

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Parasitologia

**INFECÇÃO DE CÉLULAS NÃO FAGOCÍTICAS POR AMASTIGOTAS DE
Leishmania amazonensis : um estudo dos mecanismos celulares envolvidos na invasão da
célula hospedeira**

Thamires Queiroz de Oliveira

Belo Horizonte

2022

Thamires Queiroz de Oliveira

**INFECCÃO DE CÉLULAS NÃO FAGOCÍTICAS POR AMASTIGOTAS DE
Leishmania amazonensis : um estudo dos mecanismos celulares envolvidos na invasão da
célula hospedeira**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Parasitologia na Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para à obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Orientador: Thiago de Castro Gomes, Ph.D

Coorientadora: Maria de Fátima Horta, Ph.D

Belo Horizonte

2022

043

Oliveira Thamires Queiroz de.

Infecção de células não fagocíticas por amastigotas de *Leishmania amazonensis*: um estudo dos mecanismos celulares envolvidos na invasão da célula hospedeira [manuscrito] / Thamires Queiroz de Oliveira. – 2022.

72 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Thiago de Castro Gomes, Coorientadora: Maria de Fátima Horta.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Leishmania. 3. Leishmaniose. 4. Macrófagos. 5. Fibroblastos. 6. Neutrófilos. I. Gomes, Thiago de Castro. II. Horta, Maria de Fátima. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO PROGRAMA DE GRADUAÇÃO PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

DISSERTAÇÃO: 443/2022/12

TÍTULO: "INFECÇÃO DE CÉLULAS NÃO FAGOCÍTICAS POR AMASTIGOTAS DE LEISHMANIA AMAZONENSIS : UM ESTUDO DOS MECANISMOS CELULARES ENVOLVIDOS NA INVASÃO DA CÉLULA HOSPEDEIRA"

ALUNA: THAMIRES QUEIROZ DE OLIVEIRA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PROTOZOOLOGIA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **vinte e nove de setembro de 2022**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes doutores:

Daniella Castanheira Bartholomeu

UFMG

Luciana de Oliveira Andrade

UFMG

Maria de Fátima Martins Horta - Coorientador

UFMG

Thiago de Castro Gomes- Orientador

UFMG

Belo Horizonte, 29 de setembro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Thiago de Castro Gomes, Professor do Magistério Superior**, em 30/09/2022, às 13:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniella Castanheira Bartholomeu, Professora do Magistério Superior**, em 30/09/2022, às 15:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria de Fatima Martins Horta, Membro**, em 30/09/2022, às 17:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana de Oliveira Andrade, Membro de comitê**, em 30/09/2022, às 21:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1638000** e o código CRC **EC303284**.

Agradecimentos

Sempre gostei de ler dedicatórias e agradecimentos, mas escrever foi difícil, não por que eu não sou grata, mas porque tenho tantos motivos para agradecer que acho que me faltaram palavras e me sobraram muitas lágrimas antes de concluir estes agradecimentos.

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, pois sou grata pela dádiva da vida e por tudo que tem me proporcionado até hoje.

À minha mãe, Janete, a mulher mais forte e batalhadora que conheço, a razão de toda minha fortaleza, que nunca me deixou desistir, que sempre me incentivou, pelo carinho e zelo que sempre me proporcionou e por sempre vibrar de alegria pelas minhas conquistas.

Aos meus irmãos, Igor e Jackson, que são os melhores irmãos que eu poderia ter, agradeço pela cumplicidade, pelo cuidado, por me ouvir reclamar e se indignarem junto comigo, nossa irmandade sempre será o meu bem mais precioso.

Ao meu pai, Ademar de Oliveira, gostaria de dedicar este trabalho também a ele, mesmo que ele não tenha conseguido me ver alcançar essa conquista, espero que ele esteja feliz e em paz onde estiver.

Ao meu namorado, Fredson, que me incentiva, que me tira boas risadas, por me aturar quando estou estressada e por fazer meus dias melhores.

À minha família, tios, tias, primos e primas que sempre estão comigo, que se preocupam, me dão conselhos e me apoiam.

Aos meus amigos de laboratório, Mariana, Victor, Anna e Laura com quem pude aprender muito e ensinar o que foi me passado com tanto cuidado, pelos cafés, pela companhia e pelas boas risadas.

Ao Elimar, que me ensinou a rotina do laboratório, meu confidente, obrigada pelos conselhos e por comemorar meu crescimento no laboratório de forma orgulhosa.

A minha coorientadora, a professora Maria de Fátima Horta, Patiu, que abriu as portas do seu laboratório para mim, obrigada por ter me dado essa confiança e participado da minha formação científica, sempre solícita ao me ouvir e entender. Obrigada pelas conversas terapêuticas, pela calma que transmite, pelos conselhos, e por todo apoio.

Ao meu orientador, o professor Thiago Castro Gomes, que enxergou em mim um futuro que nunca almejei. Obrigada pela confiança, pelos ensinamentos, por exercer sua profissão com excelência, o que nos faz interessar ainda mais pelo mundo científico. Agradeço também pelas críticas construtivas, pela felicidade demonstrada a cada resultado alcançado, por sempre querer o nosso melhor e fazer-nos dar o nosso melhor.

Aos colegas de outros laboratórios e colaboradores, agradeço por toda colaboração entre nós estabelecida na esperança de que mais colaborações frutíferas venham.

Ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia da UFMG e aos professores pela excelência de ensino, assim como a agência financiadora CAPES.

Sou muito grata por tudo e a todos que contribuíram direta ou indiretamente, muitíssimo obrigada!

*''Ninguém ignora tudo.
Ninguém sabe de tudo.
Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma coisa.
Por isso aprendemos sempre''*

Paulo Freire

RESUMO Os parasitos intracelulares são caracterizados pela necessidade de invadir e viver dentro das células hospedeiras. Para *Leishmania* spp. é geralmente assumido que o parasito deve ser capturado por células fagocitárias, notadamente os macrófagos. No entanto, vários estudos descreveram a presença de amastigotas de *Leishmania* spp. dentro de células não-fagocitárias. Uma vez que a invasão de células hospedeiras é um processo chave nas infecções por parasitos intracelulares, decidimos investigar os mecanismos que permitem às amastigotas de *Leishmania amazonensis* invadir células sem a capacidade de realizar fagocitose clássica. Utilizamos diferentes técnicas de biologia celular para estudar o processo de invasão celular de células não-fagocitárias por amastigotas de *L. amazonensis* em fibroblastos embrionários de camundongos (MEF). Realizamos e quantificamos ensaios de infecção e marcamos células infectadas e parasitos para visualizar por diferentes técnicas de microscopia, organelas e estruturas possivelmente envolvidas na invasão celular. Os nossos resultados mostram que as formas amastigotas vivas, mas não as amastigotas mortas (fixadas com paraformaldeído), são rapidamente internalizadas em MEFs, onde sobrevivem e persistem em vacúolos parasitóforos ricos em marcadores lisossômicos. Ao marcar as células hospedeiras com sondas para F-actina e utilizando inibidores da polimerização da actina, demonstramos que a invasão depende do citoesqueleto da célula hospedeira. Microscopias confocais de momentos iniciais da infecção indicam que o parasito é capaz de induzir uma re-organização extremamente localizada do citoesqueleto da célula hospedeira para induzir a invasão. Uma vez que demonstramos anteriormente que as promastigotas utilizam os lisossomos de células hospedeiras e não seu citoesqueleto para invadir fibroblastos, propomos agora que a invasão celular de células não fagocíticas por *L. amazonensis* é mecanisticamente diferente para cada uma das duas formas evolutivas apresentadas pelo parasito. A presença de amastigotas de *Leishmania* spp. dentro das células não-fagocitárias é um aspecto negligenciado da biologia destes parasitos. Estudos sobre estas novas vias de infecção e sobre o papel das células não-fagocitárias no decurso da infecção podem fornecer informações importantes sobre a biologia destes parasitos e sobre as doenças por eles causadas.

PALAVRAS-CHAVES: *Leishmania amazonensis*; amastigotas; invasão celular

ABSTRACT Intracellular parasites are characterized by the need to invade and live within host cells. For *Leishmania* spp. it is commonly assumed that the parasite must be captured by phagocytic cells, notably macrophages. However, several studies have described the presence of *Leishmania* spp. amastigotes within non-phagocytic cells. Since cell entry is a key process in infections by intracellular parasites we decided to investigate the mechanisms that allow *Leishmania amazonensis* amastigotes to invade cells lacking the ability to perform classical phagocytosis. Here we used different cell biology techniques to study the cell invasion process of non-phagocytic cells by *L. amazonensis* amastigotes in mouse embryonic fibroblasts (MEF). We performed and quantified infections, labelled infected cells and parasites to visualize molecules, organelles and structures possibly involved in cell invasion and proceeded analysis by different microscopy techniques. Our results show that living, but not PFA-fixed amastigotes, are rapidly internalized in MEFs, where they survive and persist within parasitophorous vacuoles rich in lysosomal markers. By labeling host cells with F-actin probes and using inhibitors of actin polymerization we demonstrated that invasion is dependent on host cell cytoskeleton. Confocal microscopies of early moments of infection indicate that the parasite is able to induce an extremely localized re-arrangement of host cell cytoskeleton to induce invasion. Since we had previously demonstrated that promastigotes use host cell lysosomes and not F-actin to invade MEFs we now propose that cell invasion of non-phagocytic cells by *L. amazonensis* is mechanistically different for each of the two evolutive forms presented by the parasite. The presence of *Leishmania* spp. amastigotes within non-phagocytic cells is an overlooked aspect of their biology. Studies on these new infection routes and on the role of non-phagocytic cells in the course of infection may provide important information about the biology of these parasites and the diseases they cause.

KEY WORDS: *Leishmania amazonensis*, Amastigotes, Cellular Invasion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos de invasão por parasitos intracelulares.....	21
Figura 2: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	23
Figura 3: Cultivo de <i>L. amazonensis</i> , obtenção das formas amastigotas e testes de viabilidade.....	34
Figura 4: Infecção de macrófagos com formas promastigotas, amastigotas e promastigotas re-transformadas de <i>L. amazonensis</i>	35
Figura 5: Amastigotas de <i>L. amazonensis</i> são capazes de invadir células não fagocíticas.	37
Figura 6: Amastigotas de <i>L. amazonensis</i> permanecem viáveis no interior de fibroblastos após invasão da célula hospedeira.....	38
Figura 7: Vacúolos parasitóforos fusogênicos são detectados em fibroblastos quando os mesmos são infectados por formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	39
Figura 8: Quantificação da infecção de fibroblastos por amastigotas de <i>L. amazonensis</i> em diferentes tempos de incubação	40
Figura 9: Internalização de amastigotas e promastigotas de <i>L. amazonensis</i> em fibroblastos depende da viabilidade dos parasitos	42
Figura 10: Internalização de amastigotas e promastigotas de <i>L. amazonensis</i> depende da viabilidade dos parasitos e amastigotas são mais infectantes para fibroblastos	43
Figura 11: Amastigotas <i>L. amazonensis</i> são envoltas em filamentos de actina nos momentos iniciais da invasão celular em fibroblastos	45
Figura 12: A invasão de fibroblastos por amastigotas de <i>L. amazonensis</i> é dependente de filamentos de actina	46
Figura 13: A invasão de fibroblastos por amastigotas de <i>L. amazonensis</i> é dependente do citoesqueleto de actina da célula hospedeira	48
Figura 14: Comparação da invasão celular de amastigotas e promastigotas de <i>L. amazonensis</i> em fibroblastos pré-tratados com citocalasina-D.....	49
Figura 15: Modelo proposto para a invasão de células não fagocíticas por formas amastigotas e promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	50

Lista de siglas e abreviaturas

AMA	Amastigotas
BSA	Albumina Bovina Sérica (do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>)
C3	Componente 3 do Complemento
Cito-D	Citocalasina-D
CO₂	Dióxido de Carbono
CR	Receptor para Complemento (do inglês, <i>Complement Receptor</i>)
DAPI	4,6-Diamino-2-Fenilindol
DC	Células Dendríticas (do inglês <i>Dendritic Cells</i>)
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
ELISA	Ensaio imunosorvente ligado a enzima (do inglês <i>Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay</i>)
FACS	Citometria de Fluxo (do inglês <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>)
F-actina	Filamentos de actina

Fc	Fragmento cristalizável das imunoglobulinas
HeLa	Células imortalizadas de câncer cervical de Henrietta Lacks
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LAMP	Proteína Lisossômica Associada a Membrana (do inglês <i>Lysosomal Associated Membrane Protein</i>)
LC	Células de Langerhans
LLa	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>
M199	Meio 199
MEF	Fibroblastos embrionários de camundongo
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5 difenil tetrazólio
NI	Células não-tratadas/Não infectadas
NOS2	Óxido Nítrico Sintase 2
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato-Salino (do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)

PFA	Paraformaldeído
pH	Potencial de Hidrogênio
MP	Membrana Plasmática (do inglês, <i>Plasma Membrane</i>)
PRO	Promastigotas
RAW	Macrófagos murinos
RFP	Proteína Vermelha Florescente (do inglês, <i>Red Fluorescent Protein</i>)
SFB	Soro Fetal Bovino

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 <i>Leishmanias</i> e seus vetores	13
1.2 Leishmanioses	14
1.3 Células hospedeiras de <i>Leishmania</i> spp.....	15
Macrófagos	15
Neutrófilos	16
Células dendríticas.....	18
Fibroblastos	18
Células Epiteliais e Musculares.....	19
1.4 Invasão celular por parasitos intracelulares	19
1.5 Processo de infecção por <i>Leishmania</i> spp.....	22
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2.1 Objetivos específicos.....	27
4. METODOLOGIA	28
5. RESULTADOS	32
6. DISCUSSÃO	51
FIGURA SUPLEMENTAR	58
REFERENCIAS	59
ANEXO 1	66

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença negligenciada cuja incidência concentra-se principalmente nas regiões do sul da Ásia, leste da África, região mediterrânea e América Latina, afetando cerca de 14 milhões de pessoas, com 2 milhões de novos casos por ano (WHO 2020). Segundo o Programa Global de Leishmaniose da OMS, no ano de 2018 Afeganistão, Argélia, Bolívia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Paquistão, Peru, República Árabe, Síria e Tunísia, notificaram mais de 5.000 casos de leishmaniose tegumentar. No mesmo ano, mais de 90% dos casos globais de leishmaniose visceral foram relatados no Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. A doença é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos por flebotomíneos hematófagos fêmea dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (OKWOR; UZONNA, 2016).

1.1 *Leishmanias* e seus vetores

Leishmania spp. são protozoários dimórficos, apresentando duas formas principais, a forma amastigota, intracelular e a forma promastigota, extracelular. Estes parasitos pertencem à família *Trypanosomatidae* (Doflein, 1901), subfamília *Leishmaniinae* (Maslov e Lukes, 2012), e gênero *Leishmania* (Ross, 1903) que, por sua vez, se divide em quatro subgêneros, *Leishmania*, *Viannia*, *Mundinia* e *Sauroleishmania*. Em 1987, Laison e Shaw propuseram a classificação de *Leishmania* em subgêneros de acordo com o local de desenvolvimento dos parasitos no trato digestivo do flebotomíneo, sendo que o subgênero *Leishmania* agrupa espécies que colonizam porções do intestino médio, presentes no Novo e Velho Mundo, e o subgênero *Viannia*, espécies que estabelecem infecção inicial na região posterior e que são restritas aos neotrópicos (AKHOUNDI *et al.*, 2016). Recentemente foi proposta uma nova classificação que divide a espécie *Leishmania* em duas grandes linhagens, a *Euleishmania* e a *Paraleishmania*. A *Euleishmania* é composta por subgêneros da *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* e *Leishmania* *complexo enrietti* e a *Paraleishmania* inclui as cepas *L. hertigi*, *L. deanei*, *L. colombiense*, sendo este último o único encontrado em humanos (CUPOLILLO *et al.*, 2000).

As diversas espécies são transmitidas por insetos fêmeas do gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo e *Lutzomyia*, no Novo Mundo. Durante o repasto sanguíneo o vetor regurgita na derme do hospedeiro as formas promastigotas metacíclicas, forma flagelada extracelular do parasito e que são infectantes para os hospedeiros vertebrados (MELBY; TRAVI; YANETH OSORIO, 2019)(OLIVIER, GREGORY, FORGET, 2005). Essa

forma evolutiva extracelular se localiza no trato intestinal dos flebotomíneos, apresentando flagelo longo e corpo celular alongado, diferentemente das formas amastigotas, que são formas intracelulares arredondadas e que vivem no hospedeiro vertebrado após a invasão celular (OLIVIER, GREGORY, FORGET, 2005).

Atualmente são conhecidas 53 espécies de *Leishmania*, sendo que 29 ocorrem no Velho Mundo, 20 no Novo Mundo e 3 em ambos (AKHOUNDI *et al.*, 2016). No Brasil, são 8 espécies identificadas, sendo 6 do subgênero *Viannia* e 2 do subgênero *Leishmania*. A Leishmaniose tegumentar é causada, principalmente, pelas espécies *L. (V) braziliensis*, *L. (V) guyanensis* e *L. (L) amazonensis* (BRASIL, Ministério da Saúde; 2007)(MELO; ROSSONI; TEODORO, 2017) e a Leishmaniose visceral é causada por *L. (L) chagasi* (BRASIL, Ministério da Saúde; 2006).

1.2 Leishmanioses

A doença se apresenta em 3 formas clínicas que dependem da espécie envolvida, do grau de virulência e do estado imunológico do hospedeiro (DESJEUX, 2004). A forma tegumentar é causada principalmente pelas espécies *L. amazonensis*, *L. major*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. tropica*, *L. aethiopica* e *L. guyanensis*. Essa manifestação se caracteriza pelo aparecimento de lesões de pele localizadas que cicatrizam espontaneamente ou evoluem para a cronicidade, dando origem às formas tegumentar e visceral, formas clínicas que envolvem alto grau inflamatório e robusta lesão tecidual, ou a forma disseminada da doença, de difícil tratamento e que é mais frequente em pacientes imunocomprometidos (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

A forma mais grave é a leishmaniose visceral, causada mais comumente pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum*. Caracteriza-se pelo acometimento de órgãos internos como fígado e baço, com alto índice de mortalidade, onde os indivíduos infectados apresentam febre, perda de peso, anemia e sangramentos. O tratamento geralmente é falho devido à sua alta toxicidade e à persistência do parasito em meio intracelular, o que leva a frequentes recidivas (GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013).

Uma vez inoculados pela picada do inseto vetor, os protozoários têm como alvo final e principal as células fagocitárias, particularmente os macrófagos (GOSSAGE *et al.*, 2003), embora estudos mostrem que esse parasito também consegue infectar células desprovidas de capacidade fagocítica (CHANG, 1978; CHANG, 1979; BOGDAN *et al.*, 2002; PESSOTTI *et al.*, 2014). Ao serem fagocitados, formam-se fagossomos que se fundem com lisossomos, formando os vacúolos parasitóforos e, graças ao pH ácido deste ambiente, as formas promastigotas se diferenciam nas formas amastigotas, que se

replicam no interior da célula hospedeira do mamífero e que são as responsáveis pela amplificação do parasitismo no hospedeiro vertebrado (GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013).

O tratamento existente para a leishmaniose tem diversas limitações, devido aos muitos efeitos colaterais e à dificuldade da adesão ao tratamento por parte dos pacientes (MINUZZO *et al.*, 2022). Atualmente, tem-se cinco drogas para o tratamento de leishmaniose, sendo os antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime), de primeira escolha e a Anfotericina B, de segunda escolha (ADRIAENSEN *et al.*, 2018)(SANTIAGO; PITA; GUIMARÃES, 2021). O tratamento produz melhoras clínicas principalmente em casos leves e moderados, no entanto, pode não eliminar completamente os parasitos, ocorrendo, assim recaídas frequentes (SANTIAGO; PITA; GUIMARÃES, 2021). No caso de recidiva não se tem um esquema terapêutico específico, mas pode ser aplicada uma combinação das drogas disponíveis (FREITAS *et al.*, 2021).

1.3 Células hospedeiras de *Leishmania* spp.

Quando no hospedeiro vertebrado estes parasitos encontram seu abrigo ideal no interior de suas células hospedeiras, onde permanecem ao abrigo dos efetores séricos da imunidade, notadamente do sistema do complemento. Assim como para qualquer parasito intracelular, as *Leishmanias* necessitam penetrar suas células hospedeiras de forma rápida e eficiente. Como as amastigotas de *Leishmania* spp. são encontradas de forma majoritária em macrófagos nas lesões de humanos e animais cronicamente infectados, por muito tempo assumiu-se que estes parasitos só conseguiam estabelecer a vida intracelular quando ativamente capturados por suas células hospedeiras. Entretanto, vários tipos celulares não fagocíticos já foram descritos *in vivo* abrigando formas amastigotas tanto em lesões humanas como em animais naturalmente ou experimentalmente infectados. Para a maioria destas células, os possíveis papéis que podem representar na manutenção do ciclo do parasito e no curso da doença permanecem desconhecidos.

Macrófagos

Os macrófagos podem ser considerados alvos preferenciais ou finais das *Leishmania*, pois trata-se, de fato, do tipo celular mais frequentemente encontrado infectado nas lesões e onde os parasitos se propagam na fase crônica da doença. As promastigotas são internalizadas através da mediação de receptores que induzem a

fagocitose nos macrófagos (e também em outras células fagocíticas como mencionado adiante). Várias moléculas de superfície dos parasitos e dos macrófagos têm sido implicadas na interação entre *Leishmania* spp. com os macrófagos, tais como os receptores do Sistema do Complemento, os receptores de reconhecimento padrão, como o receptor de manose, receptor de lectina tipo C e receptores tipo *Toll-like*. Entretanto, *in vivo*, outros receptores podem ter papéis importantes na ligação e sinalização dos macrófagos para a fagocitose, visto que os parasitos podem interagir com várias outras moléculas, tais como C3b, C3bi, fibronectina e proteína C-reativa antes do contato com os macrófagos (KANE; MOSSER, 2000)(HORTA *et al.*, 2020).

Aderem e Underhill (2002) descreveram que a ligação individual destes receptores não desencadeia a ativação de macrófagos, sugerindo que a ligação múltipla desses receptores pode ser importante para iniciar a internalização. Foi mostrado que promastigotas metacíclicas de *L. infantum* usam o receptor de complemento 3 (CR3), mas não o receptor de manose-fucose para entrar em macrófagos, enquanto que promastigotas avirulentas, usam ambos os receptores para entrar nas células (LIU; UZONNA, 2012). A fagocitose de promastigotas e amastigotas por macrófagos é acompanhada por vários eventos moleculares envolvidos na ativação de respostas imunes inatas e adaptativas, inclusive algumas respostas que podem ser favoráveis à adaptação e replicação das amastigotas (HORTA *et al.*, 2012).

Quando é internalizada via fagocitose, a *Leishmania* residirá no fagolisossomo, um compartimento que a separa do citoplasma celular (NADERER; MCCONVILLE, 2008). O macrófago libera substâncias que são responsáveis pela destruição do parasito, entretanto, os parasitos são capazes de subverter a capacidade microbicida do macrófago, conseguindo sobreviver neste ambiente tóxico dentro do qual se multiplicam e a partir do qual infectam novos macrófagos por mecanismos ainda controversos (MCCONVILLE *et al.*, 2007) (NADERER; MCCONVILLE, 2008).

Neutrófilos

Os neutrófilos são as primeiras células a migrar para o local da lesão em infecções vetoriais, fagocitando o parasito e sendo, portanto, um alvo para *Leishmania* spp. (PETERS *et al.*, 2008) (CECÍLIO *et al.*, 2014). A lesão e a saliva do vetor, associados à microbiota do flebótomo presente no fluido salivar, são suficientes para atrair estes fagócitos. Adicionalmente, a infecção com promastigotas metacíclicas induz liberação de

IL-8 e fator quimiotático neutrofílico, citocinas potentes para atração neutrofílica (PETERS *et al.*, 2008). O influxo e as respostas desses granulócitos são transitórios, embora possam permanecer por 8 dias na região da picada (RIBEIRO-GOMES; SACKS, 2012). Foi observado um segundo influxo neutrofílico uma semana após a infecção por *L. major*, coincidindo com o aparecimento da lesão, sendo os sinais de recrutamentos distintos da primeira, com mediadores da resposta imune adaptativa, como a IL-17, que contribuem para o infiltrado celular e a evolução da lesão (KOSTKA *et al.*, 2009). Desta forma, então, o parasito comprovadamente transita entre diferentes tipos celulares até que finalmente atinja os macrófagos.

Algumas evidências demonstram que as *Leishmanias* são capazes de modular a vida útil dos neutrófilos, podendo atrasar ou acelerar sua morte por vias apoptóticas (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2012). Essa modulação contribui para que o parasito possa sobreviver nesta célula até que seu alvo final, o macrófago, sejam atraídos para o local pela liberação de diferentes fatores quimiotáticos que estimulam remoção dos corpos apoptóticos por fagocitose (CAVALCANTE-COSTA *et al.*, 2022). O processo de invasão dos neutrófilos por promastigotas seguido de apoptose e fagocitose por macrófagos é chamado de a “hipótese do cavalo de Tróia” (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003)

Antigamente, acreditava-se que o neutrófilo não permitia a transformação de parasitos em amastigotas e nem sua replicação, sendo essas células consideradas apenas como hospedeiras transitórias. Entretanto, foi demonstrado que as amastigotas conseguem se replicar dentro dos neutrófilos, usando-as como nichos iniciais de replicação (HURRELL *et al.*, 2017). Assim, a infecção *in vivo* do macrófago, pode ocorrer por ingestão de outros tipos celulares, particularmente os neutrófilos ou seus corpos apoptóticos contendo amastigotas viáveis (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003). Isto sugere que outros tipos celulares já descritos como infectados pelo parasito podem funcionar como reservatório das formas amastigotas. É perfeitamente plausível hipotetizar que outros tipos celulares, fagocíticos ou não, também podem funcionar como cavalos de Tróia para os macrófagos, notadamente se considerarmos que é função primordial dos macrófagos fagocitar quaisquer tipos celulares mortos, infectados ou não, nos diferentes tecidos do corpo. Importante frisar que este mecanismo de infecção indireta, onde o macrófago não entra em contato direto com a superfície do patógeno, implica uma não ativação das funções microbicidas do fagócito

sendo possível que este mecanismo seja importante para explicar a susceptibilidade desta célula imune ante à infecção por *Leishmania* spp.

Células Dendríticas

As células dendríticas (DC) são leucócitos heterogêneos, originados da medula óssea ou derivados de monócitos, são classificados como células apresentadoras de antígenos profissionais, contribuindo com a ativação dos linfócitos T, que potencializa a resposta imune (MOLL, 2003).

A pele tem pelo menos três populações de DC, que são compostas por células de Langerhans epidérmicas (LC) e dois subconjuntos de DC dérmicas migratórias. Ritter e colaboradores (2004) e Liu e Uzonna (2012), demonstraram que as LC possuem papel importante no estabelecimento da infecção. Alguns desses fagócitos são mais propensos à infecção, pois têm menor capacidade em secretar IL-12, citocina crucial para a ativação das células T que protegem contra o parasito (LIU; UZONNA, 2012). Portanto, acredita-se que a resistência e a suscetibilidade à infecção por *Leishmania* esteja relacionada à função das células dendríticas (SUZUE *et al.*, 2008).

Ritter *et al.* (2004) e Xavier *et al.* (2005) analisaram o papel das LC em pacientes com leishmaniose tegumentar causados por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. mexicana*, observando uma redução da densidade das LC na infecção por *L. braziliensis* com resposta de hipersensibilidade tardia. Entretanto, na infecção por *L. amazonensis* havia aumento das LC, o que sugere que *L. amazonensis* pode usar as LCs para ativar células T, causando supressão da resposta imune das células T. Dados similares foram observados em DCs murinas e humanas infectadas por *L. amazonensis* (JI; SUN; SOONG, 2003)(SOONG, 2008).

Fibroblastos

Os fibroblastos são células do tecido conjuntivo que atuam na manutenção e reparação tecidual. São responsáveis pela biossíntese de colágeno, proteínas intercelulares, elastina, glicosaminoglicanas e glicoproteínas multiadesivas que fazem parte da matriz extracelular. Além disso, essas células se caracterizam pela produção de fatores de crescimento que controlam o desenvolvimento e diferenciação celular (GUIDO *et al.*, 2012).

Diversos estudos mostram que as *Leishmania* é capaz de infectar os fibroblastos. Foi comprovado que a *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. major* conseguem invadir e se diferenciar em amastigotas dentro dessas células, enquanto a *L. donovani* parece não ter a capacidade de se diferenciar e de se replicar (CHANG, 1978)(LEWIS, 1974)(LEWIS, 2016)(DEDET *et al.*, 2016)(LEWIS, 2016)(CAVALCANTE-COSTA *et al.*, 2019). Bogdan e colaboradores (2000) analisou a atividade antileishmania dos fibroblastos, a partir da expressão de NOS2, enzima responsável pela produção de óxido nítrico, e verificou que a expressão desta enzima é menor em fibroblastos infectados por *Leishmania* quando comparados as células fagocíticas profissionais e outras não profissionais. Como os fibroblastos possuem fraca capacidade de eliminar o parasito, os mesmos podem persistir dentro dessas células por períodos prolongados (CHANG, 1978)(BOGDAN *et al.*, 2000a)(PESSOTTI *et al.*, 2004).

Os fibroblastos foram classificados como componentes responsáveis por reações inflamatórias, pois quando ativados por substâncias liberadas durante o dano tecidual ou produtos derivados de microrganismos invasores, podem produzir citocinas como a IL-8, que atraem neutrófilos e a IL-16, que induz a ativação e quimiotaxia das células T, dentre outras moléculas que atraem neutrófilos, macrófagos e células T, interferindo assim na resposta imunológica (SMITH *et al.*, 1997)(XIA *et al.*, 1997). Neste contexto, e dentro da hipótese do cavalo de Tróia, é possível que esta célula, várias vezes descritas como infectadas *in vivo*, exerçam papel semelhante ao dos neutrófilos, podendo servir de reservatório para os parasitos, nichos de latência e resistência a partir do qual macrófagos podem se infectar.

Células Epiteliais e Musculares

As células epiteliais e sua interação com as *Leishmania* têm sido menos estudadas em comparação a outros tipos celulares. Em um estudo feito por Belle (1958), foi observado que *L. donovani* consegue se multiplicar em células epiteliais de placenta humana (ARANGO; 2016). Em outros estudos sobre as *Leishmania*, vários autores descrevem a presença de miopatia inflamatória, mostrando amastigotas em tecidos oculares, esqueléticos, cardíaco, pulmonar e muscular (PACIELLO *et al.*, 2009)(VAMVAKIDIS *et al.*, 2000)(NARANJO *et al.*, 2010)(ARANGO; 2016).

1.4. Invasão celular por parasitos intracelulares

Para estabelecer a vida intracelular, os microorganismos utilizam diversas estratégias para atravessar a barreira imposta pela membrana plasmática e pelo citoesqueleto celular. Alguns patógenos intracelulares bacterianos e virais podem ser endocitados através de pequenas invaginações da membrana plasmática (MP) (COSSART; HELENIUS, 2014). As bactérias podem invadir pelo envolvimento direto de receptores da superfície da célula hospedeira ou por translocação de proteínas bacterianas para o citosol da célula, bactérias como a *Shigella*, causadora da disenteria bacilar, utilizam um mecanismo que é induzido pela bactéria e que provoca rearranjos localizados de actina nos locais de invasão que envolvem o patógeno (COSSART; SANSONETTI, 2004).

Além dos vírus e procariotos temos microorganismos intracelulares maiores e eucariotos como os protozoários causadores da doença de chagas, da malária, da toxoplasmose e das leishmanioses. Esses parasitos intracelulares têm coevoluído com os seres humanos e estabeleceram interações específicas e complexas, formando a base de seu tropismo celular. Eles usam essas interações para invadir células hospedeiras bem como migrar pelos tecidos, evadir da ação do sistema imune e proceder a invasão celular (WALKER *et al.*, 2014). Entender como esses microorganismos invadem suas células-alvo é fundamental para o entendimento da infecção e de seu respectivo quadro clínico e evolução. Desenvolver uma maneira de atravessar a membrana plasmática do hospedeiro é uma etapa obrigatória para os patógenos intracelulares estabelecerem a infecção, portanto, várias estratégias para penetrar células hospedeiras foram desenvolvidas pelos diferentes microorganismos, incluindo os protozoários intracelulares. A invasão celular pode ser realizada através da formação de uma junção móvel que direciona parasitos para o citoplasma, como observado nos protozoários *Toxoplasma gondii* e para *Plasmodium* spp. (BESTEIRO; DUBREMETZ; LEBRUN, 2011), a injeção direta de parasitos através de uma estrutura especializada que guia o patógeno até sua célula hospedeira, como nos microsporídeos (XU; WEISS, 2005) ou a fagocitose, como nos gêneros *Leishmania*, *Listeria*, *Chlamydia*, e outros (SCHILLE *et al.*, 2018) (Figura 1).

O *T. cruzi* invade diferentes tipos de células ativamente, formando vacúolos intracelulares originados de invaginações da membrana plasmática que ocorrem independentemente dos rearranjos de actina de células hospedeiras, sendo assim, um processo distinto da fagocitose. Estudos mostraram que a entrada de *T. cruzi* em células hospedeiras envolve o recrutamento e fusão de lisossomos para o local de invasão do

parasito (FERNANDES *et al.*; 2011). Tardieux (2014) observou que o *T. cruzi* desencadeia um aumento de Ca^{2+} intracelular nas células hospedeiras, o que é necessário para o recrutamento e fusão dos lisossomos no local de invasão e que são envolvidos no processo de reparo de membrana plasmática. Desta forma, a invasão das tripomastigotas ocorre pela subversão do processo celular de reparo de membrana plasmática dependente de lisossomos o qual, presente em virtualmente todas as células nucleadas, acaba permitindo que o parasito invada uma ampla gama células não fagocíticas.

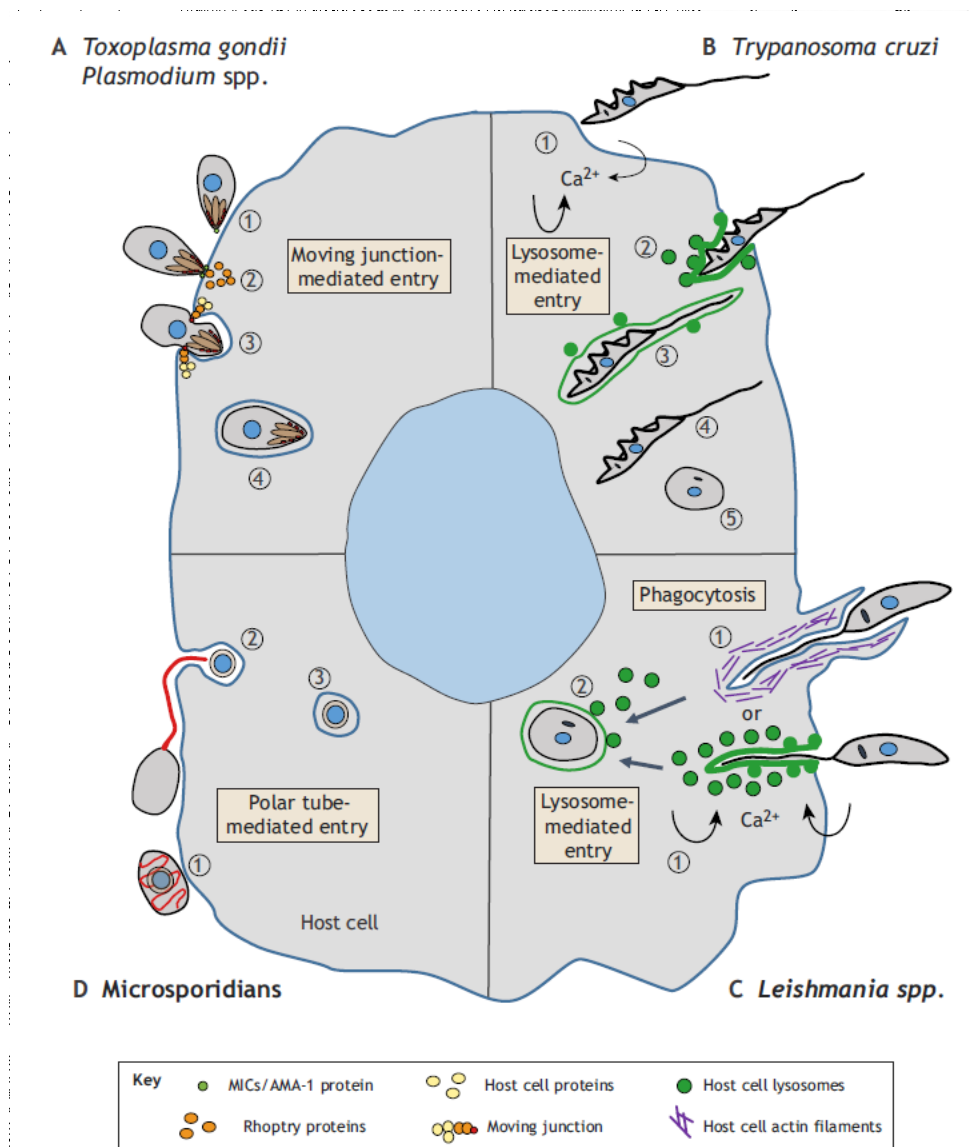


Figura 1: Mecanismos de invasão celular por parasitos intracelulares. Visão geral dos mecanismos de invasão celular utilizados pelos apicomplexas, cinetoplastídeos e microsporídios para invadir células hospedeiras. (A) (1) Os apicomplexas (por exemplo, *T. gondii* e *Plasmodium* spp.) interagem primeiro de forma fraca com a membrana plasmática da célula hospedeira. Em seguida, com o complexo apical perpendicular à membrana plasmática da célula hospedeira, as proteínas das róptrias são secretadas e formam a junção móvel (3), que fornece a força que conduz os parasitos para o citoplasma da célula

hospedeira (4). No interior das células hospedeiras, os parasitos residem num vacúolo não fusogênico e assim evitam a fusão lisossomal. (B) *T. cruzi* invade as células hospedeiras não-fagocitárias induzindo tanto (1) o influxo extracelular de Ca^{2+} através de lesões induzidas pelos parasitos na membrana plasmática como a libertação de Ca^{2+} armazenado intracelularmente. (2) O aumento nos níveis de Ca^{2+} citoplasmático leva ao recrutamento de lisossomos da célula hospedeira para o sítio de invasão que funcionam como vesículas exocíticas sensíveis a Ca^{2+} , que doam membranas ao vacúolo parasitóforo nascente. (3) No interior das células hospedeiras, o vacúolo continua a fundir-se com lisossomos, levando à sua acidificação, o que culmina com o escape dos parasitos para o citosol da célula hospedeira onde os mesmos se replicam como amastigotas. (C) *Leishmania* spp. são capturados por fagócitos através de (1) fagocitose mediada por actina ou por células não-fagocitárias através do recrutamento de lisossomos de células hospedeiras dependentes de Ca^{2+} que doam membranas aos vacúolos parasitóforos nascentes. Este processo parece ser o mesmo que a infecção por tripomastigotas de *T. cruzi*, indicando que os mecanismos subjacentes são conservados nestes cinetoplastídeos. (2) Após a invasão, *Leishmania* spp. vivem e se reproduzem dentro de vacúolos acídicos que se fundem com os lisossomos de suas células hospedeiras na via endossômica. (D) Os esporos dos microsporídeos ligam-se às células hospedeiras através da parede do esporo e extrudam o seu tubo polar, o que cria uma invaginação na membrana plasmática da célula hospedeira. O esporoplasma infeccioso viaja ao longo do lúmen do tubo polar e é entregue no local da infecção. Após a internalização, o parasito vive e replica-se dentro de vacúolos parasitóforos que não se fundem com lisossomos. (Adaptado de Horta *et al.*; 2020).

1.5. Processo de infecção por *Leishmania* spp.

O vetor de *Leishmania* spp. se torna infectado ao sugar o sangue de vertebrados portadores do parasito. A queda da temperatura e a elevação do pH no trato digestivo do inseto favorecem a conversão das formas amastigotas em promastigotas procíclicas, forma que se replica no interior do vetor. Por um processo denominado metaciclogênese, as promastigotas procíclicas se diferenciam nas formas infectantes para os vertebrados que são denominadas promastigotas metacíclicas. Por outro lado, o hospedeiro vertebrado se torna infectado quando o inseto vetor realiza seu repasto sanguíneo e regurgita as formas promastigotas metacíclicas na derme do hospedeiro (Figura 2) (Cavalcante-Costa, 2020).

Após a inoculação das formas promastigotas pela fêmea do flebotomíneo várias células têm sido implicadas como importantes nos primeiros passos da invasão, como os neutrófilos, que são as principais células a capturar as promastigotas na fase inicial da infecção (Peter *et al.*, 2008). Sendo assim, os macrófagos podem se infectar indiretamente através da ingestão de corpos apoptóticos contendo o parasito ou diretamente, através da captura direta das promastigotas (HORTA *et al.*, 2020), como explicado anteriormente.

Importante mencionar que nada se sabe a respeito de qual forma de invasão é preponderante, nem muito menos se uma ou outra favorece mais o parasitismo.

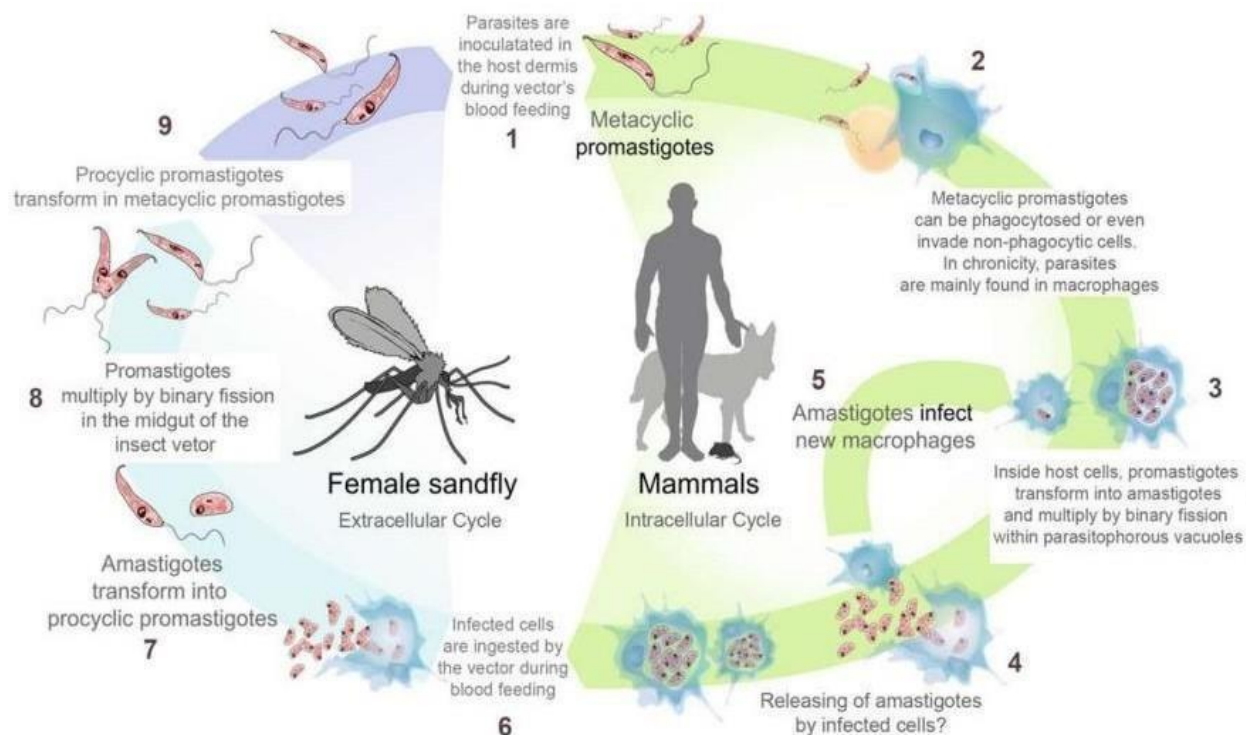


Figura 2: Ciclo de vida de *Leishmania* spp. (1) Durante o repasto sanguíneo, a fêmea infectada regurgita as formas metacíclicas de promastigotas na derme do hospedeiro vertebrado. (2) Estas formas infecciosas podem ser capturadas por fagócitos profissionais, tais como neutrófilos e macrófagos ou mesmo invadir células não-fagocitárias. (3) Dentro da célula hospedeira, durante a fase intracelular do ciclo, o parasito diferencia-se em amastigotas, que possuem forma arredondada e que vivem no interior das células dentro de vacúolos parasitóforos formados pela fusão do endossomo com os lisossomos das células hospedeiras na via endocítica. Dentro dos vacúolos, as amastigotas se replicam por divisão binária. (4) Antes que novos macrófagos possam ser infectados, não há comprovação de que ocorra ciclo lítico. Curiosamente, outros mecanismos tais como indução da apoptose com captura de corpos apoptóticos infectados por novos macrófagos ou a transferência de parasitos célula-célula têm sido propostos e demonstrados como possíveis vias de propagação de amastigotas entre os macrófagos. (5) Os mecanismos envolvidos na amplificação da infecção ainda continuam a ser discutidos e mal compreendidos. Apesar de se assumir que a replicação do parasito poderia levar à explosão celular, outros mecanismos parecem estar envolvidos, como explicado anteriormente. (6) O inseto vetor se infecta pela ingestão de células infectadas durante o repasto sanguíneo num hospedeiro infectado. (7) Dentro do intestino do inseto vetor fêmea, a amastigota é liberada e retransformada em promastigotas procíclicas flageladas que vivem e (8) se multiplicam extracelularmente. (9). Depois de passar pelo processo denominado metaciclologênese são geradas promastigotas metacíclicas, formas infecciosas que podem infectar hospedeiros vertebrados durante o repasto sanguíneo do vetor. (Adaptado de CAVALCANTE-COSTA *et al.*; 2020)

De toda forma, seja por mecanismos diretos ou indiretos, na cronificação da doença a maioria das células infectadas são macrófagos, os quais carregam em seu interior as formas amastigotas. Não se sabe ao certo como novos macrófagos são infectados pelas formas amastigotas. Ainda que seja comumente assumido que haja liberação de amastigotas de *Leishmania* mediante ruptura celular este fenômeno nunca foi documentado (HORTA *et al.*, 2020). De modo similar, pouco se sabe sobre a invasão direta de amastigotas em macrófagos. Já foi relatado que amastigotas podem expor fosfatidilserina em sua superfície, o que media o reconhecimento e captura pelos macrófagos numa via que inibe a atividade inflamatória do fagócito (WANDERLEY *et al.*, 2006) e também a transferência direta célula-célula de amastigotas externalizadas por uma célula infectada e em íntimo contato com uma célula não infectada para a qual os parasitos são transferidos (REAL *et al.*, 2014). Rittig e Bogdan (2000) descreveu que as formas amastigotas podem ser liberadas da célula hospedeira após fusão do vacúolo parasitóforo com a membrana plasmática, o que leva à “exocitose” dos parasitos sem que haja ruptura celular (revisado por RITTIG & BOGDAN, 2000).

Existe consenso de que as amastigotas conseguem entrar nas células por fagocitose, entretanto, é possível concluir com alguma segurança que as amastigotas também podem infectar células não fagocíticas. Muitas das descrições de amastigotas em células não fagocíticas ocorreram em órgãos internos e linfonodos, ou seja, longe da derme, sendo muito mais provável que tal infecção tenha ocorrido na cronicidade da doença, quando as poucas formas promastigotas inoculadas pelo vetor não mais existem. Apesar de que o mecanismo de entrada seja pouco compreendido, se sugere que esses parasitos podem explorar mecanismos já existentes na própria célula para conseguir invadi-las (KIMA, 2007), sendo frequentemente atribuído às amastigotas uma capacidade de induzir a fagocitose mesmo em células que não são fagocíticas clássicas. No contexto da fagocitose, alguns estudos mostram que a internalização da amastigota de *Leishmania* spp, *in vivo*, é mediada por receptores Fc e receptores de complemento (UNDERHILL; OZINSKY, 2002)(RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2012)(KIMA *et al.*, 2000). Estudos abordando a interação de amastigotas de *T. cruzi* com células HeLa mostraram que essa forma evolutiva exhibe filamentos agregados de actina que permitem a ligação à porção dorsal dessas células, semelhantes a microvilosidades. A agregação a estas microvilosidades gera uma estrutura em forma de “copo” por baixo do parasito, de forma

dependente do citoesqueleto e que culmina com a indução de um processo semelhante à fagocitose (MORTARA *et al.*, 2008) (FERNANDES *et al.*, 2013).

Como citado anteriormente, vários tipos celulares já foram descritos como infectados por *Leishmania* spp., dentre estes várias células não fagocíticas, como os fibroblastos, células musculares e epiteliais. Hoje sabemos que no caso da invasão de células não fagocíticas por promastigotas, esta forma evolutiva do parasito consegue induzir seu processo de internalização de forma ativa e que tal processo em nada se assemelha à fagocitose, possuindo topologia oposta e atores celulares e moleculares distintos da fagocitose (CAVALCANTE-COSTA *et al.*, 2019). Na verdade, para o caso das formas promastigotas, o tratamento das células hospedeiras com bloqueadores de fagocitose não só não impedem a infecção como culmina em taxas de infecção de quatro a cinco vezes maiores. Nós demonstramos que, assim como as tripomastigotas de *T. cruzi*, as promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* subvertem a via endocítica da célula hospedeira envolvida no reparo da membrana plasmática, desencadeando sinalização de cálcio, recrutamento e exocitose de lisossomos para induzir a invasão celular de maneira independente do citoesqueleto de actina, logo por um mecanismo bastante distinto da fagocitose. Assim, é possível que *in vivo* também as promastigotas de *Leishmania* não dependam unicamente de serem capturadas por fagocitose para estabelecer a infecção.

Quanto às formas amastigotas de *Leishmania* nada se sabe sobre o processo de invasão em células não fagocíticas. No caso do *T. cruzi*, o processo de captação das amastigotas por fagócitos há envolvimento e co-localização com F-actina, paxilina e talina nos copos fagocitários que são formados ao redor do parasito durante a internalização. O tratamento de macrófagos com genesteína, inibe a fosforilação de proteínas que auxiliam na fagocitose, impedindo a captação de amastigotas. Esse processo, como a fagocitose mediada por receptor, depende da fosforilação da proteína tirosina, que se trataria, assim, de um processo igual à fagocitose (LOVE; KANE; MOSSER, 1998). Entretanto, mesmo para o caso das amastigotas de *T. cruzi* não parece haver consenso sobre a rota de invasão em células não fagocíticas. Neste contexto, este trabalho buscou estudar a interação de amastigotas de *Leishmania* com fibroblastos e estudar o processo de invasão celular utilizado por esta forma evolutiva do parasito para invadir esta célula hospedeira.

2. JUSTIFICATIVA

Trabalhos de inúmeros e renomados grupos de pesquisa relatam há algumas décadas a presença de amastigotas de *Leishmania* spp. no interior de células não fagocíticas. A importância potencial e ainda inexplorada deste tipo particular de infecção vem do fato de que muitos dos tipos celulares não fagocíticos reportados como infectados *in vivo* tratam-se de células de grande longevidade e sem a capacidade de produção de efetores imunes que poderiam debelar a infecção, tornando estas células um esconderijo perfeito para os parasitos. Adicionalmente, parasitos habitando estes tipos celulares podem estar ao abrigo da ação de fármacos de referência, como o Glucantime, dado que a droga age preferencialmente contra parasitos presentes em macrófagos. Neste contexto, é altamente plausível hipotetizar que células não fagocíticas e não imunes infectadas por *Leishmania* spp. podem ser, por exemplo, responsáveis pela refratariedade ao tratamento e pelas frequentes recaídas e recidivas observadas após finalização dos tratamentos farmacológicos. A invasão de células não fagocíticas pela *Leishmania* spp. é um aspecto absolutamente negligenciado no estudo da biologia básica deste organismo e tem todo potencial de redimensionar nossa compreensão a respeito deste parasito, de seu ciclo de vida e das doenças por eles causadas. É possível que amastigotas de *Leishmania* spp. sejam dotadas da capacidade de invadir células não fagocíticas ativando nestas células uma habilidade fagocítica transiente, ou através da subversão de vias endocíticas dependentes de lisossomos, como já demonstrado pelo nosso grupo para as formas promastigotas, ou mesmo através de recrutamento focal de F-actina, semelhante à bactéria *Shigella*. Para além de desvendar aspectos básicos sobre o comportamento invasivo das amastigotas, compreender como estes parasitos invadem tais células e conhecer os determinantes celulares e bioquímicos que permitem tal invasão é o primeiro passo a ser dado no sentido de, no futuro, traçar-se estratégias para o bloqueio deste tipo de infecção e estudar seu impacto no curso da doença.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estabelecer um modelo de infecção de fibroblastos por amastigotas de *Leishmania amazonensis* e desvendar os mecanismos celulares e moleculares que regem a invasão celular.

3.2.1 Objetivos específicos

- Desenvolver um modelo de infecção de fibroblastos embrionários de camundongos (MEF) por amastigotas de *L. amazonensis*;
- Realizar ensaios comparativos de infecção por amastigotas e promastigotas em MEF comparando os processos infecciosos e seus mecanismos;
- Avaliar a viabilidade dos parasitos internalizados pelos fibroblastos, sua capacidade de re-transformação e manutenção da infectividade;
- Avaliar os papéis dos parasitos e das células hospedeiras no processo de internalização das amastigotas;

4. METODOLOGIA

Cultivo de *L. amazonensis*

A cepa de *Leishmania amazonensis* expressando a Proteína Fluorescente Vermelha (LLa-RFP) utilizada neste trabalho foi fornecida pelo Dr. David Sacks (NIH, Bethesda, EUA) e cultivadas como descritos em Carneiro *et al.*; 2018. A coloração vermelha das cepas RFP foi obtida através da transfecção de um plasmídeo contendo a proteína vermelha fluorescente, que confere tal coloração (Carneiro *et al.*, 2018). Para a cultura de promastigotas de LLa-RFP os parasitos foram mantidos em garrafas de cultura de 5 ml com meio M199 (GIBCO) acrescidos de 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina (GIBCO) e 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado pelo calor (GIBCO). Como antibiótico de seleção para manutenção dos parasitos expressando RFP, 50 µg/ml de geneticina G418 (Life Technologies) eram adicionados ao meio de cultura. As formas promastigotas eram mantidas em estufa de cultivo a 24°C. Inóculos de 1×10^6 /ml partindo de culturas em quinto dia de cultivo eram utilizados nos repiques de rotina para manutenção da cepa.

Para a obtenção de amastigota de LLa-RFP, foi empregado o protocolo estabelecido e descrito por Sarkar *et al.*; 2018. Partindo de culturas de quinto dia de promastigotas, os parasitos eram inoculados em meio próprio para amastigotas e mantidos a 34°C. Após transformação em amastigotas os parasitos eram repicados nas mesmas concentrações utilizadas para as formas promastigotas, sendo apenas mantidos em meio e temperaturas próprias para manutenção das formas amastigotas. Amastigotas axênicas saudáveis devem ter uma forma oval, sem flagelo visível, com membrana plasmática delimitada e núcleo e cinetoplastos bem marcados por GIEMSA. O meio contém nutrientes necessários para a formação das amastigotas e consiste, na verdade, no meio M199 suplementado com 0,25% de glicose, 0,5% de Trypticase (peptona), 40 mM de Succinico, 1% de Adenina (10mM), 1% de L-Glutamina, 20% de soro fetal bovino inativado e 1% de penicilina/estreptamicina. O protocolo completo para preparo deste meio encontra-se no Anexo 1 ao final deste manuscrito.

Ensaio de Viabilidade dos parasitos

Com a finalidade de avaliar a viabilidade dos parasitos cultivados, tanto das formas promastigotas quanto amastigotas, foram realizados dois testes distintos, o de eritrosina e o do MTT. A técnica da eritrosina se baseia na contagem de parasitos na

presença de corantes que marcam apenas os parasitos mortos. Após contagem em câmara de Neubauer, a porcentagem de parasitos viáveis era calculada. O teste do MTT é um teste colorimétrico que se baseia na capacidade dos parasitos viáveis de reduzir o substrato (sal de tetrazólio) a um produto insolúvel, o formazan, que pode ser quantificado por espectrofotômetro. Comumente utilizado para células de mamífero, o protocolo que utilizamos foi modificado para *Leishmania* como descrito por Dutta *et al.*; 2005. As análises dos metabólitos produzidos e o resultado final eram lidos no leitor de ELISA. Como controle negativo utilizávamos parasitos mortos.

Cultivo celular de fibroblastos embrionários de camundongo (MEF) e macrófagos murinos de linhagem (RAW).

Neste trabalho utilizamos fibroblastos embrionários de camundongos (MEF) e macrófagos murinos (RAW) como modelos de células hospedeiras. Os mesmos foram cultivados em garrafas 75 cm² com 10 ml de meio Dulbeccos Modified Eagle Medium (DEMEM) (GIBCO) com acréscimo de 10% de soro fetal bovino (GIBCO) inativado pelo calor e 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina (GIBCO). As células eram mantidas em estufas de cultivo com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, sendo feito repiques a cada 2 dias de cultivo de modo a manter as culturas sempre em condições de sub-confluência. Para os repiques utilizávamos solução de tripsina 0,25% (GIBCO) para desaderir as células.

Os macrófagos (RAW) foram cultivados em garrafas 75 cm² com 10 ml de meio DEMEM (GIBCO) acrescidos de 10% de soro fetal bovino (GIBCO) inativado pelo calor, acrescidos de 100 U/ml de penicilina e 100µl/ml de estreptomicina (GIBCO). As células eram mantidas em estufas de cultivo com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, sendo feito repiques a cada 2 dias de cultivo de modo a manter as culturas sempre em condições de sub-confluência. Para os repiques utilizávamos solução de tripsina 0,25% (GIBCO) para desaderir as células e também raspávamos o vasilhame com *cell scraper* (SARSTEDT), dado que os macrófagos tendem a se aderir mais fortemente ao substrato.

Experimentos de infecção

Para os ensaios de infecção, células provenientes de culturas sub-confluentes eram plaqueadas em placas de cultivo de 6 poços (KASVI) 24 horas antes dos experimentos na concentração de 3 x 10⁵ células por poço. Estas células eram diretamente inoculadas para crescimento nas placas (experimentos de FACS) ou sobre lamínulas de vidro inseridas ao

fundo da placa (ensaios de microscopia de fluorescência) e mantidas como descrito no item anterior. Os parasitos, *L. amazonensis*-RFP, nas formas amastigota ou promastigota, eram inoculados nas culturas celulares que eram centrifugadas a 500 x g por 5 minutos a 20°C para sincronizar o contato dos parasitos com a monocamada de células. Posteriormente, a placa era incubada a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ pelo período de tempo estabelecido e indicado para cada experimento. Para todos os experimentos de infecção foi utilizada uma razão de 25 parasitos por célula.

Experimentos de infecção com parasitos mortos fixados com PFA e em células pré tratadas com citocalasina-D

Em alguns ensaios os parasitos eram previamente fixados em paraformaldeído (PFA) 4% por 15 minutos para se verificar se as células eram capazes de capturar ativamente os parasitos mortos ou se a viabilidade dos mesmos era preponderante para a invasão celular. Para outros ensaios, foi utilizada a droga Citocalasina-D (SIGMA), um inibidor da polimerização de filamentos de actina, para se verificar o papel do citoesqueleto celular no processo de invasão celular. Para estes experimentos as células eram pré tratadas com 10 uM da droga por 30 minutos. Após o tratamento, o meio de cultura era trocado e as células incubadas com os parasitos pelo tempo indicado. Estas células eram desaderidas com tripsina 0,25%, o que também desadere parasitos ligados às células, mas não internalizados, e a quantificação da infecção era feita por citometria de fluxo (FACS). Para as amostras destinadas às microscopias, as células cultivadas em lamínulas eram fixadas com PFA 4% por 15 minutos e preparadas com sondas e colorações de acordo com o experimento.

Coloração Panótica

MEFs e células RAW infectadas com amastigotas ou promastigotas de LLa-RFP eram também fixadas e coradas por panótico para a visualização das estruturas celulares. Para esta coloração, as lamínulas eram imersas na solução 1 e 2 de cada solução do kit (RENYLAB) por 1 minuto e por 5 segundos na solução 3. Após a coloração, as lamínulas secas eram montadas em lâminas de microscopia utilizando o Entellan (MERK) e posteriormente analisadas ao microscópio óptico e fotodocumentadas.

Imunomarcação e sondas fluorescentes

Células cultivadas em lamínulas e infectadas com amastigotas e promastigotas de *LLa*-RFP eram fixadas com PFA 4% por 15 minutos. As lamínulas eram incubadas com solução de bloqueio e permeabilizadas (PBS, BSA 0,2%, Saponina 0,5%) e incubadas com os anticorpos primários ou sondas fluorescentes indicados. Para visualização dos lisosomos procedemos a marcação da proteína LAMP1 utilizando anticorpos IgG anti-LAMP-1 (1D4B) produzidos em rato (Developmental Studies Hybridoma Bank) diluídos a 1:50 no tampão mencionado acima. Em seguida as células eram marcadas com anticorpo secundário anti IgG de rato conjugado com Alexa 488 (Life Technologies) na concentração de 1:250. Para marcação do citoesqueleto de F-actina da célula hospedeira utilizamos a sonda molecular Faloidina conjugada com Alexa-488 (Life Technologies) na concentração final de 150 nM. Para visualização dos núcleos, as células eram marcadas com DAPI (Life Technologies). Todas as lamínulas preparadas para microscopia de fluorescência eram montadas em lâminas de microscopia utilizando-se o reagente de montagem Prolong-Gold Anti-Fading (Life Technologies).

Microscopia de luz, de fluorescência e confocal

Para visualização das células infectadas e coradas pelo método panótico, foi utilizado o microscópio BX60 (Olympus) ou o Microscópio Axio Imager ApoTome2 (ZEISS) para obtenção de imagens confocais. As imagens foram tratadas utilizando-se os softwares Image-J e Zen (Zeiss).

Quantificação da infecção por citometria de fluxo (FACS) e por contagem manual.

Após os experimentos de infecção, as células eram lavadas 3X com PBS e tratadas com 0,25% de tripsina (GIBCO) para desaderir as células e separá-las de eventuais parasitos não internalizados. Na sequência, as células foram analisadas por citometria de fluxo utilizando o aparelho FACS SCAN (Becton Dickinson). Todas as aquisições foram feitas coletando-se 10.000 células e as análises foram realizadas utilizando o software Flow-Jo. A estratégia de *gating* utilizada nas análises encontra-se sumarizada na figura suplementar 1. Para se estimar a carga parasitária comparativamente e entre tratamentos distintos utilizamos o parâmetro de intensidade média de fluorescência presente nas populações celulares. Em alguns experimentos a porcentagem de células infectadas e o número de parasitos por célula foi determinado por contagem manual ao microscópio óptico.

5. RESULTADOS

5.1. Obtenção de amastigotas axênicas de *L. amazonensis* e testes de viabilidade

Para obtenção de amastigotas axênicas de *L. amazonensis*, WT ou RFP foi empregado o método descrito por Sarkar *et al.* (2018), que consiste em transformar promastigotas em amastigotas axênicas pela inoculação dos parasitos em meio de cultura próprio e seu cultivo na temperatura de 34° C e no pH de 4.5, de modo a mimetizar as condições do vacúolo parasitóforo das células hospedeiras de vertebrados. Ao final do terceiro dia de cultivo do inóculo de promastigotas já podiam ser observadas formas tipicamente amastigotas, arredondadas e sem flagelo aparente. Prosseguia-se o cultivo até o quinto do dia, a partir do qual os parasitos podiam ser repicados e mantidos como amastigotas. Caso inoculadas em meio de cultura apropriado para promastigotas e retornadas às condições típicas do inseto vetor, as formas amastigotas se re-transformavam em promastigotas com características típicas de promastigotas metaciclícas. Imagens dos parasitos antes e após a transformação em amastigotas e após re-transformação em promastigotas podem ser vistas na figura 3 A, B e C.

Para avaliar a viabilidade dos parasitos foram utilizados dois testes distintos, o da eritrosina e do MTT. A técnica da eritrosina se baseia na coloração e contagem de parasitos na presença do corante que marca apenas parasitos mortos. A contagem é feita em câmara de Neubauer calculando-se a porcentagem de parasitos vivos e mortos, gerando-se, assim, a porcentagem de parasitos viáveis (Figura 3 D). Para o teste do MTT, foi utilizado o protocolo descrito por Dutta *et al.*; 2005, modificado para *Leishmania*. O teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina) que consiste na quantificação da atividade e viabilidade dos parasitos pela capacidade de parasitos viáveis de metabolizar o substrato através da ação de enzimas mitocondriais. A leitura da coloração gerada foi feita em espectrofotômetro (leitor de ELISA) (Figura 3 E).

A infecção das formas amastigotas e promastigotas em macrófagos, foi outra forma de atestar a viabilidade e infectividade das formas amastigotas obtidas. Para tanto, células RAW, macrófagos murinos imortalizados, foram cultivados em placa de 6 *wells* contendo lamínulas de microscopia ao fundo e mantidos em estufa de CO₂ a 37° C por 24 horas. Os parasitos eram então incubados com as células por 4 horas, também em estufa de CO₂ e a 37° C. Após o tempo de incubação, as células eram coradas por método panótico, sendo possível a visualização de parasitos internalizados dentro de grandes vacúolos típicos de *L. amazonensis* no interior das células RAW, atestando, assim, sua a viabilidade e infectividade (Figura 4: A, B e C). Tanto as formas promastigotas, quanto as formas

amastigotas e as promastigotas obtidas a partir da re-transformação das amastigotas *in vitro* foram capazes de infectar os macrófagos e estabelecer a vida intracelular em típicos vacúolos parasitóforos. A porcentagem de células infectadas e a carga parasitária foi aferida pela contagem manual e demonstra o alto grau de infectividade de todas as formas evolutivas obtidas, atestando, assim, a viabilidade e infectividade das mesmas (Figura 4 D e E).

FIGURA 3

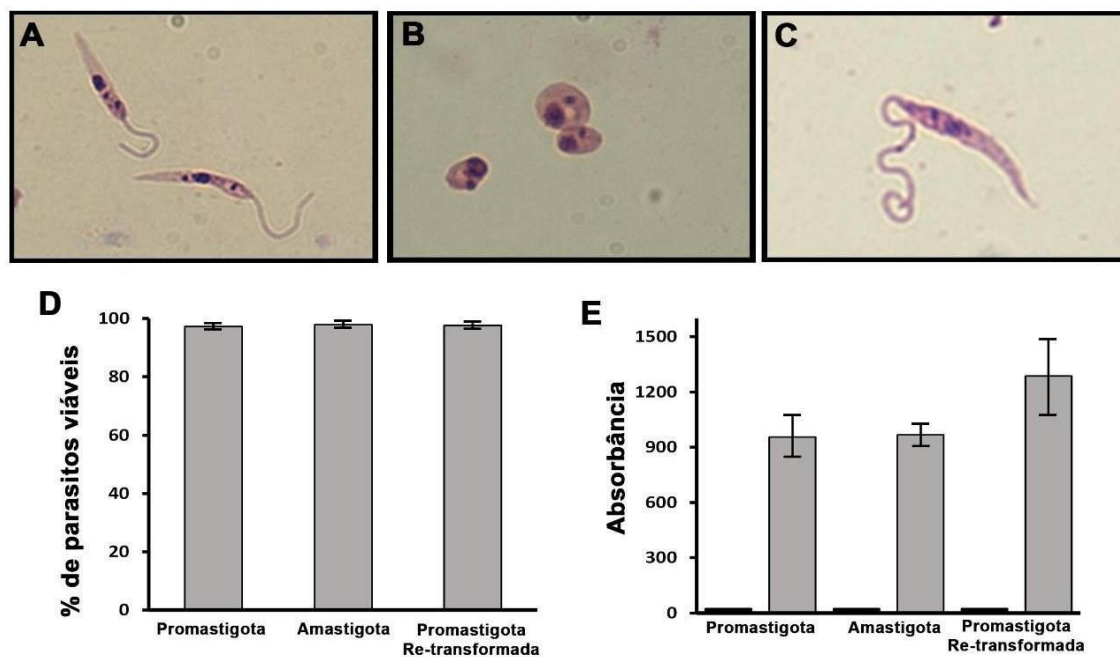


Figura 3: Cultivo de *L. amazonensis*, obtenção das formas amastigotas e testes de viabilidade. A, B e C – Morfologia dos parasitos em suas diferentes formas evolutivas, antes e após transformação *in vitro*. Utilizando o método de coloração GIEMSA e microscopia de óptica foi possível visualizar os parasitos em suas diferentes formas evolutivas, sendo elas: (A) promastigotas axênicas, com flagelo aparente, núcleo e o cinetoplasto. (B) amastigotas axênicas, arredondadas, sem flagelo aparente, evidenciando o núcleo e cinetoplasto. (C) promastigotas axênicas e re-transformadas a partir da cultura de amastigotas mostrada em B. (D) viabilidade de promastigotas, amastigotas e promastigotas re-transformadas, a partir de contagem de parasitos em câmara de Neubauer com eritrosina utilizando microscópio óptico (E) (absorbância - %) viabilidade de promastigotas, amastigotas e promastigotas re-transformadas, pelo método do MTT. Parasitos mortos, fixados com PFA foram utilizados como controle negativo (barras pretas).

FIGURA 4

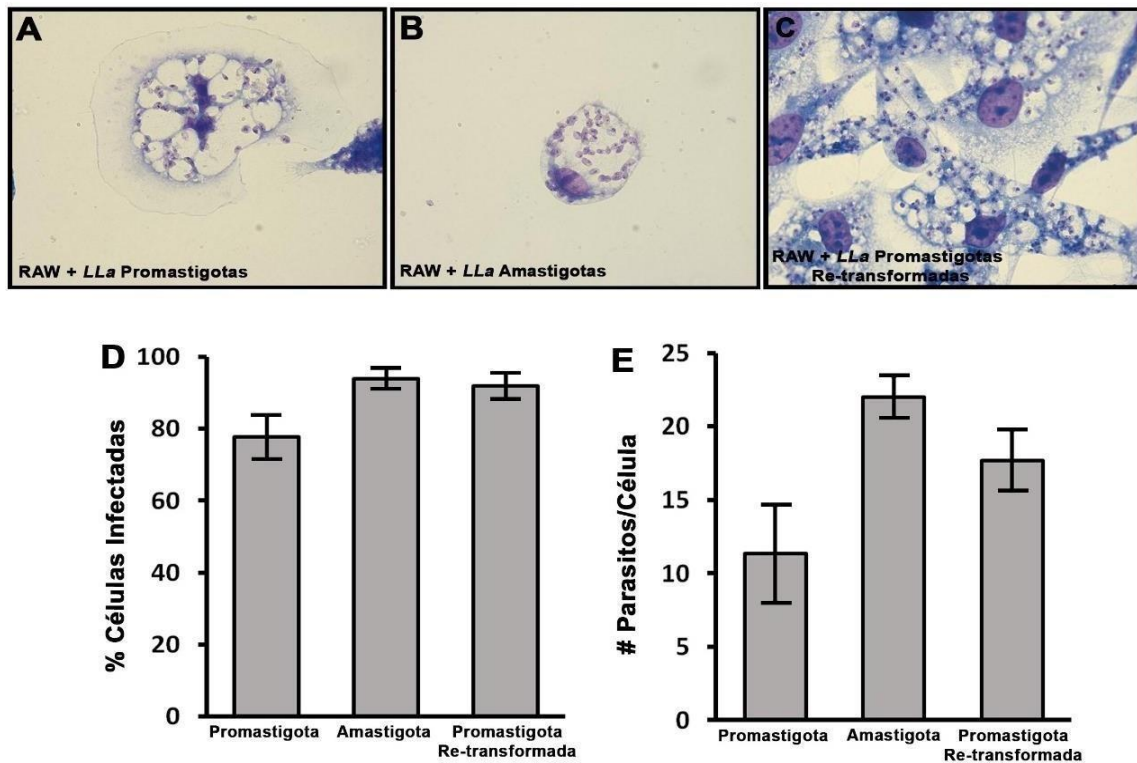


Figura 4: Infecção de macrófagos com formas promastigotas, amastigotas e promastigotas re-transformadas de *L. amazonensis*. Macrófagos foram infectados com promastigotas (A), amastigotas (B) e promastigotas re-transformadas (C) durante 4 horas e mantidas a 37°C. Após 24 horas, as células foram fixadas e coradas pelo método panótico. (D) e (E) Quantificação da infecção e carga parasitária atestando infectividade e viabilidade dos parasitos em todas as formas evolutivas utilizadas.

5.2. Amastigotas de *L. amazonensis* são capazes de invadir células não fagocíticas *in vitro*

Para averiguar se as amastigotas de *L. amazonensis* eram capazes de invadir células não fagocíticas, utilizamos fibroblastos embrionários de camundongo (MEFs) como modelo. Como controle positivo infectamos fibroblastos com as promastigotas de *L. amazonensis*, sabendo-se que essa forma do parasito consegue invadir este tipo celular. Após 4 horas de contato dos parasitos com as células, observamos múltiplos parasitos internalizados em vacúolos parasitóforos, comprovando sua capacidade de invadir os fibroblastos (Figura 5 A), da mesma forma que promastigotas (Figura 5 B).

Para estudar a cinética de invasão de amastigotas e melhor visualizarmos a presença dos parasitos dentro dos fibroblastos na infecção, o mesmo experimento foi realizado e a infecção acompanhada por 4, 24 e 48 horas. Nestes experimentos as células foram marcadas com faloidina A488 para a visualização do citoesqueleto da célula hospedeira e com DAPI para marcar os núcleos (Figura 6). Mais uma vez comprovamos que a amastigota é capaz de invadir os fibroblastos e se estabelecer dentro das células de forma sustentável, já que os parasitos com sua morfologia típica puderam ser visualizados no interior da célula mesmo após 48h de infecção (Figura 6 C). Curiosamente, no tempo de 4h pudemos notar uma rede de actina ao redor de alguns parasitos, sugerindo um possível envolvimento do citoesqueleto no processo de invasão pelas amastigotas (Figura 6 A).

Para caracterização do vacúolo parasitóforo, MEFs foram infectadas por 24h com promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, marcadas com anticorpos anti-LAMP1, para marcar os lisossomos e com DAPI, para marcar os núcleos. Em ambas as infecções, os parasitos foram internalizados, mantendo-se próximos ao núcleo e residindo em vacúolos parasitóforos fusogênicos marcados por LAMP, típicos e necessários para a sobrevivência destes parasitos nas células, sendo essa uma característica do gênero *Leishmania* (Figura 7).

Como trabalhamos com o parasito expressando a proteína vermelha fluorescente (RFP) foi possível quantificarmos as infecções por citometria de fluxo (a estratégia de *gating* utilizada está detalhada na figura suplementar 1). Sendo assim, visando quantificar o processo de invasão celular infectamos MEFs com amastigotas de *L. amazonensis* e analisamos as taxas de infecção por citometria de fluxo nos intervalos indicados ao longo de 4h de interação (Figura 8). Como pode ser observado, os parasitos invadem de forma gradual as células, iniciando já aos 5 minutos com 13% das MEFs infectadas culminando com a grande maioria das células infectadas (74%) após 4 horas de infecção (Figura 8).

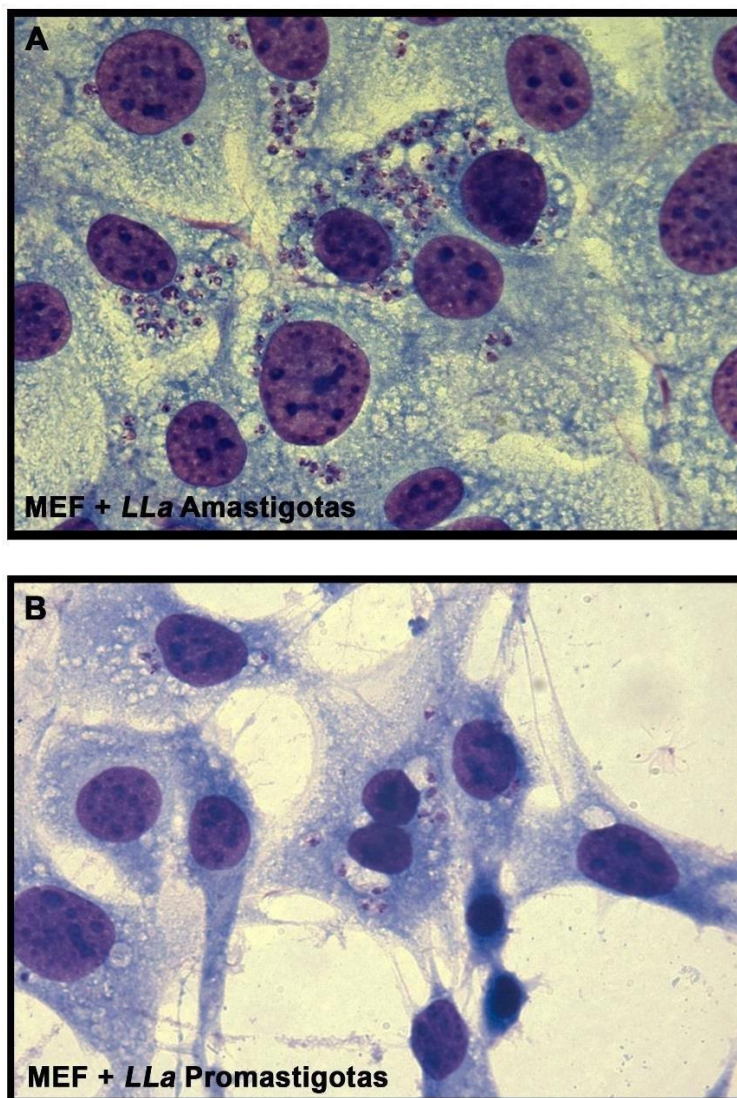
FIGURA 5

Figura 5: Amastigotas de *L. amazonensis* são capazes de invadir células não fagocíticas. Fibroblastos foram infectados com *L. amazonensis* em suas formas amastigotas (A) e promastigotas (B) durante 4 horas a 37°C. Após este tempo as células foram lavadas, fixadas com PFA, coradas pelo método panótico e analisadas ao microscópio óptico. Nas imagens podem ser observados múltiplos parasitos internalizados em vacúolos parasitóforos tanto na infecção com amastigotas (A) quanto com promastigotas (B).

FIGURA 6

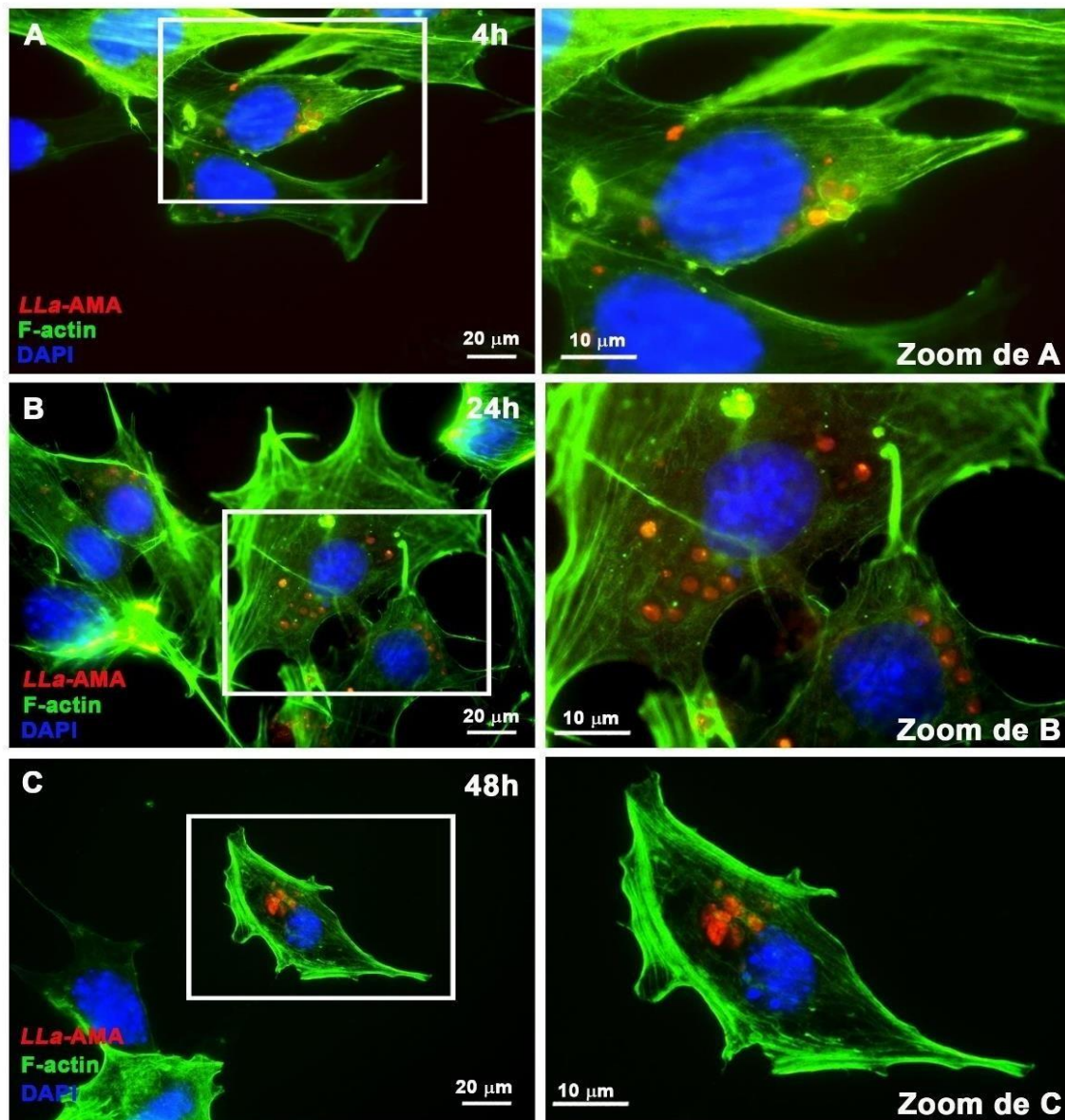


Figura 6: Amastigotas de *L. amazonensis* permanecem viáveis no interior de fibroblastos após invasão da célula hospedeira. Após infecção com amastigotas, as células foram cultivadas por 4h (A), 24h (B) e 48h (C) a 37°C. Uma vez fixadas com PFA, as células foram preparadas para microscopia de fluorescência e marcadas com faloidina-A488 para se visualizar o citoesqueleto de F-actina e com DAPI para evidenciar os núcleos. Os parasitos expressando RFP são visualizados em vermelho. No tempo de 4h observamos uma rede de actina em volta de alguns parasitos, sugerindo um possível envolvimento do citoesqueleto no processo de invasão pelas amastigotas.

FIGURA 7

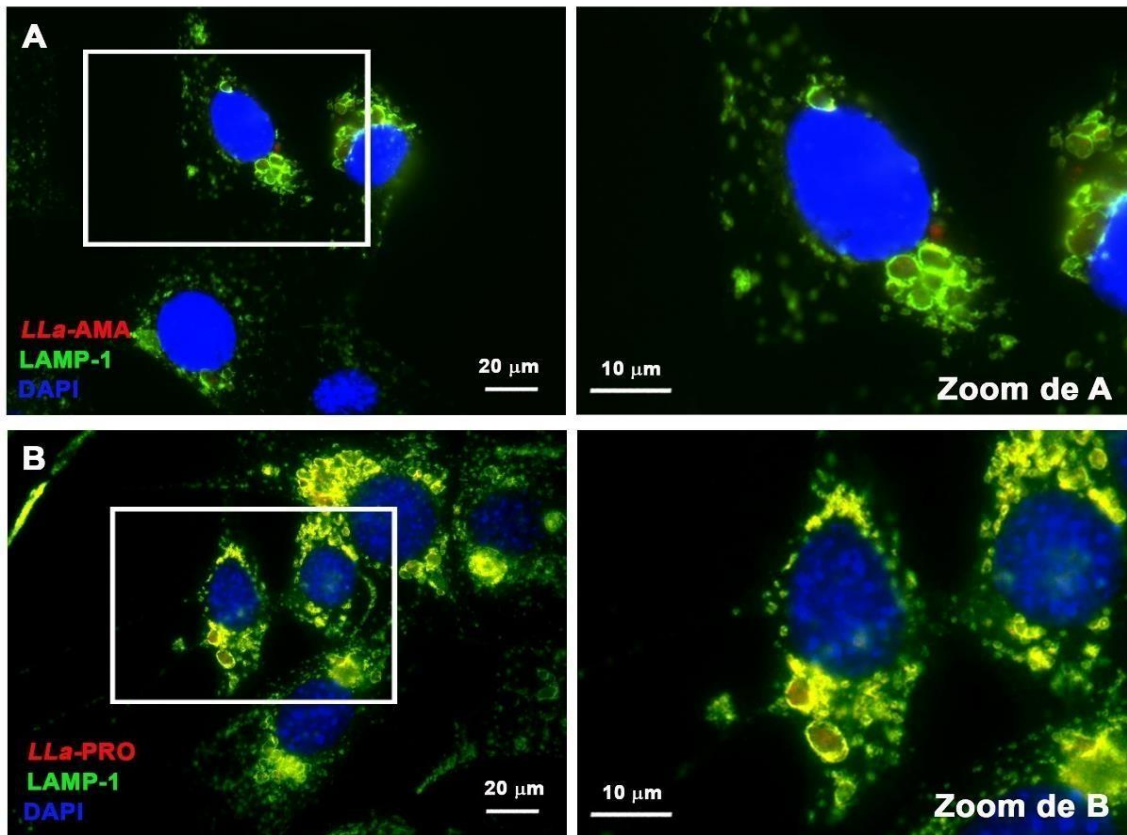


Figura 7: Vacúolos parasitóforos fusogênicos são detectados em fibroblastos quando os mesmos são infectados por formas amastigotas de *L. amazonensis*. Após 24h de infecção de fibroblastos por formas amastigotas (A) e promastigotas (B) expressando RFP (*LLa-AMA* e *LLa-Pro* - vermelho) as células foram fixadas e marcadas por imunofluorescência utilizando-se anticorpos anti-LAMP1 (lisossomos - verde) e DAPI (núcleos - azul). Tanto para promastigotas quanto para amastigotas as imagens mostram os parasitos internalizados nas células, próximos ao núcleo (azul) e residindo em vacúolos fusogênicos como o esperado para as formas intracelulares de *Leishmania* spp.

FIGURA 8

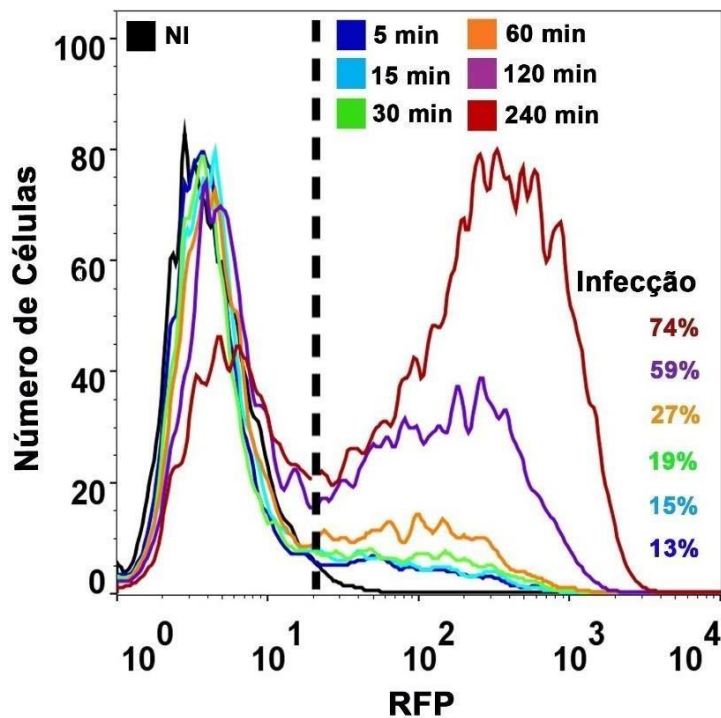


Figura 8: Quantificação da infecção de fibroblastos por amastigotas de *L. amazonensis* em diferentes tempos de incubação. Fibroblastos foram incubados com amastigotas por 5 minutos (azul escuro), 15 minutos (azul claro), 30 minutos (verde), 60 minutos (laranja), 120 minutos (roxo) ou 240 minutos (vermelho). Posteriormente, as células foram coletadas e a infecção foi quantificada por citometria de fluxo. Células não infectadas (NI/preto) foram usadas como controle negativo. Após definição do *gate* indicado, as taxas de infecção foram obtidas e encontram-se expressas no gráfico em porcentagem de células infectadas.

5.3. A invasão celular de *L. amazonensis* depende da viabilidade dos parasitos

Para verificar se a invasão celular dependia da viabilidade dos parasitos, os MEFs foram incubados a 37°C por 4 horas com amastigotas ou promastigotas de *L. amazonensis* viáveis ou fixados com PFA. Posteriormente foi feita a quantificação da infecção por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que, ao contrário dos parasitos vivos, que têm alta taxa de infecção em fibroblastos (Figs. 8 e 9), tanto amastigotas quanto promastigotas fixadas não foram internalizadas pelas células (Figura 9). Outro fato a se notar é que a infecção de amastigotas se mostrou maior em comparação à de promastigotas, algo que observamos na maioria dos nossos experimentos utilizando promastigotas como controle. Este resultado indica que o parasito precisa estar viável para induzir seu processo de invasão.

Realizamos ainda o mesmo experimento e marcamos as células com faloidina A488 e DAPI, para marcar os filamentos de F-actina e os núcleos, tendo sido possível visualizar o mesmo resultado, demonstrando que a internalização dos parasitos ocorre apenas quando amastigotas ou promastigotas vivas são inoculadas (Figura 10 A e C) ao passo que as células expostas aos parasitos fixados com PFA não apresentam nenhum sinal de internalização dos parasitos (Figura 10 B e D). Os resultados demonstram de forma patente que somente parasitos vivos são internalizados pelos fibroblastos, os quais permanecem próximos ao núcleo das células, fundem com lisosomos numa clara indicação de que trafegam pela via endossomal. Nestes experimentos avaliamos ainda, por citometria de fluxo, a intensidade média de fluorescência das células após as 4h de infecção e verificamos que, em MEFs, as amastigotas, de fato, parecem possuir uma capacidade invasiva maior do que as formas promastigotas (Figura 10). Assim, os resultados de citometria de fluxo, indicam que na infecção por amastigotas, não apenas uma maior porcentagem de células é infectada (Figura 9) como também um maior número de parasitos é encontrado dentro das células (Figura 10 A). Todavia, experimentos de *time-course* focados em não somente responder, mas caracterizar este fenômeno ainda precisam ser realizados.

FIGURA 9

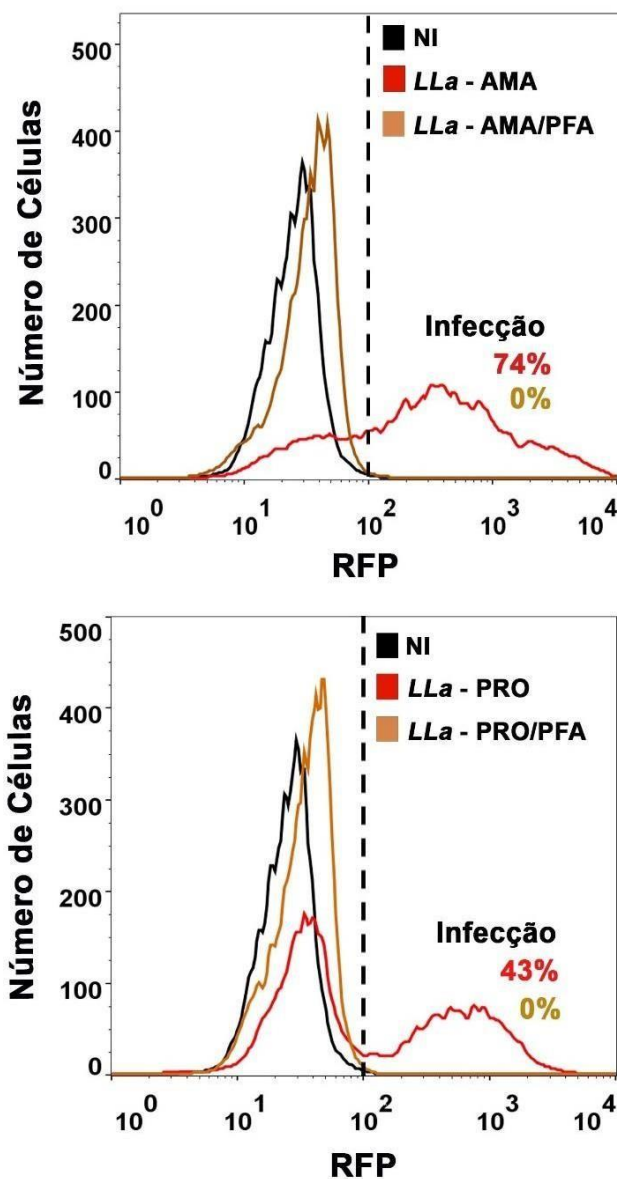


Figura 9: Internalização de amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis* em fibroblastos depende da viabilidade dos parasitos. Fibroblastos foram incubados por 4 horas com amastigotas e promastigotas expressando RFP vivas (vermelho) ou fixadas com PFA (marrom). Em seguida as células foram lavadas, removidas do vasilhame e a infecção foi quantificada por FACS. Células não infectadas (NI/preto) foram usadas como controle negativo. Após definição do *gate* indicado, as taxas de infecção foram obtidas e encontram-se expressas no gráfico em porcentagem de células infectadas.

FIGURA 10

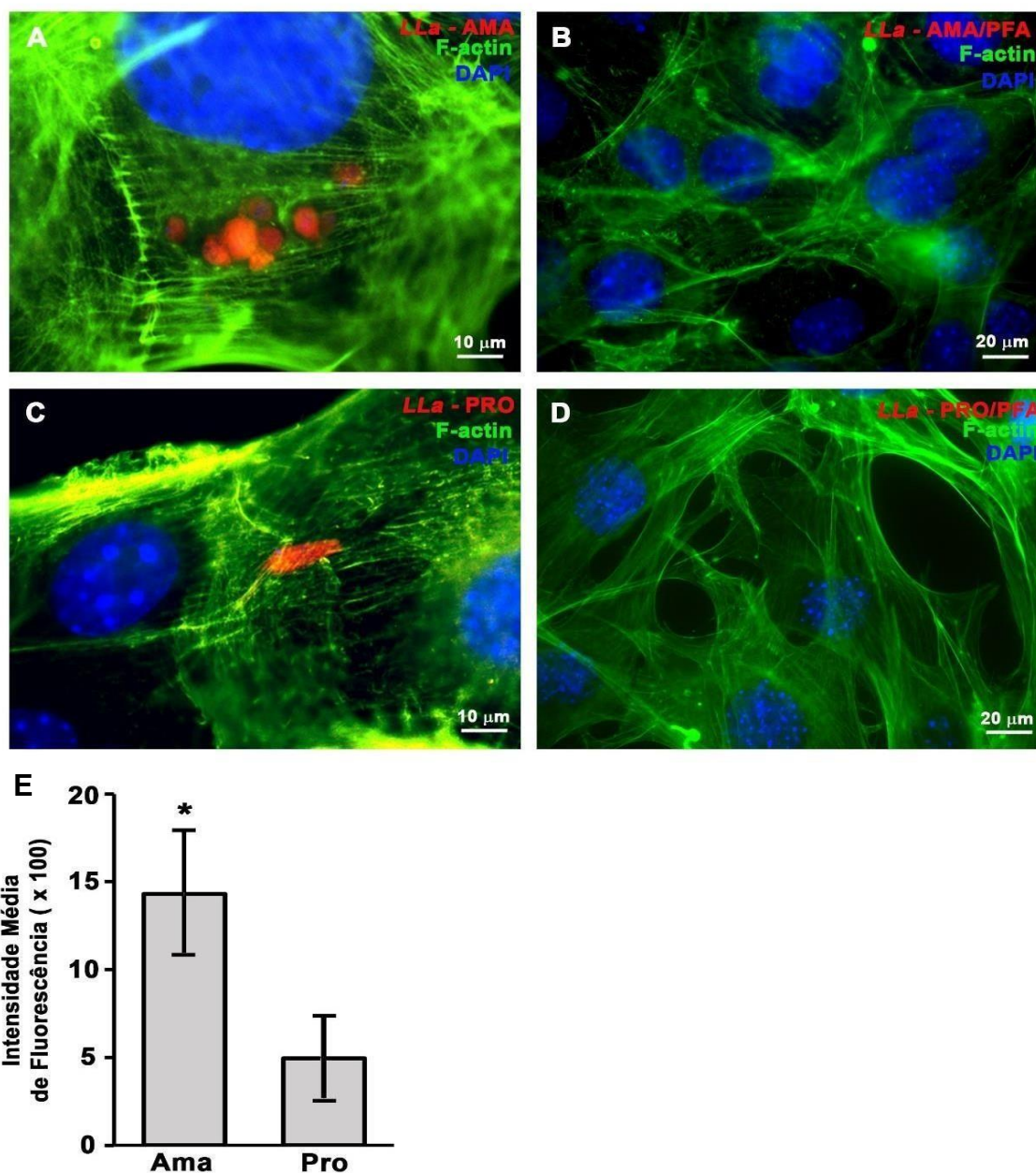


Figura 10: Internalização de amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis* depende da viabilidade dos parasitos e amastigotas são mais infectantes para fibroblastos. Após 4 horas de infecção de fibroblastos por amastigotas (A), amastigotas fixadas com PFA (B), promastigotas (C) e promastigotas fixadas com PFA (D) expressando RFP (vermelho), as células foram fixadas e marcadas por faloidina A488, marcando os filamentos de actina (verde) e o núcleo com DAPI (azul). As imagens demonstram que os parasitos vivos (A) e (C), são internalizados nas células, residindo próximos aos núcleos (azul), enquanto os parasitos fixados com PFA (B) e (D) não foram visualizados no interior das células (corroborando os dados apresentados na figura 7). Pela análise da intensidade média de fluorescência das populações infectadas foi possível avaliar diferencialmente as taxas de infecção das duas formas evolutivas em MEFs (E). Para as análises estatísticas foi utilizado o Teste t de Student (* = p -value ≤ 0.05).

5.4.A invasão celular de amastigotas de *L. amazonensis* é dependente de filamentos de actina

Já nos nossos primeiros experimentos de infecção de fibroblastos por amastigotas, visualizamos algo que parecia ser uma rede de actina se formando ao redor de alguns parasitos após 4 horas de infecção, sugerindo um possível envolvimento do citoesqueleto no processo de invasão (Figura 6 A), algo que nunca havíamos observado em experimentos anteriores utilizando as formas promastigotas. Executamos, então, um experimento semelhante e realizamos análises de microscopia confocal em tempos iniciais da interação amastigotas-MEFs de modo a verificar com mais acuidade se isto, de fato, ocorria. Analisamos inicialmente o tempo de 1 hora de infecção, dado que nesta janela, como visto no nosso experimento da cinética da infecção (Figura 8), parasitos poderiam ser flagrados invadindo a célula em uma fase mais inicial da invasão. Reconstruções 3D da célula marcada com faloidina A488 sendo infectada por amastigotas expressando RFP demonstraram que alguns parasitos são internalizados nitidamente envoltos por filamentos de actina em etapas iniciais da invasão celular (Figura 11 A). Imagens ampliadas de 3 planos focais únicos mostraram com maior precisão o parasito envolto por uma intensa rede de F-actina que se localiza exclusivamente ao redor dos parasitos. Isto, no entanto, não é visualizado em todas as amastigotas (Figura 11 A e B) sugerindo que aquelas que estão em processo de internalização é que encontram-se co-localizadas com F-actina da célula hospedeira. Já para a promastigotas, os parasitos nunca aparecem envoltos em redes de F-actina durante a invasão (Figura 11 C), como já havia sido demonstrado anteriormente (Cavalcante-Costa *et al.* 2019). Este resultado sugere a existência de vias de invasão celular distintas para as formas evolutivas de *Leishmania* em células não fagocíticas.

Os dados até então obtidos sugeriram fortemente um papel para o citoesqueleto de F-actina da célula hospedeira no processo de invasão celular das amastigotas em MEFs. Para confirmar esta hipótese, pré-tratamos os MEFs com a droga citocalasina-D, que inibe a polimerização dos filamentos de actina, e efetuamos o experimento de infecção com posterior quantificação da infecção por FACS. Como controle, utilizamos células não infectadas e ou infectadas com as formas promastigotas do parasito. O resultado demonstra que o desmantelamento do citoesqueleto inibe, com a dose utilizada, em mais de 70% a invasão das formas amastigotas em fibroblastos (Figura 12). Em clara oposição, a invasão das formas promastigotas se torna substancialmente facilitada, culminando com uma taxa de infecção de mais de 3 vezes maior (Figura 12).

FIGURA 11

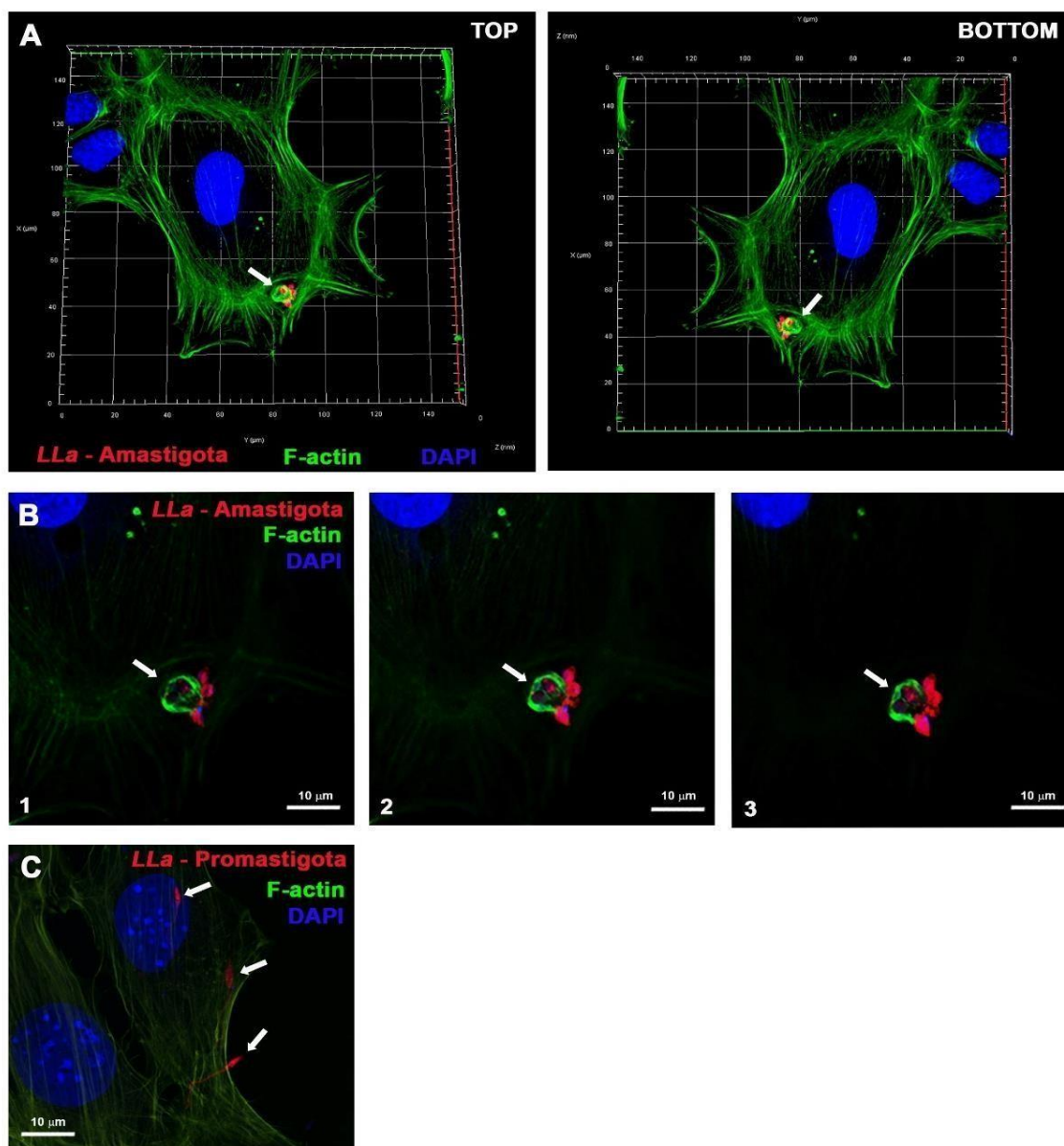


Figura 11: Amastigotas *L. amazonensis* são envolvidas em filamentos de actina no momentos iniciais da invasão celular em fibroblastos. Fibroblastos foram incubados com amastigotas de *L. amazonensis* expressando RFP (vermelho) por 60 minutos, posteriormente foram fixados e as células marcadas com faloidina-A488 para se visualizar o citoesqueleto de F-actina (verde) e com DAPI para marcar os núcleos (azul). Por microscopia confocal, foi possível observar parasitos em processo de internalização apresentando uma intensa marcação por faloidina ao redor das amastigotas (A e B - zoom do A). Em C vemos que na infecção por promastigotas, durante o processo de invasão, não há visualização de filamentos de actina ao redor dos parasitos.

FIGURA 12

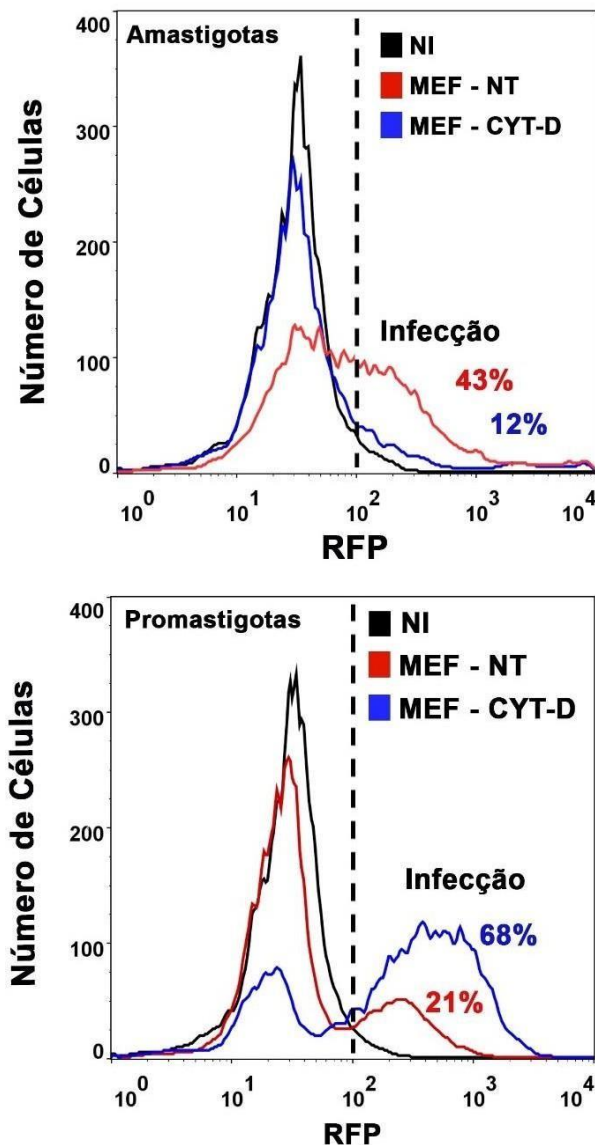


Figura 12: A invasão de fibroblastos por amastigotas de *L. amazonensis* é dependente de filamentos de actina. Fibroblastos foram pré-tratados com citocalasina-D (azul), uma droga que impede a polimerização dos filamentos de actina do citoesqueleto, e em seguida infectadas com amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis* expressando RFP. Fibroblastos não tratados com citocalasina-D e infectados com os parasitos indicados (vermelho) e células não infectadas (preto) foram utilizadas como controle. O resultado mostra que o dismantelamento do citoesqueleto dificulta marcadamente a invasão das amastigotas ao passo que a entrada da promastigota é fortemente facilitada.

Estes dados corroboram com os resultados previamente publicados pelo nosso grupo, com os quais demonstramos que as formas promastigotas invadem MEFs de forma independente do citoesqueleto e dependente do recrutamento de lisossomos para a periferia celular (Cavalcante-Costa *et al.* 2019).

De modo a visualizar o que foi obtido e quantificado pelo FACS procedemos os mesmos experimentos, efetuamos diferentes marcações com sondas fluorescentes e analisamos células e parasitos por microscopia de fluorescência. Para células marcadas com a faloidina e pré-tratadas com citocalasina-D (Figura 13), observamos que o tratamento com citocalasina-D de fato impede a invasão pelas amastigotas que ficam retidas no meio extracelular, sendo incapazes de efetuar a invasão (Figura 13 B). Já nas células não tratadas, podemos visualizar os parasitos internalizados e próximos ao núcleo, tal como observado nos experimentos anteriores (Figura 13 A).

Quando o mesmo experimento era feito, mas a marcação foi feita utilizando-se anticorpos anti LAMP (Fig. 14), pudemos visualizar claramente o efeito dramático, mas oposto, que a droga tem no que tange à invasão das formas promastigotas (Fig. 14 B), culminando com células multi-infectadas com múltiplos parasitos em seu interior completamente envoltos pelo marcador lisossomal característico da organela primariamente envolvida na internalização destas formas evolutivas. Igualmente, com esta marcação foi possível verificar claramente que a presença da droga, de fato, age de forma oposta quando se trata das amastigotas, posto que elas ficam claramente retidas no meio extracelular (Fig. 14 A). A quantificação da carga parasitária foi estimada utilizando-se as intensidades médias de fluorescência das populações celulares obtidas pelo FACS e os resultados e as análises estatísticas encontram-se expressos na figura 14 C.

Tomados em conjunto, bem como à luz de trabalhos anteriormente publicados pelo nosso grupo com as formas promastigotas, propomos um modelo de invasão para ambas as formas evolutivas do parasito (Figura 15). Nesse modelo, as formas promastigotas invadem células não fagocíticas por meio do recrutamento de lisossomos para o sítio de infecção ao passo que as amastigotas necessitam da polimerização do citoesqueleto de F-actina no sítio de contato com célula hospedeira para efetuarem a invasão. Ambas as formas evolutivas, independente da forma de penetração celular inicialmente empregada pelas mesmas, trafegam na via endossômica de suas células hospedeiras, terminando por habitar típicos vacúolos parasitóforos que fundem com lisossomos e se localizam nas cercanias do núcleo.

FIGURA 13

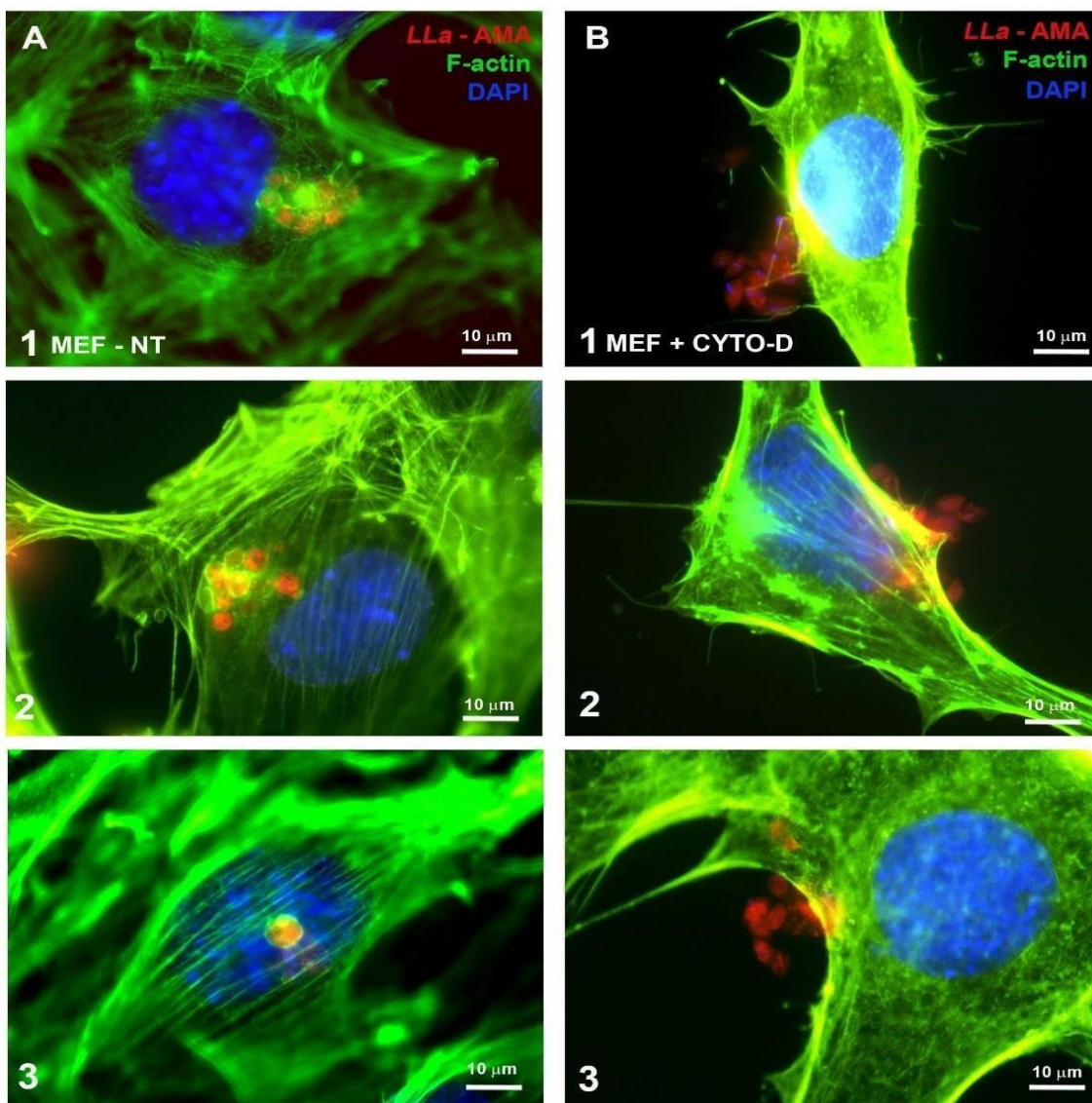


Figura 13: A invasão de fibroblastos por amastigotas de *L. amazonensis* é dependente do citoesqueleto de actina da célula hospedeira. (A) Fibroblastos infectados por amastigotas (vermelho) e (B) fibroblastos pré-tratados com citocalasina-D e infectados por amastigotas. As células foram fixadas e marcadas com faloidina A488 (verde) marcando o citoesqueleto de f-actina e DAPI (azul) marcando os núcleos. Em células não tratadas com a droga (A) os parasitos são vistos internalizados e envolvidos por filamentos de f-actina, ao passo que nas células tratadas com a citocalasina-D (B) os parasitos não conseguem proceder a invasão celular e ficam claramente bloqueados no meio extracelular, presos à face externa da membrana plasmática das células. O experimento foi feito em triplicata e os resultados mostram três campos representativos para cada tratamento.

FIGURA 14

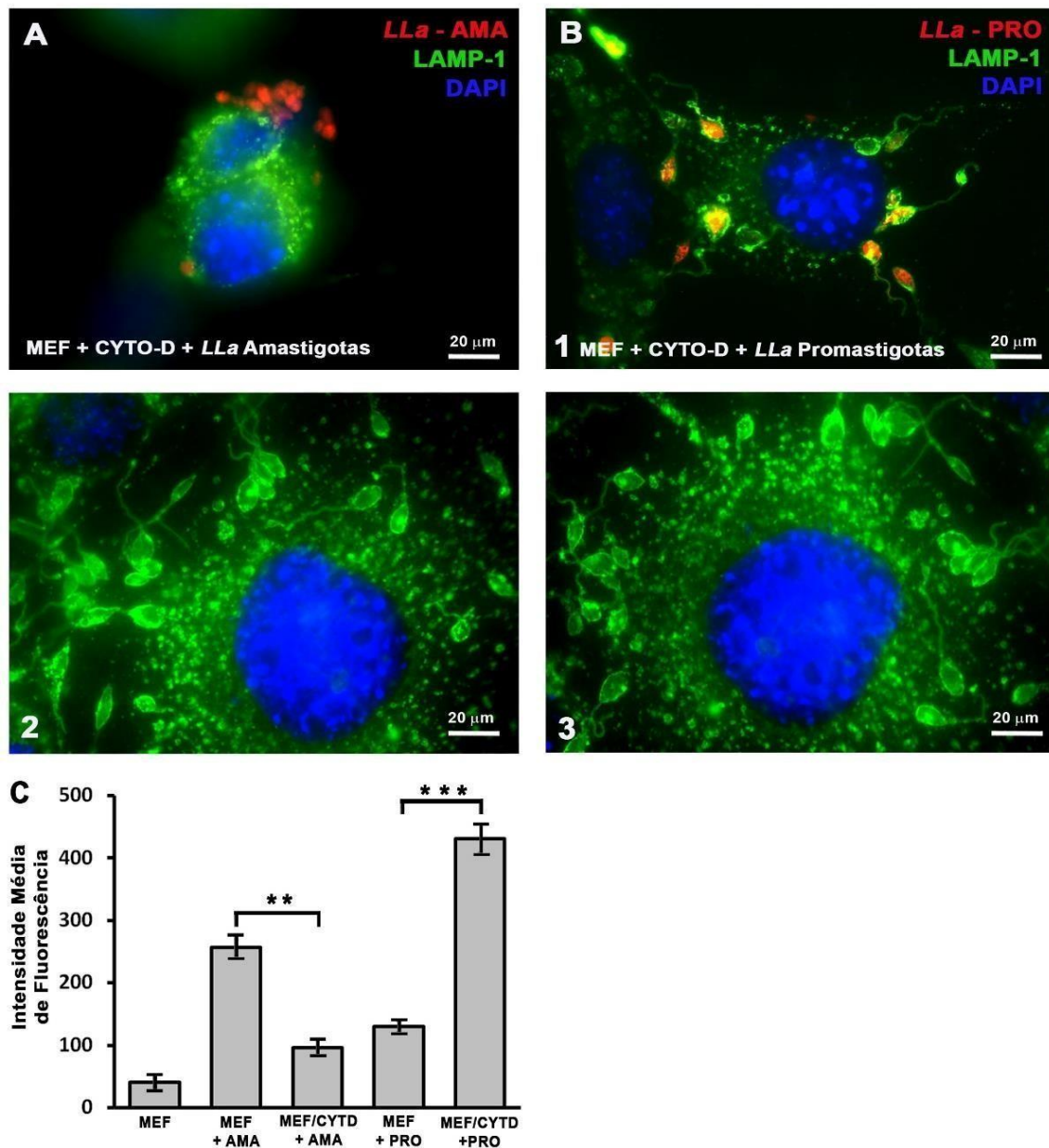


Figura 14: Comparação da invasão celular de amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis* em fibroblastos pré-tratados com citocalasina-D. Após infecção, as células foram fixadas e marcadas com anticorpos anti-LAMP1 (verde) marcando lisossomos e DAPI (azul) marcando o núcleo. **(A)** Fibroblastos pré-tratadas com citocalasina-D e infectadas por amastigotas (vermelho) e **(B)** MEFs pré-tratadas com citocalasina-D e infectadas por promastigotas (vermelho). Para a infecção de amastigotas **(A)**, é visto que os parasitos ficam retidos do lado de fora da célula, enquanto para as promastigotas **(B)** o efeito é oposto e um grande número de parasitos é internalizado e são visualizados envolvidos por LAMP. **(C)** Quantificação da carga parasitária de três experimentos independentes utilizando-se o parâmetro de intensidade média de fluorescência obtidos por FACS. Para as análises estatísticas foi utilizado o Teste t de Student (** = p -value ≤ 0.01 e *** p -value ≤ 0.001).

FIGURA 15

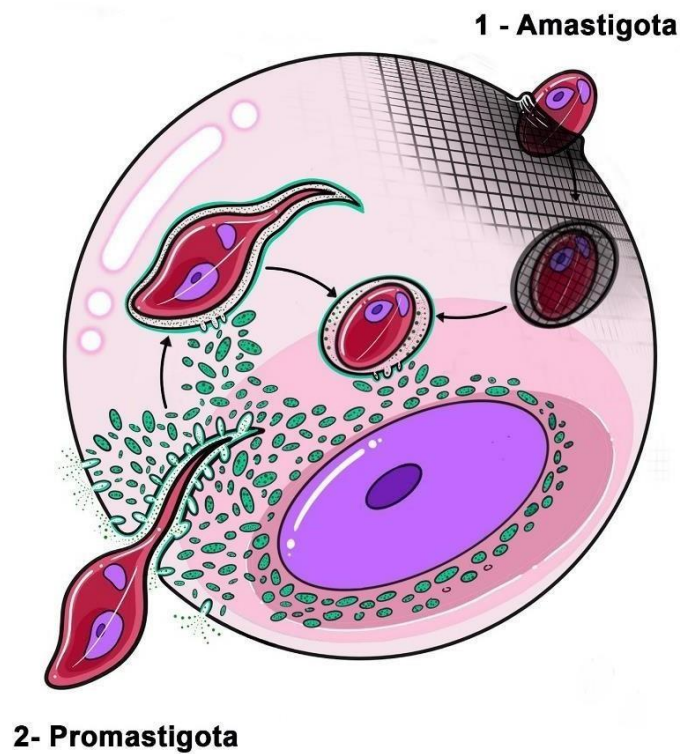


Figura 15: Modelo proposto para a invasão de células não fagocíticas por formas amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis*. **1:** Amastigotas invadem células não fagocíticas de maneira dependente do citoesqueleto de actina formando vacúolos que posteriormente se fundem com lisossomos. **2:** Promastigotas invadem células não fagocíticas de forma independente do citoesqueleto de actina e por um mecanismo que envolve o recrutamento de lisossomos para o sítio de infecção em momentos iniciais da infecção (Cavalcante-Costa *et al.*, 2019). Após a invasão celular, ambas as formas evolutivas trafegam na via endossômica da célula hospedeira e seus vacúolos, que continuam a se fundir com lisossomos, terminam por assumir a típica localização perinuclear.

6. DISCUSSÃO

Vários autores já descreveram tipos celulares não fagocíticos hospedando amastigotas de *Leishmania* spp. (BOGDAN *et al.*, 2000a; CAVALCANTE-COSTA *et al.*, 2019; CHANG, 1978; DEDET *et al.*, 2016; LEWIS, 1974, 2016). Até recentemente nada se sabia sobre o mecanismo de invasão destes tipos celulares pelas formas infectantes de *Leishmania* spp. Em um trabalho anterior de nosso grupo demonstramos que as formas promastigotas do parasito conseguem invadir células não fagocíticas utilizando um mecanismo fisiológico próprio das células hospedeiras chamado de reparo de membrana plasmática. Este mecanismo, que envolve o recrutamento e exocitose de lisossomos da célula hospedeira, por também estar presente no *Trypanosoma cruzi*, parece ser uma via conservada de invasão celular em tripanossomatídeos intracelulares. Pouco se sabe sobre o papel de outros tipos celulares que não os macrófagos na biologia de *Leishmania* spp. e no curso das Leishmanioses, muito menos ainda sobre o papel das células não fagocíticas já descritas como infectadas. Células não fagocíticas podem ser potencialmente importantes no contexto da doença dado que podem servir como nichos de resistência a drogas e de latência da infecção, posto que, não sendo células imunes, têm potencial microbicida reduzido, necessitando uma orquestração mais ampla do sistema imune para eliminação da célula infectada e, conseqüentemente, do patógeno em seu interior. Estudar etapas iniciais de infecção por patógenos intracelulares e os primeiros passos da interação parasito-hospedeiro pode fornecer informações preciosas sobre o mecanismo de invasão que antecede a amplificação da infecção e sem o qual o parasitismo não se estabelece, o que se aplica notadamente ao processo de invasão celular pelas formas promastigotas. No entanto, e dado que a amplificação da infecção nas leishmanioses se dá pela invasão de novas células por formas amastigotas do parasito, acreditamos ser de grande importância estudar também a interação destas formas com células não fagocíticas, algo totalmente negligenciado até o presente momento. Sendo assim, neste trabalho buscamos estudar a interação e a capacidade invasiva de formas amastigotas de *L. amazonensis*, na tentativa de desvendar o mecanismo envolvido na invasão celular, comparando-o com o das formas promastigotas.

Para concretizar esse trabalho, tivemos que obter e cultivar as formas amastigotas de *L. amazonensis* em nosso laboratório a partir de culturas de promastigotas (como escrito por Sarkar *et al.* 2018 e cujo protocolo encontra-se em anexo), induzindo condições que se assemelham ao ambiente intracelular gerando, assim, amastigotas axênicas que

apresentam forma arredondada e flagelo encurtado, mostrado na figura 3 B. Dispondo das promastigotas e amastigotas axênicas, testamos a viabilidade celular dos parasitos utilizando dois métodos distintos: o teste da eosina como corante vital e o teste do MTT adaptado para *Leishmania* de Dutta *et al.*; 2005. Como demonstrado na figura 3 D e 3 E, comprovamos por ambos os métodos que ambas as formas cultivadas apresentaram alto grau de viabilidade celular. Como contraprova realizamos ensaios de infecção destes parasitos em macrófagos (células RAW) e cujos resultados descritos na figura 4 mostram múltiplos parasitos internalizados dentro de enormes vacúolos parasitóforos (Fig. 4 A, B e C) característicos da espécie *L. amazonensis*, mostrando altas taxas de infecção celular (Fig. 4 D e E). Desta forma, comprovamos tanto a viabilidade quanto a infectividade dos parasitos antes de prosseguir com os experimentos utilizando as células não fagocíticas que foram o foco principal deste trabalho. Para estudar a interação das amastigotas com células não fagocíticas nós utilizamos como modelo células MEF, fibroblastos murinos de camundongo, como descrito no nosso laboratório e já estudado por Cavalcante-Costa *et al.* (2019) para a infecção por promastigotas. Nesse trabalho de 2019 foi verificado que promastigotas de *L. amazonensis* invadem os fibroblastos se ligando à célula, na grande maioria dos eventos, pelos flagelos, num processo que envolve recrutamento e exocitose dos lisossomos das células hospedeiras. Sendo assim, buscamos repetir os resultados com as promastigotas como controle e mostrar diferenças ou semelhanças no processo de invasão das amastigotas em células não fagocíticas. Uma vez que nós já havíamos descrito a invasão celular pelas formas promastigotas utilizando MEFs, procedemos então a avaliação da capacidade infectiva das formas amastigotas neste tipo celular. Verificamos, assim, que as amastigotas produzidas *in vitro* eram capazes de, como as promastigotas, invadir células não fagocíticas (Fig. 5 e 6). Assim como já bem descrito por outros grupos (ANTOINE *et al.*, 1998)(MOREHEAD; COPPENS; ANDREWS, 2002)(MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004)(YOUNG; KIMA, 2019) as amastigotas axênicas residiam em vacúolos parasitóforos característicos de *Leishmania* spp. (Fig. 7) que se fundem com lisossomos na via endossômica. Sabe-se que a morfologia do vacúolo parasitóforo de *L. amazonensis* difere do de outras espécies de *Leishmania*, como *L. major* e *L. donavani* (WILSON *et al.*, 2008). Enquanto amastigotas de *L. amazonensis* e *L. mexicana* se replicam em múltiplos dentro de enormes vacúolos que se fundem com os lisossomos, as amastigotas de *L. major* e *L. donavani* se replicam em pequenos compartimentos contendo somente um parasito (ANTOINE *et al.*, 1998)(MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004)(OKUDA *et al.*, 2016). Wilson e

colaboradores (2008) demonstraram que grandes vacúolos são essenciais para a replicação das amastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos (NDJAMEN *et al.*, 2010) (CANTON *et al.*, 2012). Curiosamente, nossos resultados mostram que a entrada de amastigotas nos fibroblastos leva à formação vacúolos parasitóforos pequenos e únicos (Fig. 7 B), assemelhando aos encontrados para parasitos do subgênero *Viannia* em células fagocíticas e diferente do que vemos nos nossos experimentos quando as células infectadas são os macrófagos (Fig. 4 B). Este comportamento apresentado pelas amastigotas após invadirem os fibroblastos foi o mesmo que observamos quando as infecções ocorreram com promastigotas (CAVALCANTE-COSTA *et al.* 2019). Mesmo vivendo nestes vacúolos atípicos o parasito consegue se estabelecer e proliferar nos fibroblastos, o que pode sugerir que o tamanho dos vacúolos nos macrófagos decorra da natureza imune destas células e que diferentes necessidades na interface parasito-célula hospedeira podem levar a morfologias distintas dos vacúolos parasitóforos.

Dado que os parasitos utilizados neste trabalho são fluorescentes (contendo e expressando o gene da RFP), a invasão das amastigotas foi quantificada em tempos diversos (Fig. 8) utilizando-se a técnica de citometria de fluxo. Já nas duas primeiras horas de interação parasito-célula hospedeira verificamos consideráveis índices de infecção. Assim como já visto para as formas promastigotas, e aqui repetido, a invasão celular depende da viabilidade dos parasitos, dado que parasitos fixados por PFA não foram encontrados no interior das células (Fig. 9 e 10). Obtivemos ainda indícios fortes de que, no modelo estudado, as formas amastigotas do parasito parecem possuir um maior grau de infectividade do que as formas promastigotas (Fig. 10 E), o que estudaremos posteriormente em maior detalhe. A marcação do citoesqueleto de F-actina das células hospedeiras (Fig 6 A), além de ter possibilitado uma visualização inequívoca dos parasitos internalizados, mostrou que, em fases iniciais de infecção (em torno de 4 horas de interação) vários parasitos podiam ser visualizados com o que parecia ser uma rede de actina ao redor das amastigotas recém internalizadas. Sabe-se que o recrutamento do citoesqueleto de F-actina é um mecanismo conhecido de invasão por alguns parasitos. Além de ser o grande ator em processos fagocíticos, o citoesqueleto de F-actina também pode ser manipulado por patógenos intracelulares para invadir células não fagocíticas, como células epiteliais. Por exemplo, Mortara e colaboradores (1998 e 2008) analisou a invasão de tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* em células HeLa e observou que as amastigotas extracelulares se agregam a microvilosidades da superfície da célula

hospedeira levando à formação de uma espécie de “copo” sob o parasito, o que culmina com a invasão celular que ocorre após 15-30 minutos de interação. Em contraste, a infecção por tripomastigotas parece ser dependente da mobilidade dos parasitos e envolve a indução da formação de uma protusão rica em actina em torno do parasito, mas que não é, no entanto, inibida quando se inibiu a polimerização da actina com a citocalasina-D. Outros resultados mostraram que amastigotas de *T. cruzi* são potentes indutores de fagocitose, processo que poderia facilitar a persistência de parasitos no hospedeiro (FERNANDES *et al.*, 2013). Tendo em mãos os resultados obtidos na figura 8, logo sabendo que as células eram infectadas já na primeira hora de interação, decidimos avaliar o processo de invasão pelas amastigotas em etapas iniciais da interação atentando para o citoesqueleto. Nossos resultados de microscopia confocal mostraram uma intensa marcação de F-actina ao redor de amastigotas em processo de internalização (Fig. 11). Para confirmar o papel do citoesqueleto na invasão pelas formas amastigotas em MEF utilizamos a droga citocalasina-D, que impede a polimerização dos filamentos de F-actina da célula hospedeira, levando ao dismantelamento do citoesqueleto e à impossibilidade de sua reorganização, e verificamos que a droga impede a invasão celular das amastigotas nos fibroblastos (Fig. 12). Ao analisar as células tratadas ou não com citocalasina D e incubadas com as formas amastigotas verificamos que no caso das células tratadas com a droga os parasitos ficam, de fato, presos no meio extracelular (Fig. 13 e Fig. 14 A). Algo bastante curioso é que para o caso das formas promastigotas o efeito observado é o oposto, dado que células pré-tratadas com a citocalasina D não só são infectadas pelos parasitos como apresentam taxas de infecções de até quatro vezes maiores quando comparadas com as não tratadas (Fig. 14) e uma quantidade muito maior de parasitos/célula (Fig. 14 B, C e D). Deste modo, nossos resultados sugerem fortemente que quando se trata de células não fagocíticas, ambas as formas evolutivas do parasito conseguem realizar a invasão celular, mas que esta ocorre por vias distintas a depender da forma evolutiva envolvida. Uma vez que, em trabalho anteriores, nós demonstramos que as formas promastigotas invadem as células hospedeiras de forma independente do citoesqueleto e dependente de lisossomos e que neste trabalho nós demonstramos que para o caso das amastigotas o citoesqueleto mostrou-se peça fundamental para invasão celular, propusemos o modelo de invasão apresentado na figura 15. Independente da forma de invasão envolvida, ambas as formas infectantes terminam habitando típicos vacúolos parasitóforos fusogênicos que fundem com lisossomos na via endossômica e habitam a região perinuclear.

Vários trabalhos relatam a presença de amastigotas de *Leishmania* spp. no interior de células não fagocíticas sendo que tanto o processo de invasão como o papel destas células no curso da infecção são aspectos até então negligenciados nos estudos desses parasitos. Vimos neste trabalho que as amastigotas conseguem invadir, se estabelecer e se replicar dentro de células não fagocíticas. Considerando que as amastigotas são as responsáveis pela amplificação da doença, isso se torna uma descoberta importante a ser explorada e considerada. Devido ao fato de muitas células não fagocíticas serem células longevas e sem capacidade microbicida estes parasitos poderiam utilizar estes tipos celulares como esconderijo. Apesar de os macrófagos serem as principais células encontradas infectadas na fase crônica da doença, há muito se sabe que estas células podem ser infectadas por vias indiretas, como pela fagocitose de corpos apoptóticos de células previamente infectadas pelo parasito, mecanismo conhecido como hipótese do cavalo de Tróia (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003). Nos momentos iniciais da infecção, por exemplo, sabemos que os neutrófilos são as primeiras células a migrar para o local da lesão e a fagocitar o parasito, sendo que os macrófagos são infectados num segundo momento, após ingerirem corpos apoptóticos dos neutrófilos contendo amastigotas em seus interiores (PETERS *et al.*, 2008). Neste contexto há de se considerar também um possível papel para células não fagocíticas. Uma célula não fagocítica, por exemplo, pode funcionar como refúgio para o parasito, sítios de resistência a drogas e ao sistema imune, sendo possível que, mediante sua morte, e pela lógica da sucessão celular tecidual, dentro da qual macrófagos são encarregados da remoção de células mortas e senescentes, esta acabe sendo fagocitada por macrófagos dentro dos quais o parasito possui alta capacidade replicativa, ocasionando as lesões características da doença.

Por anos, a leishmaniose foi considerada uma doença que envolvia exclusivamente macrófagos (NOVAIS; SCOTT, 1971) acreditando-se que a célula se rompe por consequência da multiplicação das amastigotas com consequentemente amplificação da infecção (BOGDAN *et al.*, 2000b)(REAL *et al.*, 2014), no entanto esta hipótese carece de demonstração experimental. Sendo a forma evolutiva responsável pela amplificação da doença, é correto afirmar que as amastigotas desenvolveram estratégias não somente para sobreviver dentro do ambiente hostil dos macrófagos, conseguindo evitar sua eliminação, mas também maneiras de infectar novas células. Neste contexto alguns grupos descreveram mecanismos celulares que podem culminar com a liberação de amastigotas no meio extracelular sem que ocorra lise da célula infectada. Rittig e Bogdan

(2000) mostraram que pequenos vacúolos se acumulam na periferia dos fagócitos infectados e são liberados durante várias horas, sendo proposto que as amastigotas são liberadas por um processo semelhante à exocitose, mostrando que a saída de amastigotas de *Leishmania* das células independe da lise da célula hospedeira (RITTIG; BOGDAN, 2000). Outros autores propuseram que a saída das amastigotas ocorre a partir de células hospedeiras danificadas, num processo mediado por extrusões dos vacúolos parasitóforos que estimulam a produção de citocinas inflamatórias atraindo novos macrófagos (REAL *et al.*, 2014). Pouco se sabe, assim, sobre a amplificação da infecção, mas alguns mecanismos parecem envolver a liberação de amastigotas no meio extracelular. Sabe-se que as amastigotas, ao contrário das formas promastigotas, são extremamente susceptíveis ao sistema do complemento, sendo assim, parece lógico que as mesmas tenham uma capacidade elevada de invadir células não fagocíticas como vimos *in vitro* neste trabalho e que, no contexto *in vivo*, isto possa ser um fator primordial para que o parasito evada a imunidade inata, em particular o sistema do complemento.

Os patógenos intracelulares se especializam em subverter os mecanismos celulares em benefício próprio. Bactérias como *Shigella* e *Listeria*, assim como o vírus da *Vaccinia* (FRISCHKNECHT; WAY, 2001), aproveitam-se do complexo Arp2/3, que induz a polimerização de actina, para adentrar as células (LOISEL *et al.*, 1999)(TRAN VAN NHIEU; SANSONETTI, 1999). Como discutido anteriormente, vimos que as amastigotas de *T. cruzi* conseguem invadir células HeLa utilizando os filamentos de actina da célula hospedeira, os quais formam uma espécie de “copo” logo abaixo do parasito (MORTARA *et al.*, 2008). Neste trabalho mostramos que a invasão das amastigotas de *L. amazonensis* em células não fagocíticas é dependente do citoesqueleto de actina, visto que, quando o este é destruído, a infecção é fortemente restringida. Nossos dados também apontam para uma intensa e localizada atividade do citoesqueleto ao redor das formas amastigotas em etapas iniciais de invasão celular (Fig. 11), o que de alguma forma precisa ser induzido pelo parasito. Deste modo, é possível que as amastigotas sejam dotadas de fatores de virulência diretamente envolvidos na mobilização e polimerização do citoesqueleto da célula hospedeira para fins de facilitar a invasão celular.

Com o parasito se estabelecendo e alcançando novas células, temos como consequência a amplificação da doença no hospedeiro, evento complexo que envolve vias pouco exploradas. Pouco se sabe como estes parasitos se disseminam e como ocorre eventos como a visceralização. De alguma forma, como é o caso para as espécies

responsáveis pelas formas viscerais das leishmanioses, os parasitos que são inicialmente inoculados na derme, alcançam órgãos internos e neles estabelecem forte parasitismo. Neste contexto é interessante pensar-se também na capacidade invasiva das amastigotas no contexto das travessias teciduais que o parasito faz entre a derme e as vísceras. Diversos parasitos utilizam interações específicas para conseguir invadir e até migrar por tecidos e conseguir evadir do sistema imune, como é o caso do *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium spp.*, *T. cruzi*, além de algumas bactérias. Diante de todos os nossos resultados, é plausível hipotetizar que a capacidade invasiva observada neste trabalho possa estar envolvida tanto na viagem que o parasito faz pelos diferentes tecidos do hospedeiro, quanto entre as diferentes células do hospedeiro até que eventualmente atinja os macrófagos.

FIGURA SUPLEMENTAR

Figura Suplementar 1

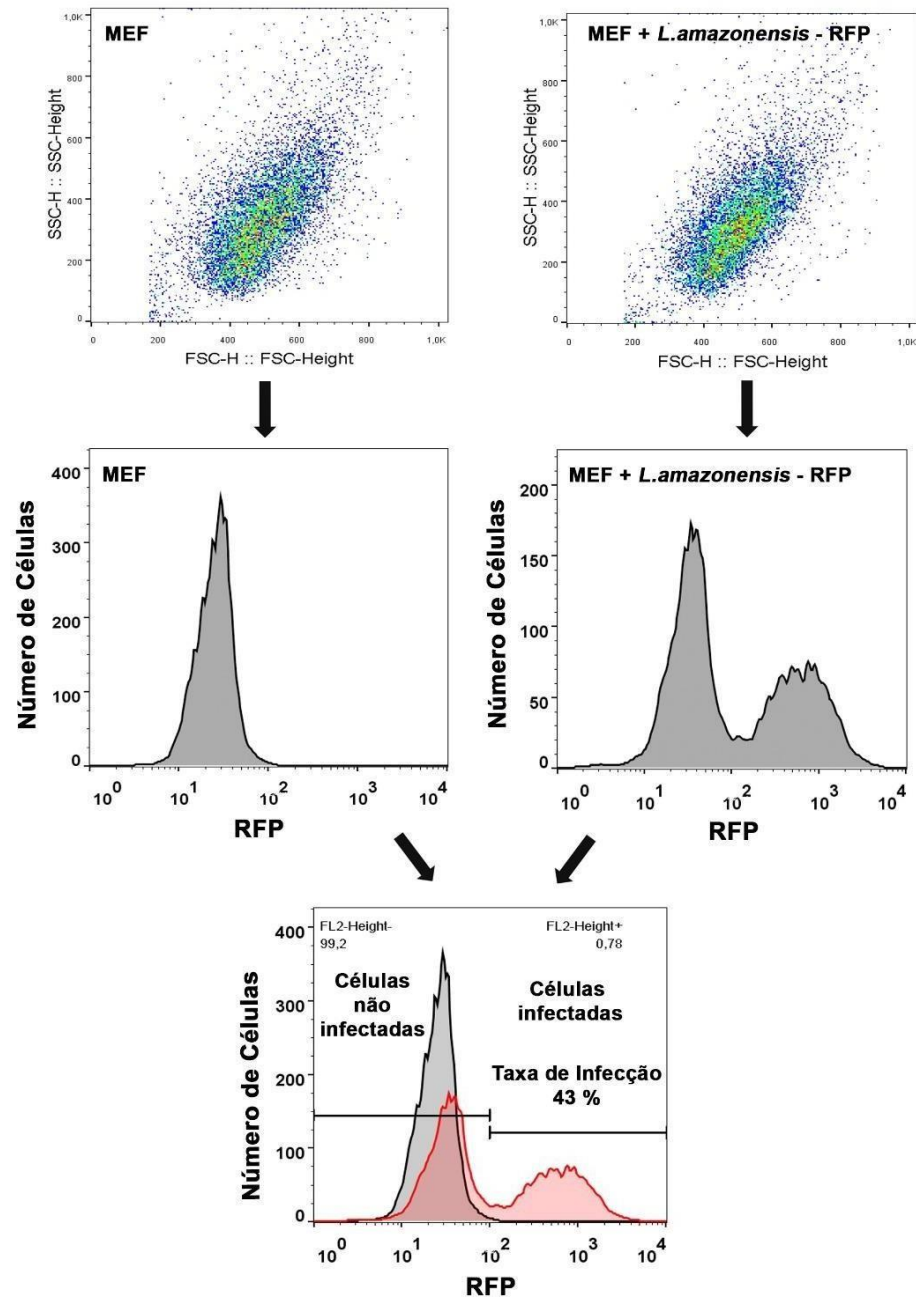
FACS - Estratégia de *Gating* e Quantificação da Infecção

Figura Suplementar 1 : Estratégia de *gating* utilizada para a quantificação da infecção de MEFs por *L. amazonensis* através do FACS. Figura esquemática mostrando como os dados de citometria de fluxo foram obtidos e tratados desde sua aquisição até a obtenção das taxas de infecção.

REFERENCIAS

- ADRIAENSEN, W. *et al.* Immunomodulatory therapy of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-coinfected patients. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JAN, 12 jan. 2018.
- AKHOUNDI, M. *et al.* A Historical 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.
- ANTOINE, J. C. *et al.* The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 392–401, 1 out. 1998.
- BESTEIRO, S.; DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 797–805, 1 jun. 2011.
- BOGDAN, C. *et al.* Fibroblasts as Host Cells in Latent Leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 12, p. 2121–2130, 19 jun. 2000a.
- BOGDAN, C. *et al.* Fibroblasts as Host Cells in Latent Leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 12, p. 2121–2130, 19 jun. 2000b.
- CANTON, J. *et al.* Disruption of the fusion of *Leishmania* parasitophorous vacuoles with ER vesicles results in the control of the infection. **Cellular microbiology**, v. 14, n. 6, p. 937–948, jun. 2012.
- CARNEIRO, M. *et al.* (2018). NOX2- Derived reactive oxygen species control inflammation during *L. amazonensis* infection by mediating infection-induced neutrophil apoptosis. *J. Immunol*
- CAVALCANTE-COSTA, V. S. *et al.* *Leishmania amazonensis* hijacks host cell lysosomes involved in plasma membrane repair to induce invasion in fibroblasts. **Journal of Cell Science**, v. 132, n. 6, 1 mar. 2019.
- CAVALCANTE-COSTA, V. S. *et al.* *Leishmania* and Their Vertebrate Host Cells. In: [s.l: s.n.]. p. 143–165.
- CECÍLIO, P. *et al.* Deception and manipulation: The arms of *Leishmania*, a successful parasite. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. OCT, p. 480, 2014.

CHANG, K. P. *Leishmania* Infection of Human Skin Fibroblasts in Vitro: Absence of Phagolysosomal Fusion After Induced Phagocytosis of Promastigotes, and Their Intracellular Transformation. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 27, n. 6, p. 1084–1096, 1 nov. 1978.

COSSART, P.; HELENIUS, A. Endocytosis of Viruses and Bacteria. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 8, p. a016972, 1 ago. 2014.

COSSART, P.; SANSONETTI, P. J. Bacterial Invasion: The Paradigms of Enteroinvasive Pathogens. **Science**, v. 304, n. 5668, p. 242–248, 9 abr. 2004.

CUPOLILLO, E. *et al.* A Revised Classification for *Leishmania* and Endotrypanum. **Parasitology Today**, v. 16, n. 4, p. 142–144, 1 abr. 2000.

DEDET, J. P. *et al.* Uptake and killing of *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes by human skin fibroblasts. <http://dx.doi.org/10.1080/00034983.1983.11811670>, v. 77, n. 1, p. 35–44, 2016.

DESJEUX, P. *Leishmaniasis*: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 1 set. 2004.

DUTTA, A. *et al.*; 2005. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. v. 54, n. 2, p. 119-122, 1 jun, 2005.

FERNANDES, M. C. *et al.* Extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* are potent inducers of phagocytosis in mammalian cells. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 977–991, 1 jun. 2013.

FREITAS, J. J. A. *et al.* Tratamento de recidiva de leishmaniose visceral em criança com terapia tripla: relato de caso. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, p. 101206, 1 jan. 2021.

FRISCHKNECHT, F.; WAY, M. Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization. **Trends in Cell Biology**, v. 11, n. 1, p. 30–38, 1 jan. 2001.

GUIDO, C. *et al.* Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts by TGF- β drives tumor growth: connecting TGF- β signaling with “Warburg-like” cancer metabolism and L-lactate production. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 11, n. 16, p. 3019–3035, 15 ago. 2012.

GUPTA, G.; OGHUMU, S.; SATOSKAR, A. R. Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. **Advances in Applied Microbiology**, v. 82, p. 155–184, 1 jan. 2013.

HORTA, M. F. *et al.* Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012.

HORTA, M. F. *et al.* Cell invasion by intracellular parasites - the many roads to infection. **Journal of cell science**, v. 133, n. 4, 20 fev. 2020.

HURRELL, B. P. *et al.* Frontline Science: *Leishmania mexicana* amastigotes can replicate within neutrophils. **Journal of leukocyte biology**, v. 102, n. 5, p. 1187–1198, nov. 2017.

JI, J.; SUN, J.; SOONG, L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. **Infection and immunity**, v. 71, n. 8, p. 4278–4288, 1 ago. 2003.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. **Current opinion in hematology**, v. 7, n. 1, p. 26–31, 2000.

KIMA, P. E. *et al.* Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. **The Journal of experimental medicine**, v. 191, n. 6, p. 1063–1067, 20 mar. 2000.

KIMA, P. E. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1087, ago. 2007.

KOSTKA, S. L. *et al.* IL-17 Promotes Progression of Cutaneous Leishmaniasis in Susceptible Mice. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 5, p. 3039–3046, 1 mar. 2009.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 210–214, 1 maio 2003.

LEWIS, D. H. Infection of tissue culture cells of low phagocytic ability by *Leishmania mexicana mexicana*. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 68, n. 3, p. 327–336, 1974.

LEWIS, D. H. Infection of tissue culture cells of low phagocytic ability by *Leishmania*

mexicana mexicana. <http://dx.doi.org/10.1080/00034983.1974.11686955>, v. 68, n. 3, p. 327–336, 2016.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 83, 2012.

LOISEL, T. P. *et al.* Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. **Nature** **1999 401:6753**, v. 401, n. 6753, p. 613–616, 7 out. 1999.

LOVE, D. C.; KANE, M. M.; MOSSER, D. M. *Leishmania amazonensis*: the phagocytosis of amastigotes by macrophages. **Experimental parasitology**, v. 88, n. 3, p. 161–171, 1998.

MCCONVILLE, M. J. *et al.* Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. **Trends in parasitology**, v. 23, n. 8, p. 368–375, ago. 2007.

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? **Immunological reviews**, v. 201, p. 206–224, out. 2004.

MELBY, P. C.; TRAVI, B. L.; YANETH OSORIO, E. *Leishmania*. **Encyclopedia of Microbiology**, p. 769–779, 1 jan. 2019.

MELO, H. A.; ROSSONI, D. F.; TEODORO, U. Spatial distribution of cutaneous leishmaniasis in the state of Paraná, Brazil. **PLOS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0185401, 1 set. 2017.

MINUZZO, E. A. DE S. *et al.* EFEITOS ADVERSOS DA ANFOTERICINA B CONTRAPONDO- SE À ADESÃO AO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 101969, 1 jan. 2022.

MOLL, H. Dendritic cells and host resistance to infection. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 8, p. 493–500, 1 ago. 2003.

MOREHEAD, J.; COPPENS, I.; ANDREWS, N. W. Opsonization Modulates Rac-1 Activation during Cell Entry by *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4571, 2002.

MORTARA, R. A. *et al.* Host cell actin remodeling in response to *Trypanosoma cruzi*: Trypomastigote versus amastigote entry. **Subcellular Biochemistry**, v. 47, p. 101–109, 2008.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. The *Leishmania*–macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 301–308, 1 fev. 2008.

NARANJO, C. *et al.* Detection of *Leishmania* spp. and associated inflammation in ocular-associated smooth and striated muscles in dogs with patent leishmaniosis. **Veterinary Ophthalmology**, v. 13, n. 3, p. 139–143, 1 maio 2010.

NDJAMEN, B. *et al.* *Leishmania* parasitophorous vacuoles interact continuously with the host cell's endoplasmic reticulum; Parasitophorous vacuoles are hybrid compartments. **Cellular microbiology**, v. 12, n. 10, p. 1480, out. 2010.

NOVAIS, F. O.; SCOTT, P. Immunology of leishmaniasis. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 44, n. 4, p. 499, 27 abr. 1971.

OKUDA, K. *et al.* *Leishmania amazonensis* Engages CD36 to Drive Parasitophorous Vacuole Maturation. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 6, 1 jun. 2016.

OKWOR, I.; UZONNA, J. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 3, p. 489–493, 2 mar. 2016.

PACIELLO, O. *et al.* Canine inflammatory myopathy associated with *Leishmania infantum* infection. **Neuromuscular Disorders**, v. 19, n. 2, p. 124–130, 1 fev. 2009.

PESSOTTI, J. H. *et al.* Interaction of *Leishmania (L.) chagasi* with the Vero cell line. **Parasite**, v. 11, n. 1, p. 9–102, 1 mar. 2004.

PETERS, N. C. *et al.* In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 15 ago. 2008.

REAL, F. *et al.* Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 1549–1564, 1 out. 2014.

RIBEIRO-GOMES, F. L. *et al.* Efficient Capture of Infected Neutrophils by Dendritic

Cells in the Skin Inhibits the Early Anti-*Leishmania* Response. **PLOS Pathogens**, v. 8, n. 2, p. e1002536, fev. 2012.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 59, 2012.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 16, n. 7, p. 292–297, 1 jul. 2000.

SANTIAGO, A. S.; PITA, S. S. DA R.; GUIMARÃES, E. T. Leishmaniasis treatment, current therapy limitations and new alternative requirements: A narrative review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e29510716543–e29510716543, 22 jun. 2021.

SARKAR, A. *et al.* (2018). Quantification of Intracellular Growth Inside Macrophages is a Fast and Reliable Method for Assessing the Virulence of *Leishmania* Parasites. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (133), 57486. <https://doi.org/10.3791/57486>

SCHILLE, S. *et al.* LC3-associated phagocytosis in microbial pathogenesis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, n. 1, p. 228–236, 1 jan. 2018.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239–251, 2004.

SMITH, R. S. *et al.* Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. **The American Journal of Pathology**, v. 151, n. 2, p. 317, 1997.

SOONG, L. Modulation of Dendritic Cell Function by *Leishmania* Parasites. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 7, p. 4355–4360, 1 abr. 2008.

SUZUE, K. *et al.* Critical role of dendritic cells in determining the Th1/Th2 balance upon *Leishmania major* infection. **International Immunology**, v. 20, n. 3, p. 337–343, 1 mar. 2008.

TRAN VAN NHIEU, G.; SANSONETTI, P. J. Mechanism of *Shigella* entry into epithelial cells. **Current opinion in microbiology**, v. 2, n. 1, p. 51–55, 1 fev. 1999.

UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annual review of immunology**, v. 20, p. 825–852, 2002.

VAMVAKIDIS, C. D. *et al.* Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). **Veterinary Record**, v. 146, n. 24, p. 698–703, 1 jun. 2000.

WALKER, D. M. *et al.* Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 71, n. 7, p. 1245–1263, 13 nov. 2014.

WANDERLEY, J. L. M. *et al.* Mimicry of Apoptotic Cells by Exposing Phosphatidylserine Participates in the Establishment of Amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in Mammalian Hosts. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 3, p. 1834–1839, 1 fev. 2006.

WILSON, J. *et al.* Control of Parasitophorous Vacuole Expansion by LYST/Beige Restricts the Intracellular Growth of *Leishmania amazonensis*. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 10, p. 1000179, out. 2008.

XIA, Y. *et al.* RelB regulation of chemokine expression modulates local inflammation. **The American Journal of Pathology**, v. 151, n. 2, p. 375, 1997.

XU, Y.; WEISS, L. M. The microsporidian polar tube: A highly specialised invasion organelle. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 9, p. 941–953, 1 ago. 2005.

YOUNG, J.; KIMA, P. E. Focus: Organelles: The *Leishmania* Parasitophorous Vacuole Membrane at the Parasite-Host Interface. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 92, n. 3, p. 511, 2019.

ANEXO 1

Meio para cultivo de amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis* (100 ml)

1. Tampão Succínico

Deve-se preparar uma solução de 50 mM de Tampão Succínico, adicionando 50 ml de Solução de ácido succínico (0.2M), 50 ml de hidróxido de sódio (0.2M) e 200 ml de água deionizada, estando essa solução no pH de 4.5.

2. Solução de Hemina

Dissolver 0.125 g de hemina em 50 ml de Hidróxido de sódio (0.2M) - necessário manter a solução no banho-maria a 60°C para dissolver totalmente a hemina.

Posteriormente, deve-se preparar 3 soluções, para que sejam filtradas em filtro de 0.22 µm e em ordem sequencial.

1. 28 ml de água deionizada e 0.1 ml da Solução de Hemina (0.2M);
2. 40 ml de Tampão Succinato, 1% de Adenina 10 mM, 0.25g de Glicose e 0.5g de meio Trypticase (peptone);
3. 20 ml de soro fetal bovino inativado, 1% de antibiótico Penicilina/Estreptomicina, 10 ml de meio M199 10X e 1% de L-glutamina.

Depois de filtrado, homogeneizar e armazenar na geladeira, sendo necessário o meio estar no pH 5.2.

Cultivo de amastigotas:

1. Em uma garrafa de cultura, coloque 5 ml de meio próprio para amastigotas e acrescente 1 ml de uma cultura de promastigotas, deixar na estufa a 24°C *overnight*;
2. Posteriormente, transfira a cultura para a estufa a 34°C, durante 3 a 4 dias o que resultará na obtenção das amastigotas axênicas);

Os repiques das culturas de amastigotas devem ser feitos em 1:5 no meio acima descrito e os parasitos mantidos a 34°C (as culturas não devem passar de 7 dias). Deve-se atentar aos grumos dos parasitos, pois muitos grumos podem indicar parasitos mortos. As culturas das amastigotas podem ser mantidas no máximo até a 10ª passagem, a se considerar o tempo de cultivo das promastigotas, e de modo a preservar altos índices de infectividade.