., 1998).

A interação macrófago-*Leishmania* é complexa, uma vez que o parasito expressa diferentes ligantes que podem interagir com múltiplos receptores da célula do hospedeiro (MOSSER; ROSENTHAL, 1993; MOSSER; MILES, 2007). A interação de diferentes espécies de *Leishmania* com o macrófago envolve receptores do complemento (CRs), receptores de manose, receptores de fibronectina e receptores de Fcγ (FcγRs). Esses receptores por sua vez reconhecem moléculas presentes na superfície dos parasitos como o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína de 63 KDa

(gp63) (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015). Esta etapa de reconhecimento e o tipo de receptor envolvido neste processo são fundamentais para o curso da infecção.

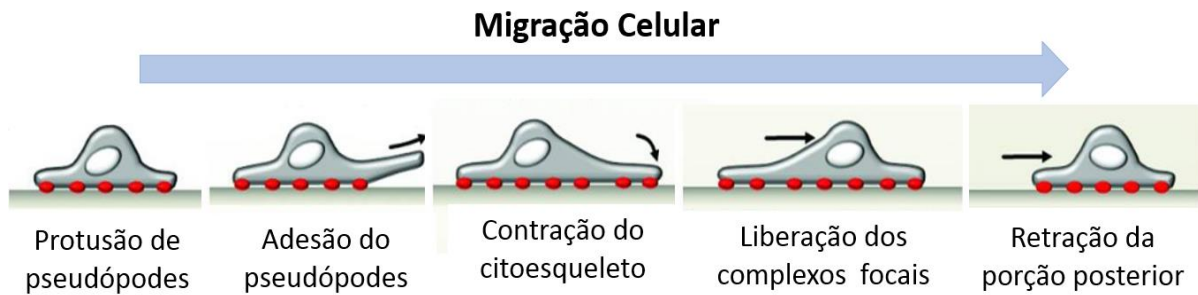
## 1.4 MIGRAÇÃO CELULAR

A migração celular é um processo realizado por uma grande variedade de células nucleadas e desempenha um papel essencial em muitos aspectos fisiológicos como tráfego de leucócitos e resposta imune, mecanismo de regeneração e reparo e durante a morfogênese embrionária (FRIEDL; WOLF, 2010; GARDEL *et al.*, 2010; HUTTENLOCHER; HORWITZ, 2011a; RIDLEY *et al.*, 2003).

### 1.4.1 Etapas da migração celular

A migração celular ocorre em um ciclo de diferentes etapas que envolvem: protusão do lamelipódio ou filopódio na parte anterior da célula, adesão da área de protusão ao substrato por complexos focais, contração da actomiosina citoplasmática, liberação dos complexos focais na parte posterior da célula e retração da porção posterior da célula. Esse processo envolve diversos eventos moleculares integrados, sendo mediado principalmente por filamentos de actina no citoplasma e formação de complexos de adesão (SHEETZ *et al.*, 1999; WIESNER *et al.*, 2014).

No início do processo de migração, a membrana plasmática precisa se ancorar ao substrato. Este processo é mediado por integrinas, proteínas transmembranares relacionadas com a adesão das células à matriz extra celular (MEC) (RIDLEY *et al.*, 2003). Durante este processo, a célula é capaz de gerar força de tração através da polimerização de actina, formando estruturas conhecidas como lamelipódios e filopódios, projetando assim a porção anterior no sentido da migração. Nessas estruturas de projeção da membrana, são encontrados densos feixes de actina filamentosa. Nos filopódios estas estruturas são unidimensionais, longas e finas, semelhante a microvilosidades, ao passo que em lamelipódios são bidimensionais e contém uma rede de actina filamentosa (TANG; GERLACH, 2017).



**Figura 2: Esquema do modelo clássico de migração celular.** O movimento celular é dividido em diversas etapas (Adaptado, WIESNER *et al.*, 2014).

### 1.4.2 Formação do complexo de adesão

O mecanismo de migração celular envolve a interação das células ao substrato por meio de estruturas conhecidas como contatos focais ou adesões focais (JONES, 2000). Mais de 150 componentes associados aos complexos de adesões focais foram identificados (HYNES, 2002; ROMER; BIRUKOV; GARCIA, 2006; WOZNIAK *et al.*, 2004; ZAMIR; GEIGER, 2001), incluindo proteínas de membrana (integrinas), proteínas que se conectam a actina (talina, vinculina e  $\alpha$ -actinina) e proteínas adaptadoras como (paxilina e Src) (TURNER, 2000; ZAMIR; GEIGER, 2001). Adicionalmente, outras proteínas, como as proteínas da família Rho de pequenas GTPases, podem se ligar aos complexos de adesão de forma transitória para regular a migração (HUTTENLOCHER; HORWITZ, 2011; RIDLEY; HALL, 1992).

As integrinas são receptores constituídos por proteínas transmembranares heterodímeras com subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  (GINSBERG, 2014), que estão envolvidas no recrutamento de proteínas fosforiladas envolvidas na adesão e migração celular (HUVENEERS; DANEN, 2009; MITRA; SCHLAEPFER, 2006). A proteína FAK funciona como um fator de regulação da adesão focal durante o movimento celular, no entanto, os mecanismos de regulação ainda são pouco compreendidos (ZAIDELBAR *et al.*, 2004). As moléculas FAK agregadas realizam fosforilação cruzada, criando um sítio de encaixe para os membros da família Src de tirosinas-cinase citoplasmáticas (MITRA; SCHLAEPFER, 2006; TOUTANT *et al.*, 2002). Essas cinases fosforilam as FAKs em tirosinas adicionais, criando sítios de encaixe para diferentes proteínas sinalizadoras intracelulares, principalmente com proteínas adaptadoras como paxilina e p130Cas (MITRA; SCHLAEPFER, 2006; PLAYFORD; SCHALLER, 2004).

A paxilina é um componente essencial nos pontos de adesão focal, contribuindo

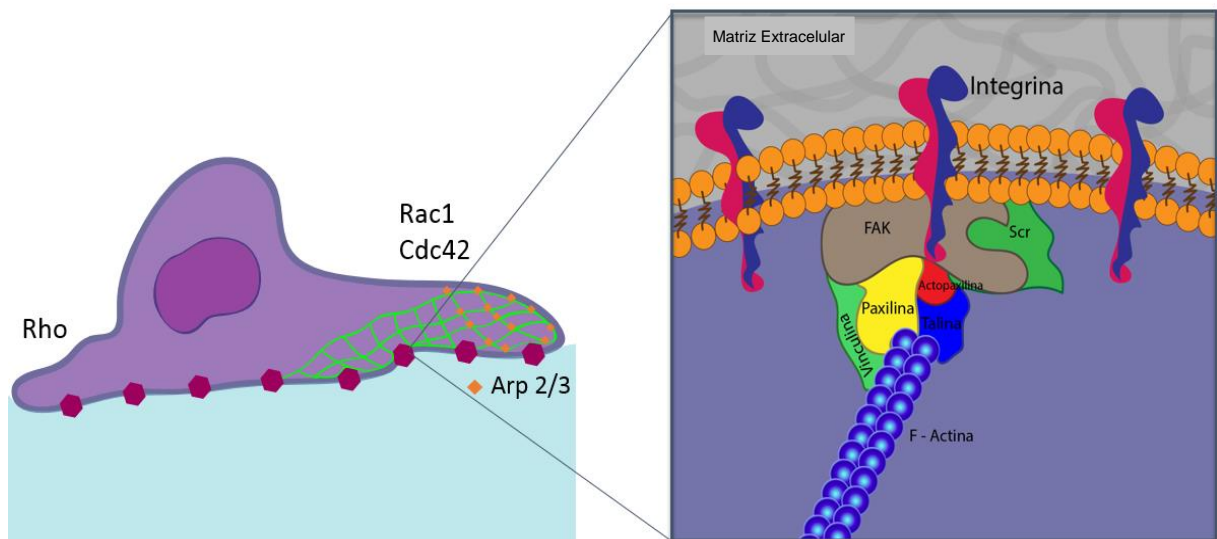
para o recrutamento de cinases e fosfatases responsáveis pela organização do citoesqueleto de actina e formação dos complexos de adesão (DEAKIN; TURNER, 2008). A função da paxilina é regulada por sua fosforilação, promovida pela interação da integrina com a MEC, iniciando assim a montagem dos complexos de adesão através do recrutamento de outras cinases como Src, FAK, actopaxina, vinculina e talina (BROWN; TURNER, 2002; LÓPEZ-COLOMÉ *et al.*, 2017; TURNER, 2000). A interação de paxilina com FAK intensifica sua fosforilação em outros resíduos de tirosina, regulando a dinâmica de formação dos complexos de adesão (BELLIS *et al.*, 1997; LÓPEZ-COLOMÉ *et al.*, 2017). Adicionalmente, já foi demonstrado que a inibição da interação FAK-paxilina diminui a capacidade de adesão, invasão e migração em fibroblastos (DERAMAUDT *et al.*, 2014).

### **1.4.3 Família Rho GTPases e a organização do citoesqueleto de actina**

A adesão da célula à MEC irá conferir suporte aos componentes responsáveis pela montagem da actina filamentosa, bem como sua regulação e organização. A organização do citoesqueleto de actina é extremamente dinâmica e ocorrem em três etapas: nucleação, junção de subunidades de G-actina; alongamento, adição de outros polímeros de G-actina na extremidade positiva do filamento; e equilíbrio entre o crescimento do filamento de actina na extremidade positiva e dissociação dos monômeros na extremidade negativa. Esse processo de formação e estabelecimento dos filamentos de actina são regulados por proteínas da família Rho-GTPases (EGELMAN, 1985; HOLMES *et al.*, 1990).

A família Rho-GTPases é formada por proteínas G que regulam a dinâmica de actina na célula. Os principais membros dessa família são Rac1, Cdc42 e RhoA. Rac1 e Cdc42 são responsáveis por controlar a extensão de lamelipódios na região anterior da célula, enquanto nos filopódios a extensão é controlada apenas por Cdc42 (DEMALI; BURRIDGE, 2003; HUVENEERS; DANEN, 2009; LÓPEZ-COLOMÉ *et al.*, 2017). RhoA por sua vez controla a retração da parte posterior da célula e a formação de fibras de stress no corpo celular e porção posterior da célula (RIDLEY; HALL, 1992). A atividade desta proteína é inicialmente diminuída após a interação com integrina  $\beta 1$  (ARTHUR; PETCH; BURRIDGE, 2000), visto que a alta atividade RhoA pode ativar ROCK (Rho-associated protein kinase) inibindo a formação da protrusão celular (NOBES; HALL, 1999; ROTTNER; HALL; SMALL, 1999). A atividade de ROCK estimula a contractilidade da miosina, além de estimular a fosforilação de LIM quinase,

capaz de inibir a cofilina (MAEKAWA *et al.*, 1999), bloqueando assim a polimerização da actina (ZEBDA *et al.*, 2000).

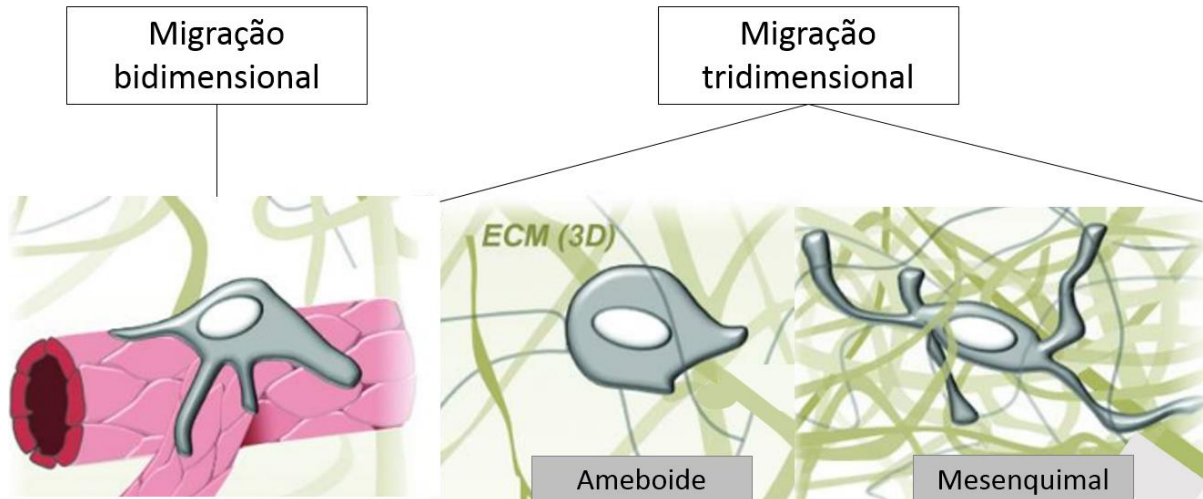


**Figura 3: Esquema representativo do complexo de adesão e das proteínas envolvidas na organização do citoesqueleto de actina.** A integrina é uma proteína transmembrana que conecta a matriz extracelular aos filamentos de actina, através de um complexo de adesão focal, formado a partir de proteínas chave como FAK e paxilina. A regulação da polimerização e despolimerização do citoesqueleto de actina é coordenada por proteínas da família Rho GTPase. Rac1 e Cdc42 na porção anterior da célula regulando a formação de lamelipódios e filopódios respectivamente, enquanto Rho regula a formação de fibras de estresse na parte posterior da célula.

#### 1.4.4 Tipos de migração em ambiente 3D

Em ambiente 3D, o macrófago pode migrar utilizando dois modos distintos: amebóide ou mesenquimal (FRIEDL; WOLF, 2010; HUTTENLOCHER; HORWITZ, 2011a; WIESNER *et al.*, 2014). Esses modos de migração são determinados pelas propriedades mecânicas, estruturais e bioquímicas da MEC. Em um ambiente com matriz mais frouxa, como a de Colágeno I, simulando o tecido conjuntivo, os macrófagos assumem um modo de migração amebóide, apresentando morfologia mais esférica, com pouca protusão, e migram em uma velocidade alta ( $\sim 0,7 \mu\text{m} / \text{min}$ ). Esta migração depende da via Rho/ROCK, responsável pela regulação da actomiosina. Já em um ambiente mais denso, como o formado por Matrigel<sup>TM</sup> (derivada do sarcoma de camundongo Engelbreth-Holm-Swarm, composta por laminina, entactina e colágeno tipo IV, além de fatores de crescimento proteoglicanos), que mimetiza a lâmina basal, a célula assume um modo de migração mesenquimal. Neste, as células apresentam morfologia mais alongada e baixa

velocidade de migração ( $\sim 0,2 \mu\text{m}/\text{min}$ ), uma vez que dependem da degradação da MEC por proteases (WIESNER *et al.*, 2014).



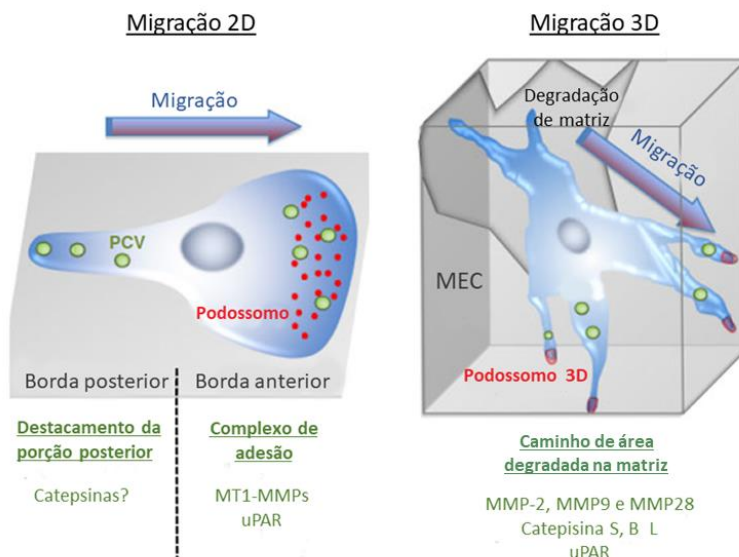
**Figura 4: Esquema dos modos de migração em ambiente 3D.** A migração pode ocorrer em ambientes bidimensionais, como em superfícies de vasos sanguíneos, ou tridimensionais. A migração das células nos tecidos requer uma regulação tridimensional. Em ambiente 3D, a célula pode migrar do modo amebóide, quando se encontra em uma matriz de baixa densidade, ou mesenquimal, quando se encontra em uma matriz densa (Adaptado de WIESNER *et al.*, 2014).

Os podossomos são estruturas presentes em células como macrófagos, células dendríticas e osteoclastos e envolvidas nos processos de adesão, degradação da matriz, migração, junção célula-célula e fagocitose (SANTIAGO-MEDINA *et al.*, 2015; VAN DEN DRIES *et al.*, 2019). Quando formados em ambiente 2D, possuem uma arquitetura bem definida (WIESNER *et al.*, 2014), composta por núcleo rico em F-actina com proteínas associadas como Arp2/3, cortactina e gelsolina, e uma estrutura de anel em torno do núcleo, que contém proteínas de adesão, como vinculina e talina (VAN DEN DRIES *et al.*, 2019; WIESNER *et al.*, 2014). Em contraste, os podossomos em ambiente 3D não possuem uma arquitetura bem definida, mas apresentam um acúmulo de F-actina e marcadores clássicos como vinculina, talina, gelsolina e cortactina (WIESNER *et al.*, 2014). Adicionalmente, os podossomos em ambiente 3D são formados apenas durante a migração mesenquimal e se concentram nas regiões de protusão da célula, são maiores e estão presentes em menor número que em ambiente 2D (VAN GOETHEM *et al.*, 2010).

Os podossomos estão relacionados com a capacidade invasiva da célula, pois são capazes de degradar matriz extracelular através de secreção de proteases. Diversos tipos de proteases foram identificadas associadas a estas estruturas,



incluindo metaloproteases de matriz (MMPs), catepsinas e o ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (uPA) (VÉROLLET *et al.*, 2011; WIESNER *et al.*, 2014). As MMPs são endopeptidases dependentes de zinco que pertencem à superfamília das metzincinas e estão envolvidas no remodelamento tecidual em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos, incluindo a infiltração de células em diferentes tecidos (VÉROLLET *et al.*, 2011). As catepsinas pertencem as famílias da cisteína proteases, são armazenadas em lisossomos, e são capazes de clivar diversos substratos. Estas, quando liberadas em meio extracelular, participam do processo de cicatrização e no remodelamento da MEC (VÉROLLET *et al.*, 2011; WIESNER *et al.*, 2014). Entretanto, sua atividade em macrófagos é descrita na porção posterior da célula, em contraste com a localização dos podossomos que estão na região de protusão (EVANS *et al.*, 2003). Adicionalmente, já foi demonstrado que inibidores de proteases lisossomais não são capazes de inibir a degradação da gelatina por podossomos, enquanto o inibidor geral de MMP leva à inibição da degradação da matriz (VAN GOETHEM *et al.*, 2010). O uPA é uma protease extracelular que ao se ligar ao seu receptor uPAR funciona como um regulador da proteólise de MEC, participando do remodelamento da matriz pericelular (VÉROLLET *et al.*, 2011; WIESNER *et al.*, 2014).



**Figura 5: Esquema da organização dos podossomos em ambiente 2D e 3D.** Podossomos são estruturas relacionadas à capacidade invasiva da célula, através da secreção de proteases capazes de degradar a MEC. Essas estruturas podem ser formadas em ambiente 2D, onde estão presentes em toda a célula e têm uma estrutura bem definida com núcleo rico em F-actina associada a proteínas reguladoras como Arp 2/3, cortactina e gelsolina, cercado por um anel com proteínas relacionadas à adesão como vinculina e talina. No ambiente 3D, são formados apenas na forma mesenquimal e se concentram nas regiões de protusão. Neste ambiente, apresentam estrutura pouco definida, mas

apresentam um acúmulo de F-actina e marcadores clássicos como vinculina, talina, gelsolina e cortactina (Adaptado de VÉROLLET *et al.*, 2011).

#### 1.4.5 Migração celular na infecção por patógenos

Na leishmaniose, a relação da disseminação do parasito e a enfermidade é particularmente estreita, entretanto poucos estudos avaliaram como a migração e adesão celular estão envolvidos nesse processo. Estudos anteriores demonstraram que patógenos são capazes de modular a adesão e migração de macrófagos (DA GAMA *et al.*, 2004; VÉROLLET; LE CABEC; MARIDONNEAU-PARINI, 2015). A infecção por *Toxoplasma gondii* é capaz de inibir a adesão em macrófagos aos componentes da matriz de forma transitória, causando uma redução da velocidade de migração destas células (DA GAMA *et al.*, 2004). Estudos envolvendo a infecção por HIV-1, demonstram que esse patógeno é capaz de modular a migração de macrófagos conforme o tipo de ambiente que se encontram. Em ambientes 2D, a infecção por HIV leva à redução da migração de macrófagos, enquanto que em ambiente 3D observa-se que, na forma ameboide, há redução da migração, em contraste com o aumento da migração destas células observado na migração mesenquimal (VÉROLLET; LE CABEC; MARIDONNEAU-PARINI, 2015). Com relação à *Leishmania*, foi demonstrado 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). Adicionalmente, foi demonstrado a redução da migração de macrófagos após a infecção por *Leishmania* em ambiente bidimensional (BLEWETT; KADIVAR; SOULSBY, 1971; BRAY *et al.*, 1983). Além disso, trabalho publicado por Menezes e colaboradores (2016) mostrou que a infecção por *L. amazonensis* reduz a migração de macrófagos em ambiente bidimensional. Os autores mostraram que ocorrem redução da formação de complexos de adesão nessas células e que esse efeito independe da carga parasitária no interior da célula hospedeira, da expansão do vacúolo parasitóforo e de fatores solúveis liberados pelas células infectadas, mas envolve a modulação da expressão de paxilina e sua fosforilação, além da fosforilação e atividade de FAK. Os autores mostraram ainda que existe aumento na frequência de polimerização e turnover de filamentos de actina da célula hospedeira após a infecção por *L. amazonensis* (MENEZES *et al.*, 2016).

## 2 JUSTIFICATIVA

As doenças causadas por *Leishmania*, as leishmanioses, podem apresentar diferentes tipos de manifestações clínicas, desde lesões localizadas na pele que cicatrizam espontaneamente, ou que se espalham de forma disseminada, a forma mucocutânea da doença, além da leishmaniose visceral, forma mais grave que podem levar à morte se não tratada (ASHFORD, 2000; DESJEUX, 2004).

A Organização Mundial de Saúde classifica a leishmaniose como uma das mais importantes doenças tropicais negligenciadas, pois afetam um número elevado de pessoas, chegando a milhões de indivíduos em todo o mundo. A doença é endêmica em quase todos os continentes, exceto Oceania, estimando-se que 12 milhões de indivíduos estejam infectados por *Leishmania* e que 350 milhões de indivíduos corram risco de serem infectados. Estima-se que a incidência anual de leishmaniose varie de 1,5 a 2 milhões de novos casos por ano, sendo que destes apenas 600.000 são oficialmente declarados (WHO, 2018)

Um dos mecanismos envolvidos na sobrevivência de *Leishmania* sp. no interior de células do hospedeiro vertebrado e no estabelecimento de lesões teciduais, está relacionado à disseminação e *homing* de células contendo o parasito e antígenos do parasito em tecidos do hospedeiro. Na leishmaniose, a relação entre disseminação do parasito e enfermidade é particularmente estreita, nesse contexto as áreas de lesão são relacionadas à presença do parasito no interior de células macrofágicas. Em algumas formas da doença tegumentar, as lesões permanecem restritas à área focal da pele, por vezes com evidente linfadenopatia regional; em outras há disseminação do parasito para múltiplos focos da pele ou para mucosa. O quadro de disseminação da *Leishmania* nos casos de leishmaniose visceral parece ainda mais complexo: provavelmente há um trânsito pele-linfonodo-sangue e, em seguida, um estabelecimento sequencial de células parasitadas em diferentes tecidos, como demonstrado em camundongos e sugerido em estudos com cães naturalmente infectados (DOS-SANTOS et al., 2004; REIS et al., 2006).

Os mecanismos envolvidos na disseminação da *Leishmania* no hospedeiro vertebrado e sua relação com a migração de células hospedeiras infectadas são pouco entendidos e têm sido estudados principalmente em ambiente bidimensional. Contudo, a migração transendotelial destas células e sua infiltração nos tecidos envolvem uma regulação principalmente tridimensional (LEY et al., 2007). Deste

modo, é necessário entender melhor os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na migração de fagócitos através da matriz extracelular. Estudos para melhor entender o processo de adesão e migração celular e sua relação com a sobrevivência intracelular do parasito e disseminação da doença são fundamentais para a concepção de novas estratégias para terapêutica e prevenção do desenvolvimento de formas graves da leishmaniose.

### 3 HIPÓTESE

A infecção por *Leishmania* leva à redução da migração de macrófagos em ambiente tridimensional.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 GERAL

Avaliar a migração de macrófagos infectados por *Leishmania* spp. em ambiente tridimensional e os mecanismos envolvidos neste processo.

### 4.2 ESPECÍFICOS

- a. Padronizar as matrizes tridimensionais;
- b. Avaliar a cinética de infecção por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*;
- c. Avaliar a migração de macrófagos infectados por *Leishmania* spp. em matrizes tridimensionais;
- d. Avaliar a formação de complexos de adesão em macrófagos infectados por *Leishmania* spp. em ambiente tridimensional;
- e. Avaliar a organização dos filamentos de actina na migração de macrófagos infectados por *Leishmania* spp. em ambiente tridimensional;
- f. Avaliar o papel de proteases na migração de macrófagos infectados por *Leishmania* em ambiente tridimensional.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) isogênicos da linhagem Balb/c machos ou fêmeas, com faixa etária de 6 a 8 semanas e hamsters Golden Syrian, macho ou fêmea, com faixa etária de 8 semanas, aprovados no protocolo do CEUA-IGM (Comissão Ética no Uso de Animais) 014/2019. Estes animais foram mantidos no Biotério do Instituto Gonçalo Moniz – IGM/FIOCRUZ – BA.

### 5.2 CULTIVO DE CÉLULAS L929

Células de linhagem fibroblástica tumorgênico de camundongos L929, foram cultivadas para obtenção de M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*), em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> contendo meio RPMI completo [RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (Gibco), 1% de glutamina (Sigma), 1% de ciprofloxacino, 5% de bicarbonato de sódio (Sigma) e 2% de HEPES (Sigma)] em estufa a 37 °C, com 5% de CO<sup>2</sup> e 95% de umidade. Em seguida, estas células foram incubadas com 4 mL de Tripsina-EDTA a 0,05% (Gibco) durante 5 minutos, para que soltassem da garrafa, e foram então centrifugadas a 300 Xg, por 10 min, a 4 °C. Posteriormente, as células foram ressuspensas e plaqueadas na concentração de 5x10<sup>5</sup> em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> com 20 mL de meio RPMI completo por 7 dias. Após este período, o sobrenadante contendo M-CSF foi coletado, centrifugado a 300 Xg, por 10 min, a 4 °C, para remoção de células. Em seguida, foi filtrado em sistema de filtração de 0,22 µm, aliquotado e mantido a -20 °C, para posterior diferenciação das células precursoras presentes na medula óssea em macrófagos.

### 5.3 CULTIVO DE *LEISHMANIA* E MANUTENÇÃO DAS CEPAS

Foram utilizadas três espécies de *Leishmania* nos experimentos (Tabela 1). As promastigotas foram mantidas em meio ágar-sangue NNN (*Novy-Nicolle-MacNeal*) com 5 mL de meio Schneider completo ou meio mínimo essencial modificado hemoflagelado médio (Meio HOMEM) em garrafa de cultura de 25cm<sup>2</sup> em estufa B.O.D. a 24°C. Para o cultivo da forma promastigota da espécie *L. amazonensis*, foi utilizado 5 mL de meio Schneider completo (Schneider's Insect Medium contendo 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) (Gibco®) inativado e antibiótico gentamicina na

concentração de 50µg/m). O cultivo de *L. braziliensis* foi semelhante, com exceção a suplementação do SBF, que para esta espécie foi utilizado 20% de SBF inativado. Já para o cultivo de *L. infantum* foi utilizado 5 mL de meio HOMEM completo, suplementado com 10% de soro SBF e 24.5 mM hemina bovina (Sigma, Steinheim, Germany). Todas as espécies foram mantidas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> em estufa B.O.D. à 24°C. Para acompanhamento do crescimento das culturas, o número de parasitos foi quantificado diariamente, utilizando a câmara de Neubauer, até atingirem a fase estacionária, que serão utilizadas nos experimentos.

**Tabela 1:** Cepas de *Leishmania* utilizadas nos experimentos

<b>Espécies</b>	<b>Cepa</b>
<i>Leishmania amazonenses</i>	MHOM/Br88/Ba-125
<i>Leishmania braziliensis</i>	MHOM/BR/01/BA788
<i>Leishmania infantum</i>	MCAN/BR/89/BA262

Para manutenção das cepas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, foram infectados camundongos C57BL/6 e BALB/c, respectivamente. As *Leishmanias* foram inoculadas nos camundongos em uma das patas traseiras na região planar, com inóculo de 5x10<sup>6</sup> promastigotas em fase estacionária em um volume de 20 µL de salina estéril. Cerca de 30 dias após a infecção, esses camundongos foram eutanasiados e seus linfonodos drenantes foram removidos e macerados em meio Schneider, permitindo a liberação das formas amastigotas do parasito. Já para a manutenção de *L. infantum*, foram utilizados hamsters. Os hamsters foram infectados por via intravenosa, com 1x10<sup>6</sup> promastigotas de *L. infantum*, no volume de 20 µL de salina estéril. Após 1 a 2 meses, os animais foram eutanasiados e as formas amastigotas de *Leishmania* foram recuperadas a partir do baço e diferenciados em promastigotas.

#### 5.4 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA

Células precursoras de macrófagos, presentes na medula óssea, foram obtidas a partir da lavagem da cavidade óssea do fêmur e da tíbia de camundongos da linhagem Balb/c com meio RPMI completo [meio Roswell Park Memorial Institute 1640 suplementado com 25 mM de HEPES (Sigma), 2 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma), 20% de SBF inativado (Gibco), 200 mM glutamina (Sigma) e 10 µg/mL de



ciprofloxacina (Isofarma)] utilizando uma agulha 15 Gauge e centrifugadas a 300 Xg por 5 min à 4°C. Após a centrifugação, o sedimento celular foi ressuspensionado e desfeito utilizando agulha de 20-21 Gauge e as células foram mantidas em placas de Petri 90 x 15 mm com meio RPMI completo em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> overnight. Macrófagos residentes da medula foram eliminados por adesão à placa de Petri e as células precursoras de macrófagos, presentes no sobrenadante da cultura foram coletadas. O sobrenadante foi, em seguida, centrifugado e o pellet ressuspensionado em meio RPMI completo contendo 30% de sobrenadante de célula L929. No terceiro ou quarto dia do cultivo, a cultura celular foi suplementada com meio RPMI contendo 30% de sobrenadante de L929. Após 7 dias de diferenciação os macrófagos de medula óssea BMMΦ (*Bone marrow macrophages*) aderidos foram recuperados por lavagem da placa de cultura com solução de PBS contendo 1 mM de EDTA, centrifugados 1200 RPM, 10 min à 4°C, ressuspensionados em meio RPMI completo e contados em câmara de Neubauer para realização dos experimentos.

### 5.5 CINÉTICA DE INFECÇÃO

Após a diferenciação, os BMMΦ foram plaqueados sobre lamínulas em placas de 24 poços na concentração  $2 \times 10^5$  por poço. Após 24 h corridas do plaqueamento, foi realizada a infecção por *L. amazonensis* (na proporção 10:1) por 6h ou *L. braziliensis* (na proporção 10:1) ou *L. infantum* (na proporção de 20:1) por 24h. Decorrido os tempos de infecção, todos os poços foram lavados com salina, sendo que o tempo 0 h foi fixado utilizando paraformaldeído 4%, as demais placas foram lavadas e reincubadas com meio RPMI completo, para posterior fixação após os tempos de 6, 12, 24 e 48 h. Após esses tempos, as placas foram fixadas e montadas com DAPI para marcação do núcleo. Todos os grupos foram feitos em quadruplicata. Por fim, foram contadas 400 células por grupo, em quadruplicata, em microscópio de fluorescência para determinação do percentual de infecção e o número de parasitos por célula.

### 5.6 PADRONIZAÇÃO DAS MATRIZES

A matriz fibrilar de colágeno tipo I foi preparada na concentração de 2 mg/mL [Collagen I (Gibco, Ref: A10483-01) com 10% PBS tampão fosfato salino 10X, 0,26 % NaOH 1N e ddH<sub>2</sub>O (Farmace)], colocada sobre lamínula e incubadas por 1-4 h a 37°C

e 5% de CO<sub>2</sub>, permitindo assim sua polimerização. Após esse período, foram acrescentados 10<sup>6</sup> BMMΦ em 500μl de meio RPMI completo, infectados ou não pelas diferentes espécies de *Leishmania*. As matrizes com as células foram então incubadas por adicionais 24 h permitindo a adesão e migração das células a matriz, para posterior fixação com PFA 4%.

A matriz densa utilizada para a execução dos experimentos de degradação foi preparada utilizando matrigel na concentração de 9 mg/mL (Corning, Ref: 356237), Esta matriz é gerada a partir de sarcoma de camundongo Engelbreth-Holm-Swarm, com composição formada principalmente por colágeno IV, entactina e laminina, proteoglicanos e fatores de crescimento, acrescida de 10% de gelatina-FITC (Invitrogen, Ref: G13186). Esta matriz foi colocada em placa de 96 poços e deixadas polimerizar por 1 h em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, após a polimerização foram acrescentados 5x10<sup>4</sup> BMMΦ em 100μL de RPMI completo, infectados ou não pelas diferentes espécies de *Leishmania*. As matrizes foram então incubadas por 48 h adicionais, permitindo assim a migração e infiltração das células na matriz, para posterior fixação.

## 5.7 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *LEISHMANIA* EM AMBIENTE TRIDIMENSIONAL

Após os sete dias de diferenciação, os macrófagos foram infectados com as três espécies de *Leishmania*, conforme a cinética já descrita anteriormente. As células foram cuidadosamente misturadas na matriz de colágeno I ainda fluida, na concentração de 5x10<sup>4</sup> por poço, e colocadas em placa de 96 poços para polimerização da matriz. Em seguida, as matrizes foram incubadas por 24 ou 48 h à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, para posterior análise. A análise da migração foi realizada em equipamento high-content analysis system, do modelo Operetta (PerkinElmer). Foram feitas avaliações em *time-lapse*, com uma foto a cada 2 minutos por um período de 1h, permitindo assim a determinação da velocidade de migração e trajetória das células.

## 5.8 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE ADESÃO E POLIMERIZAÇÃO DE ACTINA EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *LEISHMANIA* EM AMBIENTE TRIDIMENSIONAL

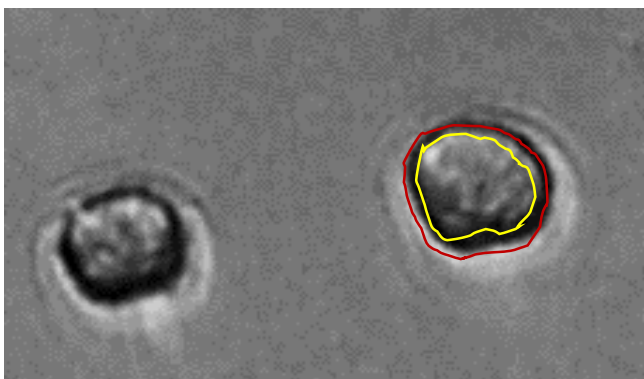
Para avaliar a formação de complexos de adesão e a dinâmica de actina, as matrizes fixadas contendo macrófagos infectados ou não pelas diferentes espécies de *Leishmania* foram lavadas com PBS 1x e fixadas por PFA 4% por 15 min. Em seguida, foram lavadas cinco vezes com PBS 1x (pH 7,4), incubadas com solução de NH<sub>4</sub>Cl [15 mM] por 15 min, e incubadas com solução pré-bloqueio (2% de soro bovino albumina [BSA] em Glicina 1%) por 20 min. As células foram então permeabilizadas com TRITON – X 100 0,5% durante 15 min. Após a permeabilização da membrana celular, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas com (1% de soro bovino albumina [BSA] em PBS) por 15 min. Após esse período, as células foram incubadas com os anticorpos primários conforme descrito na tabela, diluídos em PBS 1% BSA, por 1h a temperatura ambiente. Como controle negativo da reação, um grupo de células foi incubado com IgG de coelho (10,0 mg/mL) em substituição ao anticorpo primário. Posteriormente, as células foram lavadas cinco vezes com PBS 1x e incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de coelho conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 594 (0,02µg/µL) (Invitrogen, Ref: A11011) ou anti-IgG de rato conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (0,02µg/µL) (Invitrogen, Ref: A32723), ambos na proporção de 1:500 diluídos em PBS 0,3% BSA por 45 min. A marcação com faloidina Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Cat: A12379) na proporção 1:1200, por 45 min. Por fim, as células foram lavadas cinco vezes com PBS 1x e as matrizes foram então montadas utilizando o kit ProLong Gold DAPI (Invitrogen, ref: P36931) para marcação nuclear. As imagens foram adquiridas em microscópio confocal espectral, modelo TCS SP8 da Leica, utilizando a ferramenta de *Z-stack*, com cortes de 0,3 µm. As quantificações digitais de fluorescência foram realizadas utilizando o software ImageJ. Para isso, selecionamos as células individualmente utilizando a ferramenta de desenho/seleção e, em seguida, na barra de configurações, selecionamos a opção para definir os parâmetros “*Set measurements*”. Selecionamos as opções de: *Area*, *Min e Max gray value*, *integrated density* e *mean gray value*. Em seguida, utilizando os valores encontrados, calculamos a fluorescência celular total corrigida (CTCF) através da fórmula,  $CTCF = \text{densidade integrada} - (\text{área da célula selecionada} \times \text{fluorescência média das leituras de fundo})$ . Por fim, foi feita a quantificação da fluorescência de aproximadamente 30 células por grupo. Paralelamente, foram feitas análises no *high-content analysis system*, do modelo Operetta (PerkinElmer), quantificando a intensidade média de fluorescência por poço.

**Tabela 2:** Anticorpos utilizados nos experimentos

Anticorpos	Marca	Diluição	Ref
anti-FAK (pTyr397)	Invitrogen	1:500	RC222574
anti-paxilina (pTyr118)	Invitrogen	1:100	QF221230
Anti-Rac1	BD	1:100	610650
Anti-Cdc42	Invitrogen	1:200	PA1-092X
Anti-RhoA	Invitrogen	1:200	OSR00266W
Anti-Gelsolina	Sigma	1:200	T3287

### 5.9 AVALIAÇÃO DO PAPEL DE PROTEASES EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *LEISHMANIA*

Para avaliar o papel de proteases na migração de BMM $\Phi$  infectados ou não pelas diferentes espécies de *Leishmania*, foi realizado um ensaio de degradação de matriz. Inicialmente, as células foram adicionadas no topo das matrizes tridimensionais fluorescentes, constituídas por matrigel fluorescente, preparadas como descrito anteriormente. Em seguida, as matrizes contendo macrófagos infectados ou não foram incubadas por adicionais 48h a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, as matrizes foram lavadas e fixadas com PFA 4%, por 15 min. As imagens foram obtidas por um microscópio invertido de fluorescência Leica modelo DMI8 e a quantificação das áreas degradadas foi realizada por *software* Image J. Utilizando a ferramenta de desenho/seleção, contornamos todo o halo ao redor da célula formado pela degradação da matriz fluorescente e então, utilizando as ferramentas já descritas, no ImageJ, calculamos a área e a intensidade de fluorescência.



**Figura 6: Representação da quantificação da área de degradação na matriz.** Para selecionar a área de degradação utilizamos a ferramenta de desenho/seleção no ImageJ e delimitamos a área conforme representado pelo contorno vermelho na imagem. Em amarelo, observamos o delineamento da superfície do macrófago.

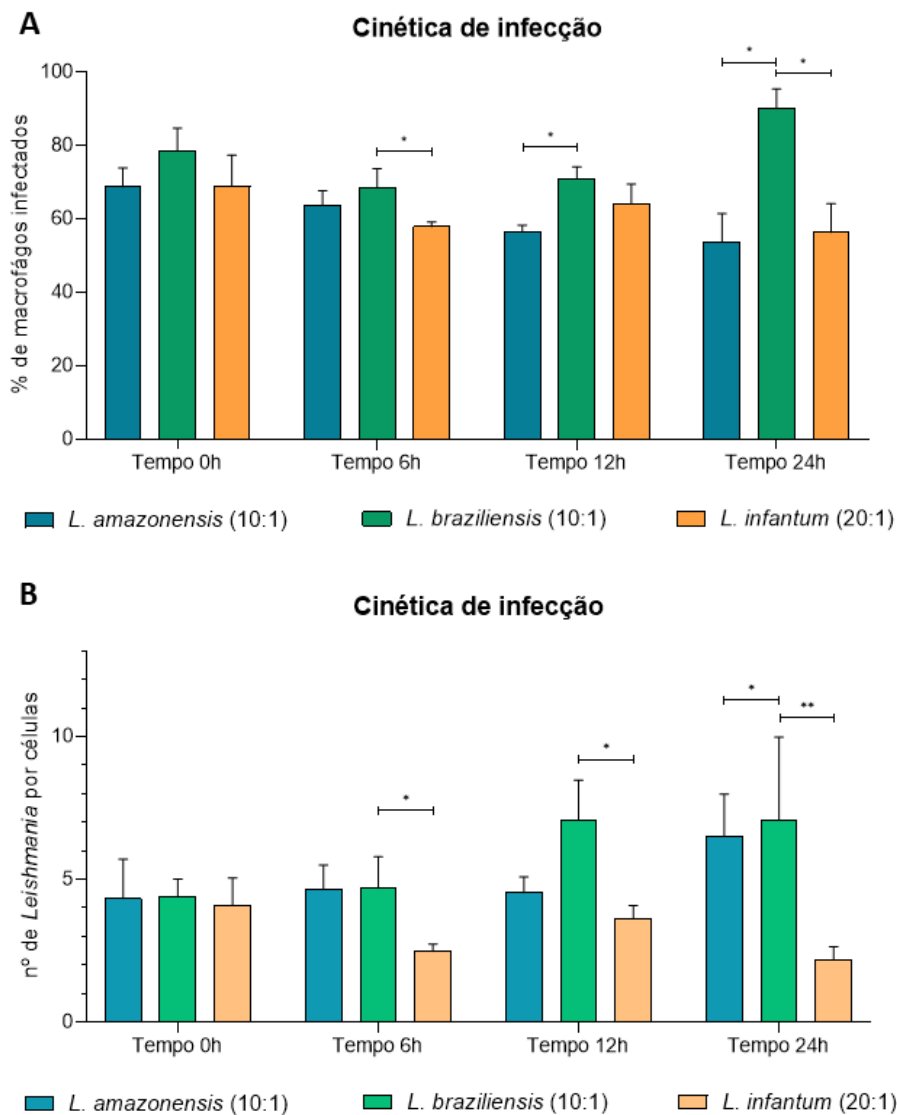
## 5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram repetidos três vezes. A análise dos dados foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 8. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade, D'Agostino, Kolmogorov-Smirnov e ShapiroWilk para determinação do uso de testes paramétricos ou não paramétricos. Para dados paramétricos foram utilizados o teste ANOVA (não pareado), enquanto, para os não paramétricos foram utilizados o teste Kruskal-Wallis (não pareado). Os dados paramétricos foram representados por gráficos de dispersão com barra, representado os valores de média, desvio padrão e os valores individuais. Já os dados não paramétricos foram representados com gráficos de violino, com intuito de mostrar a distribuição dos valores, além de visualizar a mediana e intervalos interquartil. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de  $p < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 CINÉTICA DE INFECÇÃO POR *LEISHMANIAS* EM BMMΦ

Com o intuito de igualar o percentual de infecção de macrófagos das espécies de *Leishmania* avaliadas, realizamos ensaios de cinética de infecção utilizando diferentes proporções *Leishmania* por macrófago para as diferentes espécies. Os resultados mostram um percentual equivalente de infecção entre macrófagos infectados por *L. amazonensis* (10:1), *L. braziliensis* (10:1) ou *L. infantum* (20:1) no tempo de 0 h. Resultado semelhante também foi observado para o número de *Leishmania* por macrófagos (Figura 7). Deste modo, utilizamos esse perfil de infecção para a realização dos demais experimentos.

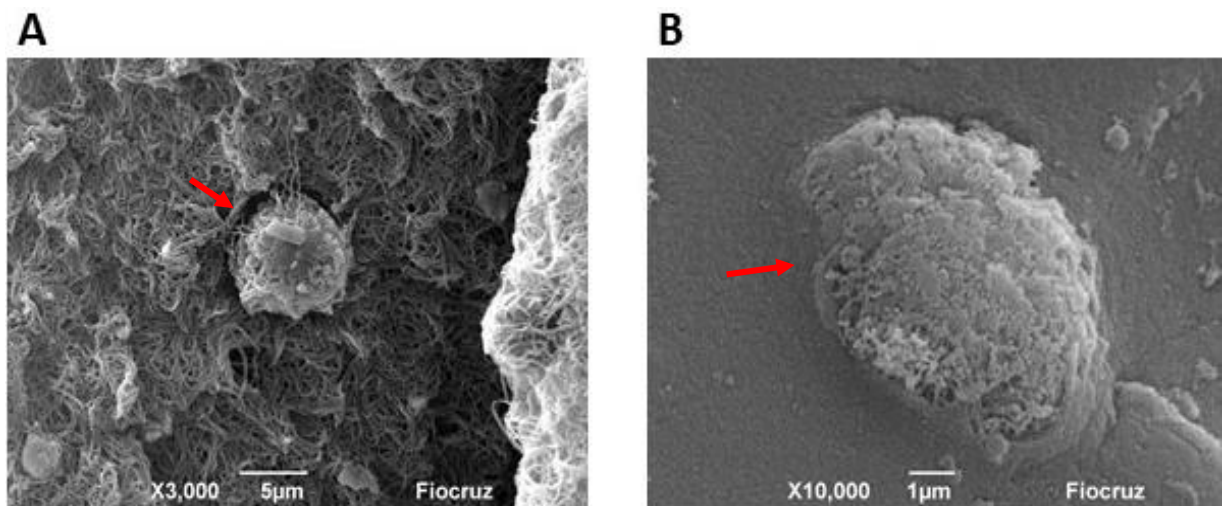


**Figura 7: Avaliação da cinética de infecção de macrófagos infectados por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou *L. infantum*.** Macrófagos ( $2 \times 10^5$ /poço) foram infectados por *L. amazonensis*, *L.*

*braziliensis* ou *L. infantum* na proporção de 10:1 e 20:1, respectivamente. Um total de 400 células foram avaliadas randomicamente por microscopia de fluorescência através da marcação nuclear por DAPI. **(A)** Percentual de macrófagos infectados por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou *L. infantum* ao longo dos tempos de 0, 6, 12 e 24 h. **(B)** Média de amastigota de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou *L. infantum* por macrófago, ao longo dos tempos de 0, 6, 12 e 24 h. \*\*\*,  $p < 0,001$  (ANOVA). Resultado representativo de 3 experimentos.

## 6.2 PADRONIZAÇÃO DAS MATRIZES TRIDIMENSIONAIS

Para realização dos experimentos, foi necessário a padronização das matrizes tridimensionais. Deste modo, foram preparadas uma matriz fibrilar de colágeno I na concentração de 2 mg/mL e uma matrigel, na concentração de 9 mg/mL,. As micrografias mostram a estrutura das matrizes bem definida. A matriz fibrilar de colágeno I apresentou malha organizada menos densa, com maior espaço entre as fibras de colágeno, enquanto a matrigel apresentou uma organização estrutural mais densa e sem lacunas entre as fibras (Figura 8).

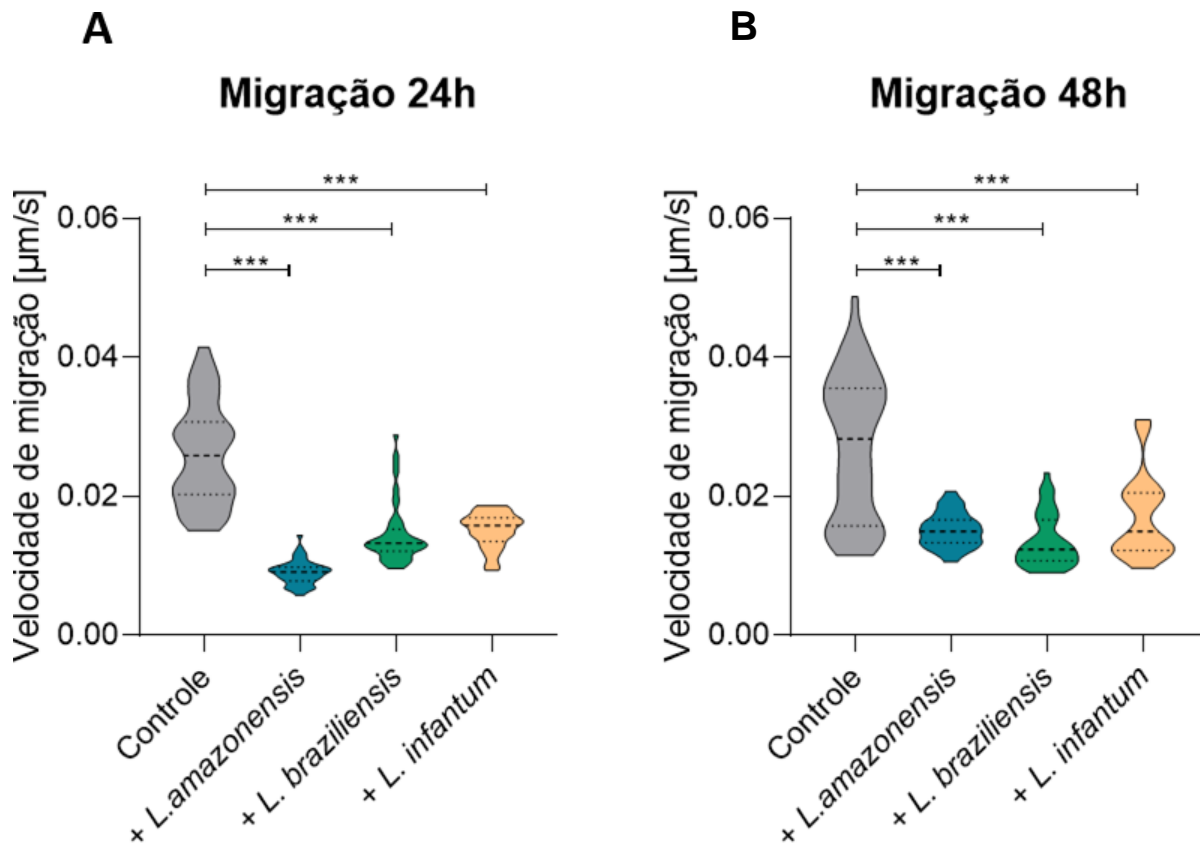


**Figura 8: Estrutura das matrizes tridimensionais de colágeno I e matrigel. (A)** Estrutura da matriz de colágeno I. Fibras encontram-se distribuídas de forma mais frouxa com lacunas entre as fibras de colágeno. **(B)** Estrutura da matrigel. Observa-se uma estrutura mais densa com componentes da matriz menores e mais sobrepostos em relação a matriz fibrilar de colágeno I. Análise realizada em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol 6390. As setas em vermelho indicam os macrófagos embebidos nas matrizes tridimensionais.

## 6.3 MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *LEISHMANIAS* EM AMBIENTE TRIDIMENSIONAL

Para avaliar a migração de macrófagos infectados ou não por *Leishmania*, foram realizados ensaios de migração utilizando equipamento *high-content analysis system*. Os resultados demonstraram uma redução na velocidade de migração de

macrófagos após a infecção por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou *L. infantum*, em relação ao grupo controle não infectado, nos tempos de 24 ou 48 horas (Figuras 9).



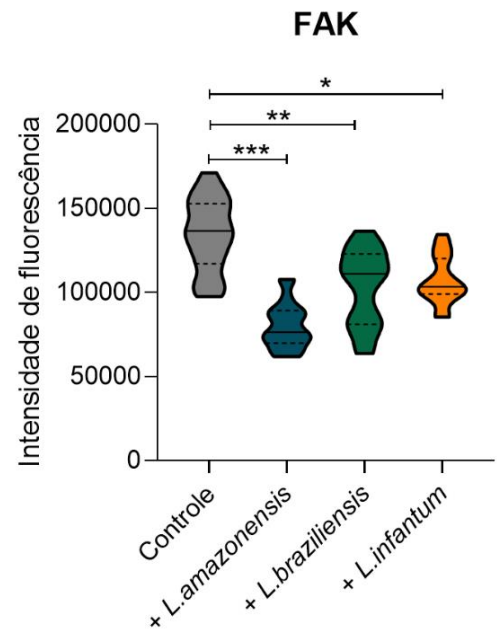
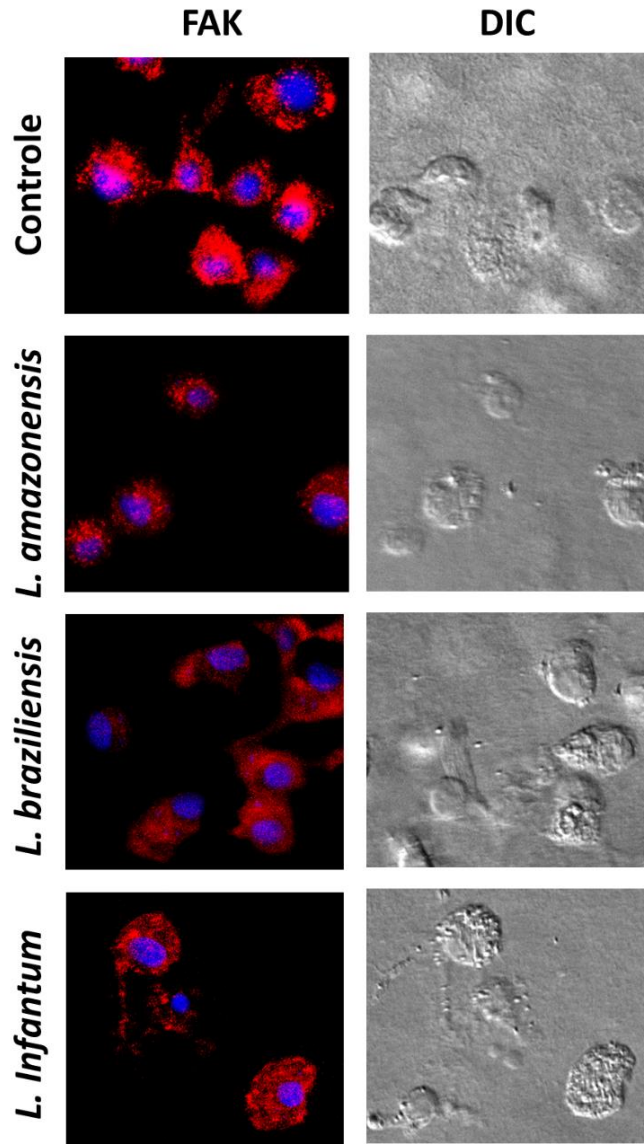
**Figura 9: Avaliação da velocidade de migração de macrófagos após a infecção por diferentes espécies de *Leishmania*.** Macrófagos ( $5 \times 10^4$ /poço) foram infectados por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou *L. infantum* e posteriormente embebidos em matriz de colágeno I por 24 ou 48h. A velocidade de migração foi calculada a partir da trajetória das células em *time-lapse* com uma foto a cada dois min por um período total de 1 h. **(A)** Análise da velocidade de migração após 24 h de infecção. **(B)** Análise da velocidade de migração após 48 h de infecção. \*\*\*,  $p < 0,001$  (kruskal wallis). Resultado representativo de três experimentos.

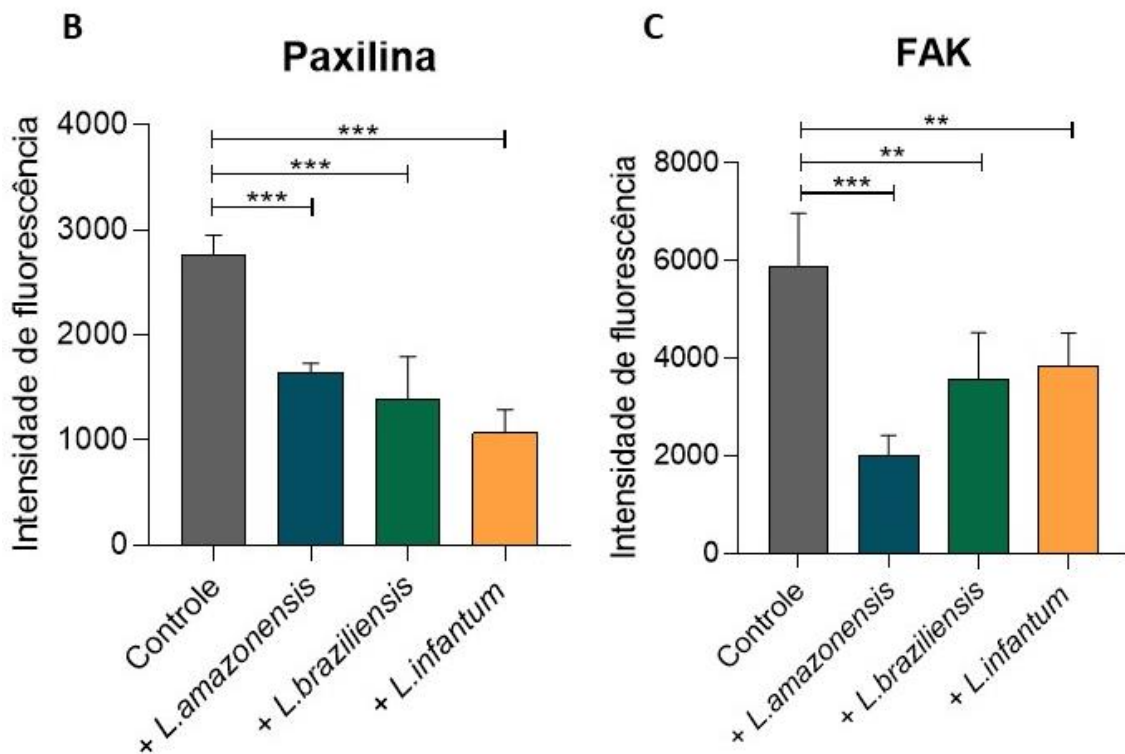
#### 6.4 FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS DE ADESÃO EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *LEISHMANIA* EM AMBIENTE TRIDIMENSIONAL

Estudos da literatura mostraram que o aumento da sinalização de FAK promove a motilidade celular, ao passo que sua inibição leva à defeitos no processo de migração (MITRA; HANSON; SCHLAEPFER, 2005; YANO *et al.*, 2004). Deste modo, para investigar os mecanismos associados a migração, foi avaliada a formação de complexos de adesão em macrófagos infectados por *Leishmania*, a partir da marcação de FAK e paxilina fosforiladas. Nossos resultados mostram que a infecção



por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* levam a redução da expressão de FAK e paxilina após 24 horas de infecção.

**A**



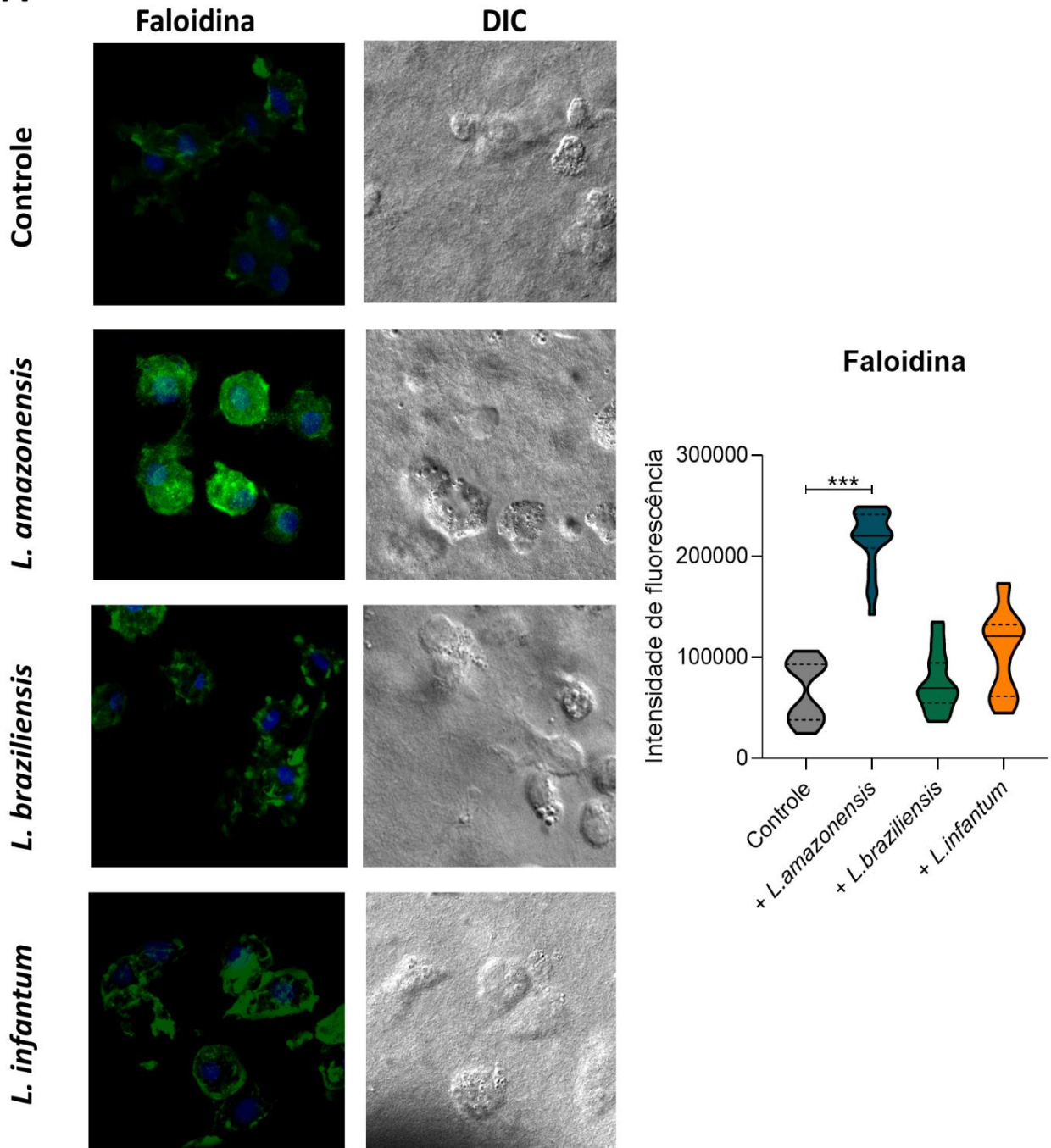
**Figura 10 – Formação do complexo de adesão em macrófagos após infecção por *Leishmania* em ambiente tridimensional.** Macrófagos ( $2 \times 10^6$  ou  $5 \times 10^4$ ) embebidos em matriz de colágeno I, infectados ou não por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou *L. infantum* foram marcados com anticorpo anti-FAK e anti-paxilina fosforiladas. **(A)** Expressão da intensidade de fluorescência para p-FAK através de microscopia confocal Leica SP8 **(B)** Expressão da intensidade média de fluorescência por poço para p-paxilina através do *high-content analysis system* (Operetta). **(C)** Expressão da intensidade média de fluorescência por poço para p-FAK através do *high-content analysis system* (Operetta). 25 a 30 células por grupo foram quantificadas utilizando o software Fiji. Vermelho, anti-FAK fosforilada; azul, DAPI; escala de cinza, DIC. \*\*\*,  $p < 0,001$  (Kruskal- Wallis; ANOVA). Resultado representativo de 3 experimentos.

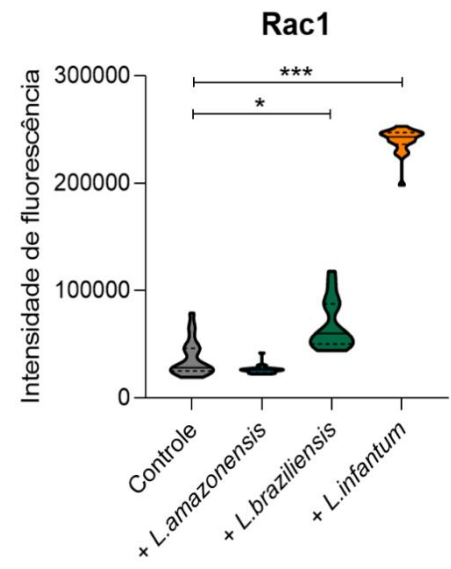
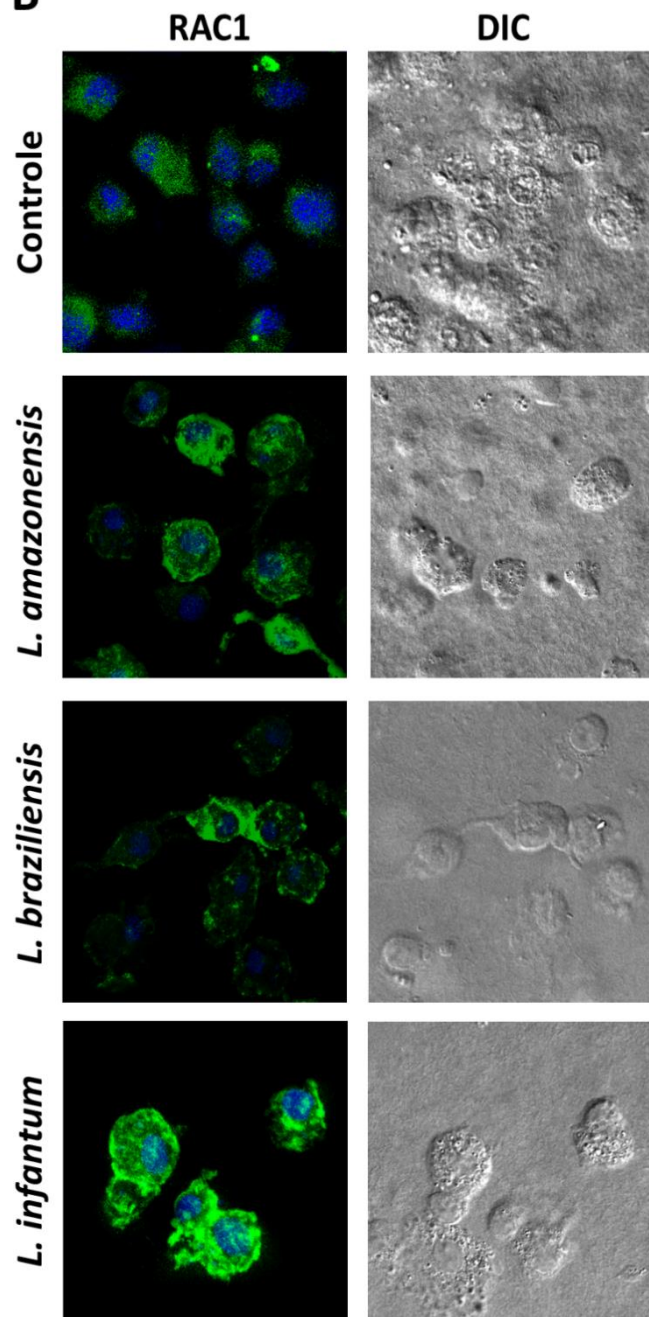
## 6.5 AVALIAÇÃO DA POLIMERIZAÇÃO DE FILAMENTOS DE ACTINA EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *LEISHMANIA* EM AMBIENTE TRIDIMENSIONAL

Com o intuito de entender os mecanismos relacionados a dinâmica do citoesqueleto de actina durante o processo de migração de macrófagos, realizamos imunomarcação para as proteínas RhoA, Rac1, Cdc42 e gelsolina além de marcação com faloidina fluorescente.

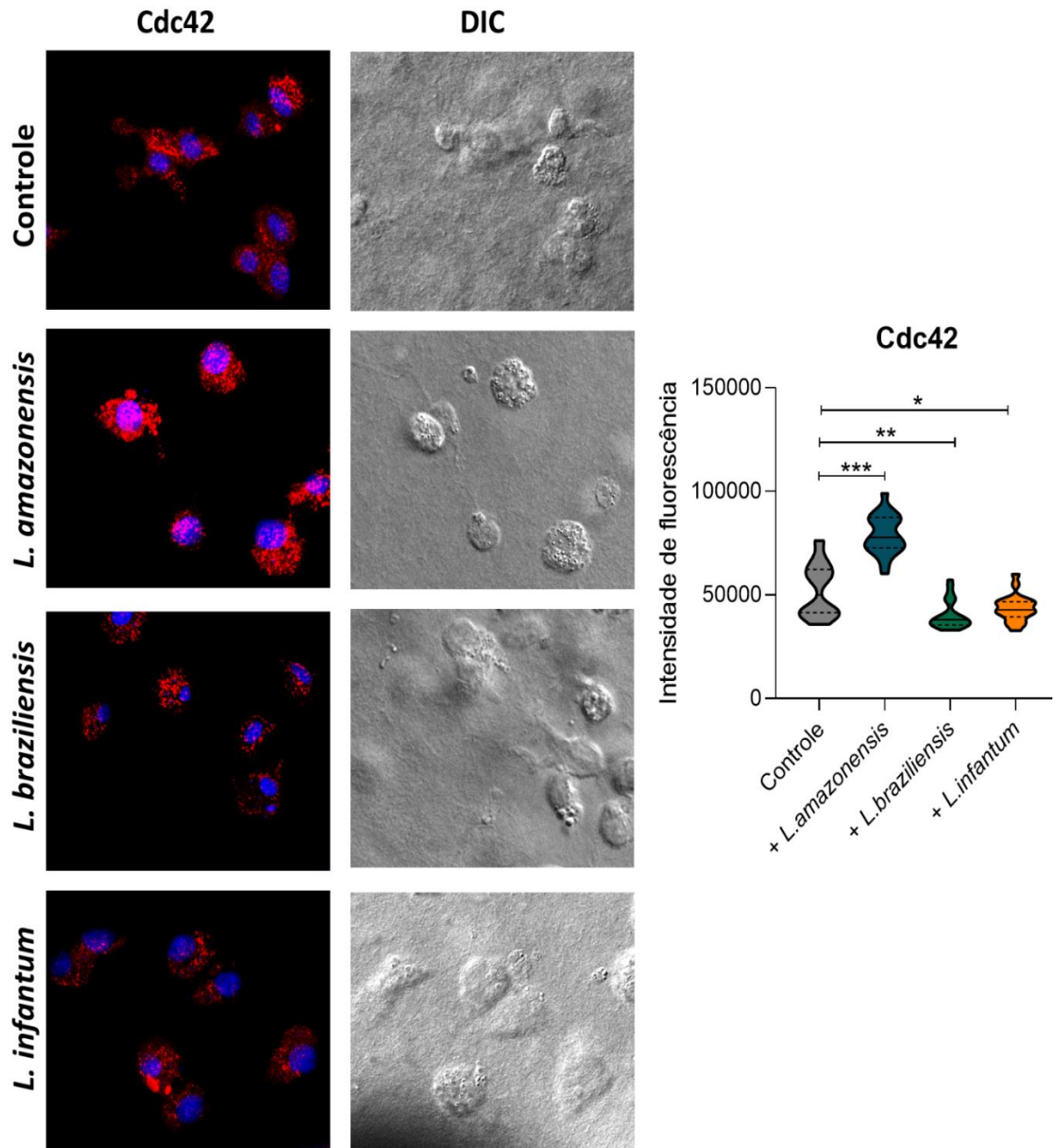
Nossos resultados mostraram um aumento da marcação para faloidina em células infectadas por *L. amazonensis*. Adicionalmente, mostramos um aumento da expressão de Rac1 em células infectadas por *L. braziliensis* e *L. infantum*, associada a uma redução da expressão de Cdc42 em células infectadas por *L. braziliensis* e *L. infantum*, e aumento da expressão desta proteína naquelas infectadas por *L.*

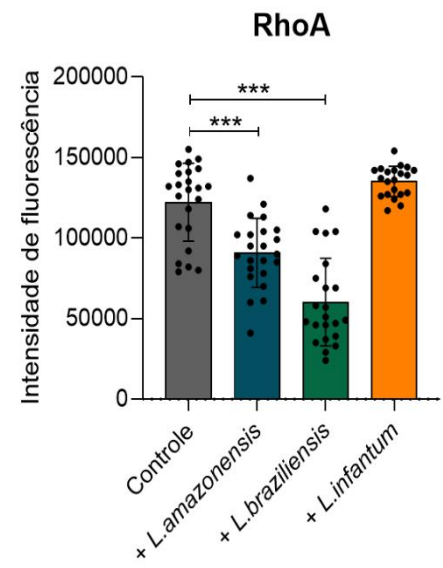
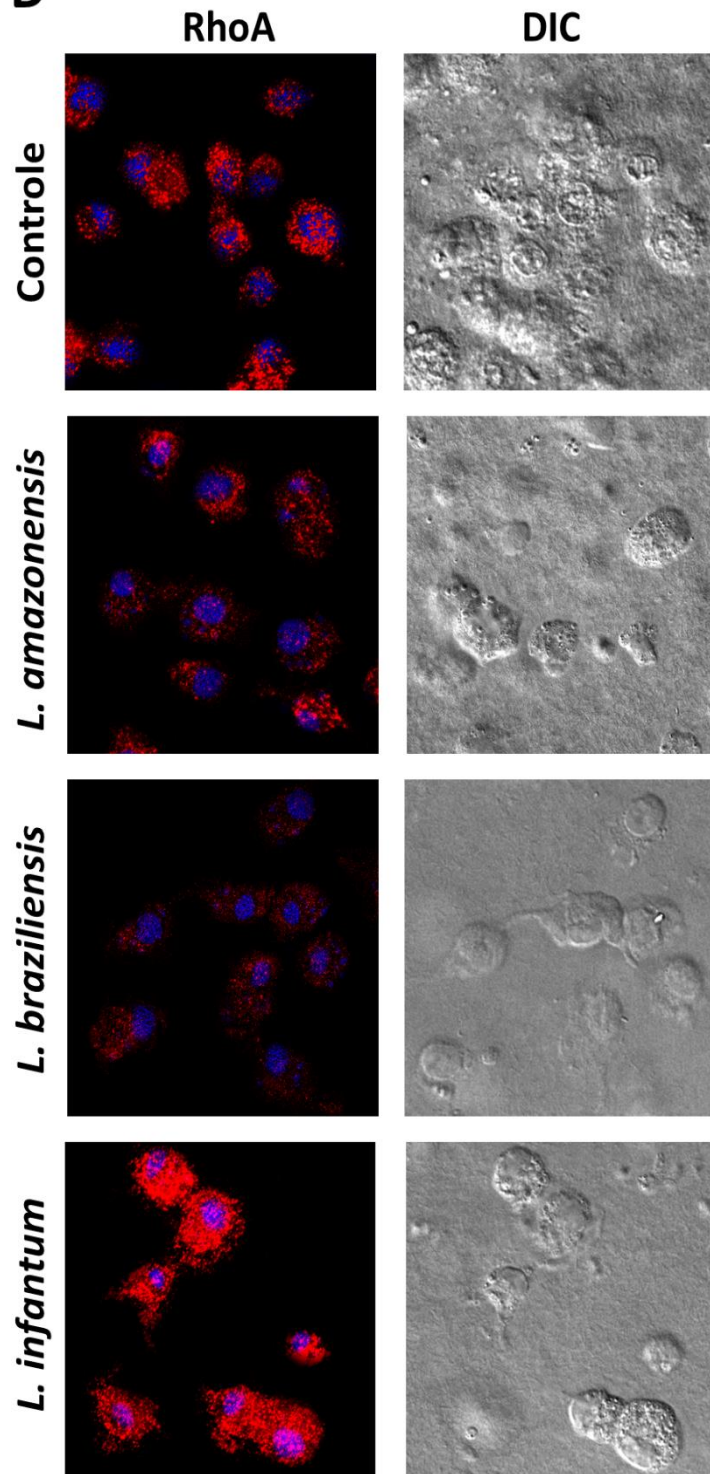
*amazonensis*. Mostramos ainda uma redução da expressão de RhoA e gelsolina em macrófagos infectados por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (Figura 11).

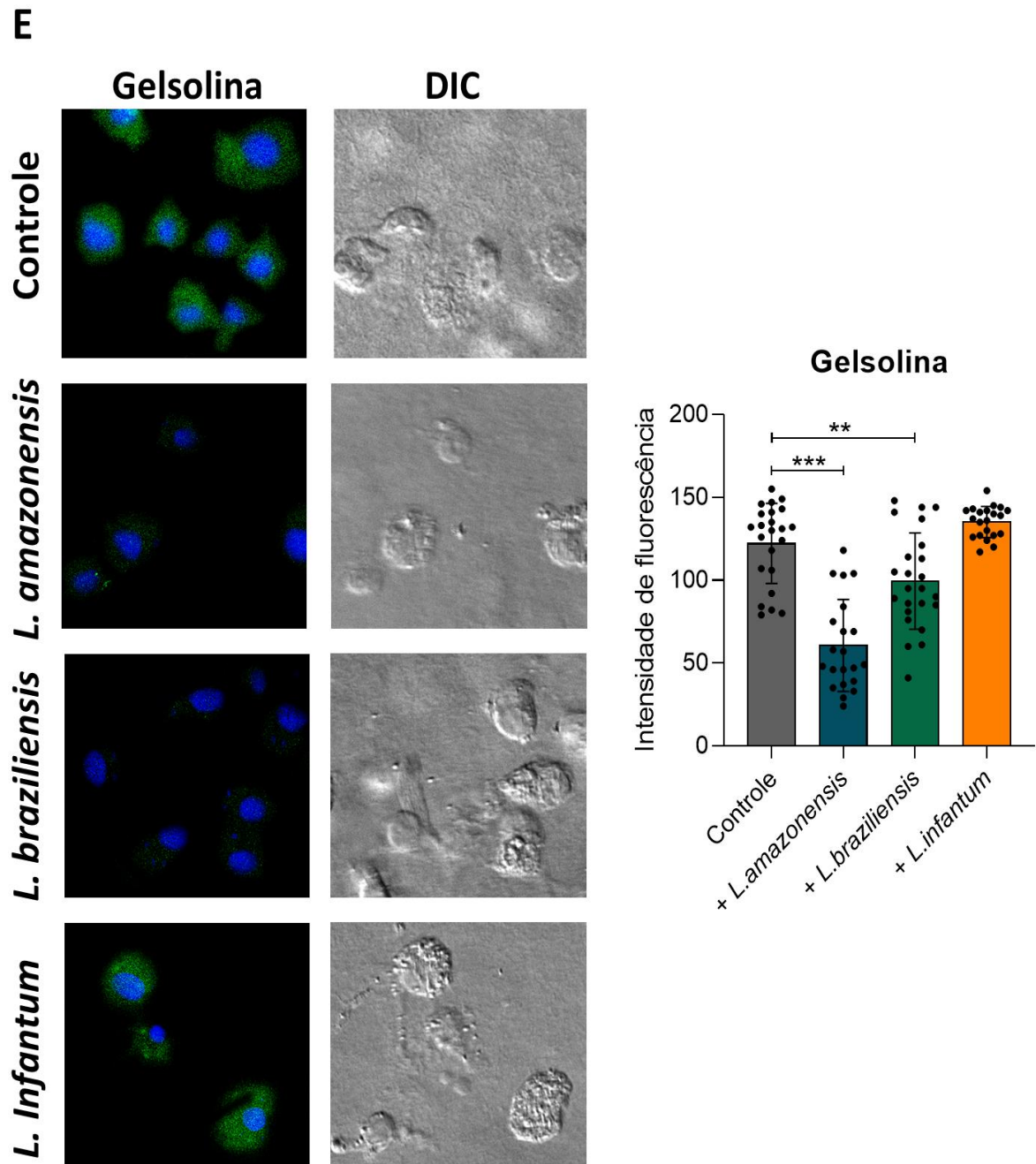
**A**

**B**

C



**D**

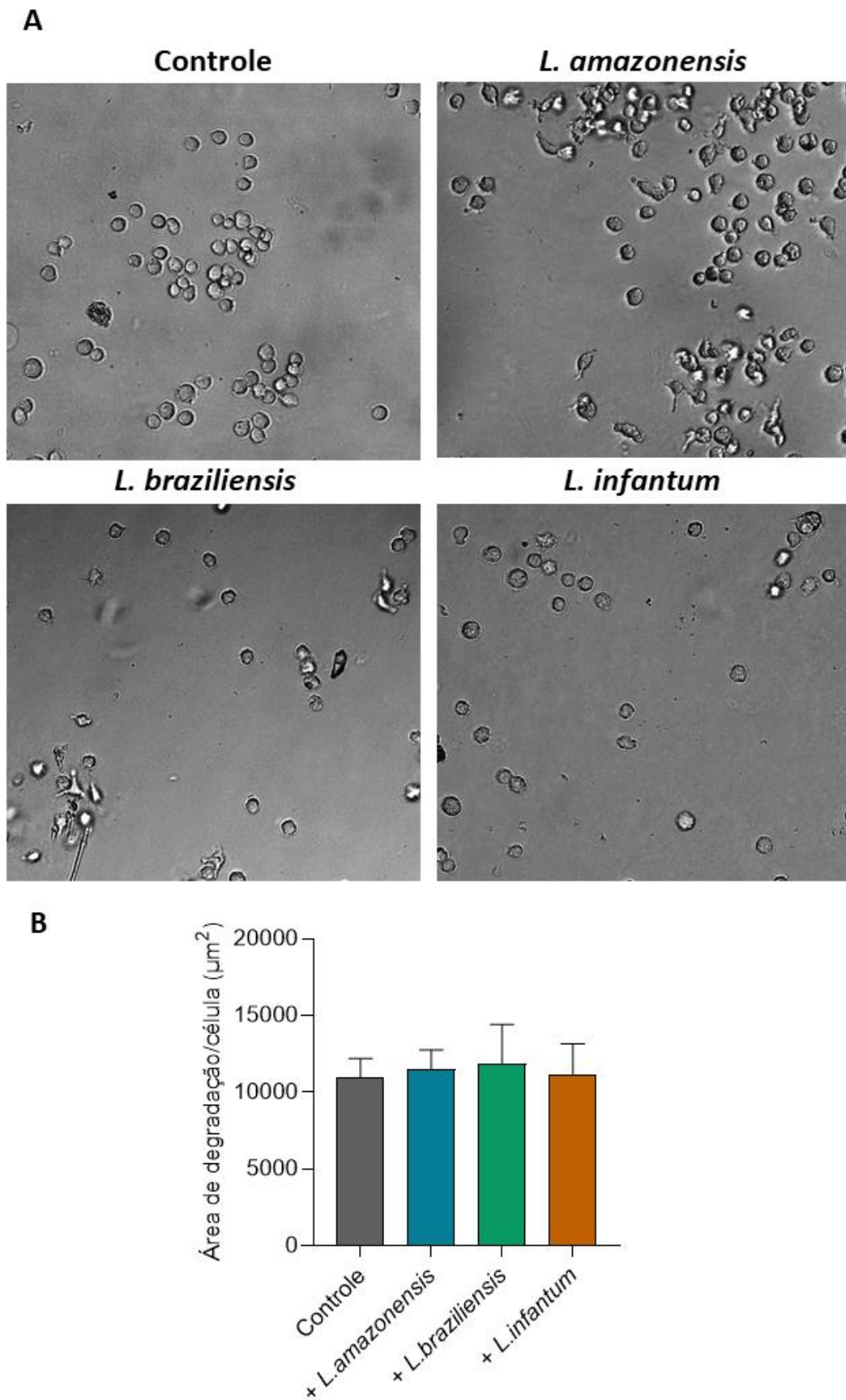


**Figura 11 – Organização do citoesqueleto de actina em macrófagos após infecção por *Leishmania* em ambiente tridimensional.** Macrófagos ( $2 \times 10^6$ ) embebidos em matriz de colágeno I, infectados ou não por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou *L. infantum* foram marcados com anticorpo anti-Rac1, anti-RhoA, anti-cdc42 e faloidina para avaliação da dinâmica da actina. **(A)** Expressão da intensidade de fluorescência para faloidina (verde). **(B)** Expressão da intensidade de fluorescência para anti-Rac1 (verde). **(C)** Expressão da intensidade de fluorescência para anti-Cdc42 (vermelho). **(D)** Expressão da intensidade de fluorescência para anti-RhoA (vermelho). **(E)** Expressão da intensidade de fluorescência para anti-gelsolina (verde). As fotos foram feitas em microscópio confocal Leica SP8. A intensidade de fluorescência das marcações foi quantificada através da média de 25 a 30 células para cada grupo utilizando o software FIJI. Azul, DAPI; Escala de cinza, DIC. \*\*\*,  $p < 0,001$  (Kruskal-Wallis). Resultados representativos de 1 experimentos.

## 6.6 DEGRADAÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR POR MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *LEISHMANIAS* EM AMBIENTE TRIDIMENSIONAL

Por fim, partimos para avaliar a migração mesenquimal de macrófagos infectados por *Leishmania* em ambiente tridimensional. Neste tipo de migração, a célula secreta proteases que degradam a matriz, favorecendo a sua migração (VAN GOETHEM *et al.*, 2010). A análise da degradação da matrigel por macrófagos infectados por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* mostrou que não houve diferença entre a área de degradação de matriz após a infecção, sugerindo que as três espécies de *Leishmania* estudadas não alteram a secreção de proteases pelo macrófago.





**Figura 12 – Avaliação da degradação de matriz densa por macrófagos após infecção por *Leishmania* em ambiente tridimensional.** Macrófagos infectados ou não por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou *L. infantum* foram adicionados ao topo de matrigel fluorescente (9mg/mL) por 48h. **(A)**

Macrófagos infectados ou não, embebidos em matrizes densas (matrigel). **(B)** Quantificação das áreas de degradação da matrigel 48h após a infecção. A visualização das áreas degradadas dos respectivos grupos foi feita por microscopia óptica de fluorescência. Foram quantificados 25 a 30 células para cada grupo utilizando o software Fiji. A análise não mostrou diferença significativa na degradação entre os grupos avaliados. \*\*\*,  $p < 0,001$  (ANOVA). Resultado representativo de 3 experimentos.

## 7 DISCUSSÃO

Na leishmaniose, a relação entre disseminação do parasito e doença é particularmente estreita. Nesse contexto, as áreas de lesão estão associadas a presença do parasito livre ou dentro de fagócitos como macrófagos. Na LC, as lesões permanecem restritas ao local da inoculação inicial do parasito, podendo, em alguns casos, disseminar para outros locais do corpo. Na leishmaniose visceral, o parasito dissemina a partir do local da picada para órgãos internos como baço, fígado e medula óssea (DOS-SANTOS *et al.*, 2004; REIS *et al.*, 2006). Entretanto, o mecanismo pelo qual o parasito dissemina no hospedeiro vertebrado e o papel das células infectadas neste processo permanece pouco explorado. Assim, neste estudo, avaliamos a migração de macrófagos murinos em ambiente tridimensional após a infecção por diferentes espécies de *Leishmania*, capazes de provocar diferentes formas clínicas.

Inicialmente, demonstramos por meio do ensaio de migração em matriz de colágeno I, que a infecção por *Leishmania spp.* leva à redução da velocidade de migração de macrófagos em ambiente tridimensional (Fig 9). Trabalhos anteriores mostraram que patógenos são capazes de modular a migração da célula hospedeira. Da Gama e colaboradores (2004) mostraram que a infecção por *Toxoplasma gondii* é capaz de inibir a adesão em macrófagos aos componentes da matriz extracelular de forma transitória, causando uma redução da velocidade de migração destas células (DA GAMA *et al.*, 2004). Em relação a *Leishmania*, dados na literatura demonstraram que a infecção de macrófagos por *L.amazonensis*, reduz a capacidade de adesão celular a diferentes substratos como colágeno, laminina e fibronectina (CARVALHAL *et al.*, 2004; PINHEIRO *et al.*, 2006). Estudos mostram ainda que a infecção por *Leishmania* leva à redução da migração de macrófagos em ambiente bidimensional (BLEWETT; KADIVAR; SOULSBY, 1971; BRAY *et al.*, 1983; DE MENEZES *et al.*, 2016).

Apesar da maioria dos estudos da literatura avaliarem a migração em ambiente bidimensional, a infiltração da célula nos tecidos ocorre em ambiente tridimensional (LEY *et al.*, 2007). Nesse ambiente, a célula é capaz de migrar de formas diferentes, a depender da densidade da matriz extracelular na qual ela se encontra. Na matriz menos densa, como a de colágeno I, a célula assume o tipo de migração amebóide, ao passo que em matriz densa a célula migra de forma mesenquimal (WIESNER *et al.*, 2014). Estudos na literatura já demonstraram que patógenos são capazes de

modular de forma diferente os tipos de migração. A infecção de macrófagos por HIV-1, por exemplo, leva à redução da migração em ambiente 2D e 3D na forma amebóide, entretanto induz o aumento da migração mesenquimal nestas células (VÉROLLET; LE CABEC; MARIDONNEAU-PARINI, 2015).

Semelhante ao observado em ambiente bidimensional por Menezes e colaboradores (2016), este trabalho mostra uma redução da migração amebóide de macrófagos infectados por *L. amazonensis* associada à uma redução da expressão de FAK e paxilina em ambiente tridimensional (Fig 10). A fosforilação de FAK possui papel fundamental na adesão celular, pois sua ativação leva à fosforilação e, conseqüentemente, ativação de paxilina, proteína chave na adesão e migração celular (SCHALLER; PARSONS, 1995). Em estudos utilizando fibroblastos embrionários de camundongos mutante para FAK, ao qual a paxilina não consegue se ligar, foi possível observar a perda da localização e fosforilação de FAK nos pontos de adesão focal, resultando na alteração da dinâmica de migração e na inibição da adesão celular (DERAMAUDT, 2014). Em estudo envolvendo *T. cruzi*, foi observado que este patógeno é capaz de aumentar a ativação de FAK, aumentando assim o quadro de cardiomiopatia e sugerindo um aumento da disseminação da doença (Melo, 2019). Em estudo recente, Menezes e colaboradores (2016) mostraram não apenas uma redução da migração de macrófagos em ambiente bidimensional após a infecção por *L. amazonensis*, mas também que esta redução independe da carga parasitária no interior da célula hospedeira, da expansão do vacúolo parasitóforo e de fatores solúveis liberados pelas células infectadas, mas envolve a redução da formação dos complexos de adesão e alteração da dinâmica de actina nestas células. O citoesqueleto de actina irá desempenhar um papel fundamental durante o processo migratório, sendo a família Rho-GTPase essencial nessa dinâmica (RIDLEY; HALL, 1992). Já foi demonstrado que a inibição de Rho GTPases provoca deficiência na migração celular (SANDER *et al.*, 1999). Cdc42 e Rac1 induzem a polimerização de actina pelo complexo Arp2/3 através da ligação e ativação de suas proteínas efetoras, N-WASP e WAVE-2, respectivamente (SPIERING; HODGSON, 2011). Adicionalmente, macrófagos nocautes para Rac1, perdem a capacidade invasiva em ambientes de matriz densa como matrigel (WHEELER *et al.*, 2006). Assim, para avaliar o efeito da infecção na dinâmica de macrófagos e seu possível envolvimento na modulação da migração observada em ambiente tridimensional, analisamos não apenas a marcação de F-actina por faloidina, mas também a expressão de moléculas

envolvidas na dinâmica destes filamentos como Rac1, Cdc42, RhoA e gelsolina. Nossos resultados mostram um aumento da expressão de Rac1 após a infecção por *L. braziliensis* e *L. infantum*, ao passo que a infecção por *L. amazonensis* leva ao aumento da expressão de Cdc42. Estes dados sugerem que a infecção por diferentes espécies de *Leishmania* pode levar ao aumento da dinâmica de actina e protusão na borda anterior da célula, de forma similar ao que foi observado para migração de macrófagos infectados em ambiente bidimensional (Menezes et al., 2014).

Além de Rac1 e Cdc42, RhoA também é essencial para o processo de migração celular. Esta proteína é responsável pela formação de fibras de stress no corpo celular e porção posterior da célula (RIDLEY; HALL, 1992). Sua atividade está relacionada com a diminuição de protusão (NOBES; HALL, 1999; ROTTNER; HALL; SMALL, 1999). Adicionalmente, a ativação de ROCK por RhoA é capaz de bloquear a polimerização de actina (ZEBDA *et al.*, 2000). Nossos resultados mostram uma redução da expressão de RhoA após a infecção por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, sugerindo que essas espécies de *Leishmania* suprimem a atividade de RhoA, favorecendo a formação de protusões na célula infectada. Adicionalmente, neste trabalho, avaliamos também a expressão de gelsolina, uma das proteínas de ligação à actina que induz a quebra da F-actina (KHAITLINA; FITZ; HINSSEN, 2013; MCGOUGH *et al.*, 2003; SILACCI *et al.*, 2004). Dados na literatura já demonstraram que a proteína *YopO* de *Yersinia* é capaz de fosforilar gelsolina permitindo a ligação e separação da actina, contribuindo assim para a redução da actina filamentosa e alteração da dinâmica da actina em células fagocíticas (SINGARAVELU *et al.*, 2017). Neste trabalho, observamos uma redução na expressão de gelsolina em macrófagos infectados por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, sugerindo uma maior formação de actina filamentosa nestas células. Os dados da avaliação da expressão de moléculas envolvidas na organização de filamentos de actina sugerem um aumento da dinâmica de actina nas regiões dos lamelipódios ou filopódios, após a infecção pelas espécies de *Leishmania* estudadas, em ambiente tridimensional, como observado por Menezes e colaboradores (2016). Entretanto, é necessário repetir estes experimentos, visto que a polimerização de actina ocorre de forma extremamente dinâmica na célula e envolve diversos mecanismos bioquímicos e de sinalização.

A migração mesenquinal, assim como a amebóide, é fundamental para migração das células nos tecidos, permitindo que as células atravessem, por exemplo, a membrana basal (VAN GOETHEM *et al.*, 2010). Em uma matriz mais densa, como a

matrigel, o macrófago assume uma migração mesenquimal, dependente da secreção de proteases e consequente degradação da matriz extracelular (WIESNER, 2014). Esta degradação envolve principalmente a ação de metaloproteases de matriz (MMPs), catepsinas e o uPA (VEROLLET et al., 2011). Para avaliar o processo de migração mesenquimal em macrófagos infectados por diferentes espécies de *Leishmania*, nós quantificamos a área de degradação de matriz ao redor de macrófagos infectados por *Leishmania spp.*. Os nossos resultados mostram que a infecção por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* não altera a secreção de proteases por estas células, sugerindo que *Leishmania* não modula a migração mesenquimal de macrófagos murinos. Embora dados na literatura demonstrem que a infecção por *Leishmania* estimula a produção de MMPs em macrófagos infectados no hospedeiro levando a degradação de matriz, o que promove a disseminação do parasito (LIARTE et al., 2001). Além disso, o papel das MMPs já foi associado ao desenvolvimento de leishmaniose visceral em cães e humanos (MACHADO et al., 2010), inclusive os níveis de MMPs no soro ou tecido tem sido considerados imunomarcadores para monitorar o sucesso de terapias e prever resultados clínicos favoráveis na leishmaniose visceral (DE OLIVEIRA et al., 2013), sendo também associada como marcador para desenvolvimento de leishmaniose mucocutânea (MARETTI-MIRA et al., 2011). Já foi associado altos níveis de MMP-9 após infecção por *Leishmania* estando associada a digestão extracelular de componentes da matriz e regulação da permeabilidade microvascular na resposta inflamatória (CAMPOS et al., 2014; MARETTI-MIRA, A. C. et al., 2011; MARETTI-MIRA et al., 2011). Já em relação a MMP-2 foram relatados baixos níveis após a infecção por *Leishmania* (MACHADO et al., 2010; MARETTI-MIRA et al., 2011). Desta forma, há necessidade de mais estudos para avaliar melhor a relação entre a área de degradação de matriz pelos macrófagos infectados com os níveis de expressões de MMPs após a infecção por diferentes espécies de *Leishmania*.

Este é o primeiro estudo, do nosso conhecimento, que avalia a migração de macrófagos murinos infectados por *Leishmania* em ambiente tridimensional. Em conjunto, os nossos resultados sugerem que a infecção por *Leishmania*, seja por uma espécie associada à LC ou LV, leva a redução da migração de macrófagos. Esses dados sugerem um possível papel para estas células no local da picada e no desenvolvimento e manutenção da lesão, mas não diretamente na disseminação do parasito no hospedeiro vertebrado. Entretanto, estudos complementares são

necessários, inclusive para avaliar a migração de outros tipos celulares, para compreender melhor o processo de disseminação da *Leishmania* no hospedeiro vertebrado.

## 8 CONCLUSÃO

A infecção por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou *L. infantum* leva à redução da migração amebóide de macrófagos murinos em ambiente tridimensional. Esta redução da migração está associada à alteração da dinâmica de actina e redução formação de complexos de adesão nestas células.



## 9 PERSPECTIVAS

- a) Avaliar a migração de macrófagos infectados por *Leishmania* spp. em matriz densa;
- b) Avaliar a formação de podossomos em macrófagos infectados por *Leishmania* spp. em ambiente tridimensional;
- c) Avaliar a expressão de MMPs em macrófagos infectados por *Leishmania* spp em ambiente tridimensional.

## REFERÊNCIAS

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

AKHOUNDI, M. *et al.* Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 3 Mar. 2016.

ALEXANDER, J.; RUSSELL, D. G. The Interaction of Leishmania Species with Macrophages. **Advances in Parasitology**, v. 31, n. C, p. 175–254, 1 jan. 1992.

ARTHUR, W. T.; PETCH, L. A.; BURRIDGE, K. Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. **Current Biology**, v. 10, n. 12, p. 719–722, 1 jun. 2000.

ASHFORD, R. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12–13, p. 1269–1281, nov. 2000.

BATES, P. A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 1 aug. 2007.

BELLIS, S. L. *et al.* Adhesion of fibroblasts to fibronectin stimulates both serine and tyrosine phosphorylation of paxillin. **Biochemical Journal**, v. 325, n. 2, p. 375–381, 15 jul. 1997.

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, 1971.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose tegumentar (LT)**, Brasil, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/leishmaniose-tegumentar-lt>. Acesso em: 15 de Dezembro de 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose visceral**, Brasil, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/leishmaniose-visceral>. Acesso em: 15 de Dezembro de 2020.

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

BROWN, M. C.; TURNER, C. E. Roles for the tubulin- and PTP-PEST-binding paxillin

LIM domains in cell adhesion and motility. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 34, n. 7, p. 855–863, 2002.

CAMPOS, T. M. *et al.* Matrix Metalloproteinase 9 Production by Monocytes is Enhanced by TNF and Participates in the Pathology of Human Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, 2014.

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.

DA GAMA, L. M. *et al.* Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion molecules and in vivo migration of murine macrophages infected with *Toxoplasma gondii*. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 14, p. 1287–1296, 2004.

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, 2017.

DE OLIVEIRA, F. A. *et al.* High levels of soluble CD40 ligand and matrix metalloproteinase-9 in serum are associated with favorable clinical evolution in human visceral leishmaniasis. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, 2013.

DEAKIN, N. O.; TURNER, C. E. Paxillin comes of age. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 15, p. 2435–2444, 2008.

DEMALI, K. A.; BURRIDGE, K. Coupling membrane protrusion and cell adhesion. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 12, p. 2389–2397, 2003.

DERAMAUDT, T. B. *et al.* Altering FAK-paxillin interactions reduces adhesion, migration and invasion processes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e92059, 2014.

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

DOS-SANTOS, W. L. C. *et al.* Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniosis. **Parasitology Research**, v. 92, p. 89-94, 2004.

EGELMAN, E. H. The structure of F-actin. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 6, n. 2, p. 129–151, Apr. 1985.

EVANS, J. G. *et al.* Macrophage podosomes assemble at the leading lamella by growth and fragmentation. **Journal of Cell Biology**, v. 161, n. 4, p. 697–705, 2003.

FRIEDL, P.; WOLF, K. Plasticity of cell migration: A multiscale tuning model. **Journal of Cell Biology**, vol. 188, no. 1, p. 11–19, 11 Dec. 2010.

GARDEL, M. L. *et al.* Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 26, p. 315–333, 10 Nov. 2010.

GINSBERG, M. H. Integrin activation. **BMB Reports**, v. 47, n. 12, p. 655–659, 2014.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 230–250, Jul. 1993.

GUPTA, S.; NISHI. Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug discovery. **Indian Journal of Medical Research**, v. 133, n. 1, p. 27–39, Jan. 2011.

HOLMES, K. C. *et al.* Atomic model of the actin filament. **Nature**, v. 347, n. 6288, p. 44–49, 1990.

HUTTENLOCHER, A.; HORWITZ, A. R. Integrins in cell migration. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 9, p. 1–16, 2011.

HUVENEERS, S.; DANEN, E. H. J. Adhesion signaling - Crosstalk between integrins, Src and Rho. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. 8, p. 1059–1069, 15 Apr. 2009.

HYNES, R. O. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, v. 110, n. 6, p. 673–687, 20 Sep. 2002.

JONES, G. E. Cellular signaling in macrophage migration and chemotaxis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 68, n. 5, p. 593–602, 2000.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

KHAILINA, S.; FITZ, H.; HINSEN, H. The interaction of gelsolin with tropomyosin modulates actin dynamics. **FEBS Journal**, v. 280, n. 18, p. 4600–4611, Sep. 2013.

LANE, R. P. Sandflies (Phlebotominae). **Medical Insects and Arachnids**, p. 78–119, 1993.

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.
- LEY, K. *et al.* Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 9, p. 678–689, 2007.
- LIARTE, D. B. *et al.* QBC for the diagnosis of human and canine american visceral leishmaniasis: preliminary data. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 6, p. 577–581, 2001.
- LÓPEZ-COLOMÉ, A. M. *et al.* Paxillin: A crossroad in pathological cell migration. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 10, n. 1, 18 Feb. 2017.
- MACHADO, G. F. *et al.* Differential alterations in the activity of matrix metalloproteinases within the nervous tissue of dogs in distinct manifestations of visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 136, n. 3–4, p. 340–345, 15 Aug. 2010.
- MAEKAWA, M. *et al.* Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. **Science**, v. 285, n. 5429, p. 895–898, 6 Aug. 1999.
- MARETTI-MIRA, A. C. *et al.* Therapeutic failure in American cutaneous leishmaniasis is associated with gelatinase activity and cytokine expression. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 163, n. 2, p. 207–214, Feb. 2011.
- MARETTI-MIRA, A. C. *et al.* MMP-9 activity is induced by Leishmania braziliensis infection and correlates with mucosal leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 119, n. 2–3, p. 160–164, 1 Aug. 2011.
- MCGOUGH, A. M. *et al.* The gelsolin family of actin regulatory proteins: Modular structures, versatile functions. **FEBS Letters**, v. 552, n. 2–3, p. 75–81, 25 Sep. 2003.
- MITRA, S. K.; HANSON, D. A.; SCHLAEPFER, D. D. Focal adhesion kinase: In command and control of cell motility. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 1, p. 56–68, Jan. 2005.
- MITRA, S. K.; SCHLAEPFER, D. D. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 18, n. 5, p. 516–523, Oct. 2006.
- 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.

- 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, 22 Mar. 1999.
- 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.
- PLAYFORD, M. P.; SCHALLER, M. D. The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. **Oncogene**, v. 23, n. 48, p. 7928–7946, 18 Oct. 2004.
- PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 111–129, 2015.
- REIS, A. B. *et al.* Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 68–75, Aug. 2006.
- 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, 7 Aug. 1992.
- RIDLEY, A. J. *et al.* Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. **Science**, v. 302, n. 5651, p. 1704–1709, 2003.
- ROMER, L. H.; BIRUKOV, K. G.; GARCIA, J. G. N. Focal adhesions: Paradigm for a signaling nexus. **Circulation Research**, v. 98, n. 5, p. 606–616, Mar. 2006.
- 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, 17 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, n. 5, p. 1009–1021, 29 Nov. 1999.
- SANTIAGO-MEDINA, M. *et al.* Regulation of ecm degradation and axon guidance by growth cone invadosomes. **Development (Cambridge)**, v. 142, n. 3, p. 486–496, 1 Feb. 2015.
- 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.

SHEETZ, M. P. *et al.* Cell migration as a five-step cycle. **Biochemical Society symposium**, v. 65, p. 233–243, 1999.

SILACCI, P. *et al.* Gelsolin superfamily proteins: Key regulators of cellular functions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 19–20, p. 2614–2623, Oct. 2004.

SINGARAVELU, P. *et al.* Yersinia effector protein (YopO)-mediated phosphorylation of host gelsolin causes calcium-independent activation leading to disruption of actin dynamics. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 19, p. 8092–8100, 12 May 2017.

SPIERING, D.; HODGSON, L. Dynamics of the rho-family small GTPases in actin regulation and motility. **Cell Adhesion and Migration**, v. 5, n. 2, p. 170–180, 2011.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 82, 15 Dec. 2017.

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open biology**, v. 7, n. 9, 2017.

TANG, D. D.; GERLACH, B. D. The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration. **Respiratory Research**, v. 18, n. 1, 2017.

TOUTANT, M. *et al.* Alternative Splicing Controls the Mechanisms of FAK Autophosphorylation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 22, p. 7731–7743, 15 Nov. 2002.

TURNER, C. E. Paxillin and focal adhesion signalling. **Nature Cell Biology**, v. 2, n. 12, p. E231-E2236, 2000.

VAN DEN DRIES, K. *et al.* Probing the mechanical landscape – new insights into podosome architecture and mechanics. **Journal of Cell Science**, v. 132, n. 24, 15, 2019.

VAN GOETHEM, E. *et al.* Matrix Architecture Dictates Three-Dimensional Migration Modes of Human Macrophages: Differential Involvement of Proteases and Podosome-Like Structures. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 2, p. 1049–1061, 15 Jan. 2010.

VERAS, P.; BEZERRA DE MENEZES, J. Using Proteomics to Understand How Leishmania Parasites Survive inside the Host and Establish Infection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 8, p. 1270, 2016.

- VÉROLLET, C. *et al.* Extracellular proteolysis in macrophage migration: Losing grip for a breakthrough. **European Journal of Immunology**, v. 41, p. 2805–2813, 2011.
- VÉROLLET, C.; LE CABEC, V.; MARIDONNEAU-PARINI, I. HIV-1 infection of T lymphocytes and macrophages affects their migration via Nef. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 514, p. 1-6, 2015.
- WHEELER, A. P. *et al.* Rac1 and Rac2 regulate macrophage morphology but are not essential for migration. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 13, p. 2749–2757, 1 Jul. 2006.
- WHO. **Leishmaniasis**. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1). Acesso: 14 de setembro de 2020.
- 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.
- WOZNIAK, M. A. *et al.* Focal adhesion regulation of cell behavior. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1692, n. 2–3, p. 103–119, 5 Jul. 2004.
- YANO, H. *et al.* Roles played by a subset of integrin signaling molecules in cadherin-based cell-cell adhesion. **Journal of Cell Biology**, v. 166, n. 2, p. 283–295, 19 Jul. 2004.
- ZAIDEL-BAR, R. *et al.* Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. **Biochemical Society Transactions**, vol. 32, p. 416–420, Jun. 2004.
- ZAMIR, E.; GEIGER, B. Components of cell-matrix adhesions. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 20, 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, 27 Nov. 2000.