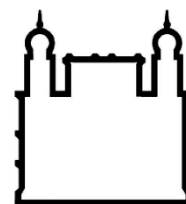




UFBA

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



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR
*LEISHMANIA spp.***

AMANDA REBOUÇAS PAIXÃO

**Salvador – Bahia
2020**

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

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR
*LEISHMANIA spp.***

AMANDA REBOUÇAS PAIXÃO

Orientadora: Dr^a Juliana P.B.M. Fullam

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

**Salvador – Bahia
2020**

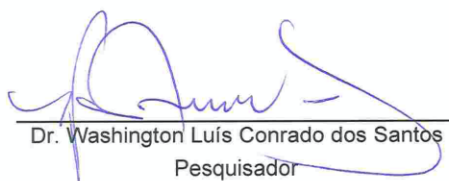
“AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR *LEISHMANIA spp*”.


Amanda Rebouças Paixão


FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 07 de janeiro de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA


Dr. Washington Luís Conrado dos Santos
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ


Dra. Valéria de Matos Borges
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ


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

FONTES DE FINANCIAMENTO

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

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu melhor amigo.

Aos meus queridos pais pelo amor incondicional e dedicação aos meus estudos.

Ao meu amado esposo, Pedro, pelo encorajamento diário, carinho e paciência.

A minha querida orientadora, Juliana, pela formação e dedicação à minha carreira científica, além da amizade.

A minha co-orientadora, Dra. Cláudia, pelas contribuições neste trabalho.

A minha estudante de iniciação científica, Thaílla, pelo auxílio nos experimentos.

A equipe do Dr. Edgar, que nos cedeu os isolados de *L. braziliensis*.

Aos meus amigos do LAIPHE, pelos divertidos momentos juntos e parceria durante esses anos.

A Plataforma de microscopia do IGM, a coordenação do curso de Patologia.

A Banca, pelas contribuições.

A equipe da Biblioteca do IGM.

A FAPESB, pela bolsa e financiamento deste trabalho.

REBOUÇAS, Amanda. Avaliação da migração de células dendríticas infectadas por *Leishmania spp.* 2020. 65 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

RESUMO

INTRODUÇÃO: *Leishmania* é um parasito intracelular capaz de causar lesão na pele, mucosa e órgãos internos. A disseminação e *homing* de células infectadas contendo antígenos de *Leishmania* são fundamentais para a sobrevivência do parasito no hospedeiro e para o estabelecimento da lesão. Estudo recente demonstrou que a infecção por *Leishmania* reduz a migração de macrófagos, associada à redução da expressão de proteínas envolvidas em formação de complexos de adesão, assim como sua fosforilação. Os autores mostram ainda que existe um aumento na frequência de polimerização e *turnover* de filamentos de actina em macrófagos após a infecção por *L. amazonensis*. Entretanto, pouco se conhece sobre a migração de células dendríticas infectadas por *Leishmania* e os mecanismos envolvidos nesse processo. **OBJETIVO:** Assim, a presente proposta tem como objetivo avaliar a migração de células dendríticas infectadas por diferentes espécies de *Leishmania*, além de isolados de *L. braziliensis* associados à forma localizada ou disseminada da doença. **MATERIAL E MÉTODOS:** Para isso, células dendríticas humanas obtidas de doadores saudáveis foram cultivadas e infectadas por *Leishmania sp.* e submetidas à migração utilizando quimioatratador específico para essas células, em sistema *transwell*. Adicionalmente, avaliamos a formação de complexos de adesão pela imunomarcação de p-FAK e p-paxilina, a polimerização do citoesqueleto de actina por faloidina e proteínas importantes nesse processo como Cdc42, RhoA e Rac1, utilizando microscopia confocal. Por fim, avaliamos ainda a expressão de CCR7 por citometria de fluxo. **RESULTADOS:** A análise dos experimentos mostra um aumento da migração de células dendríticas após a infecção por *L. infantum* até 48h após a infecção, ao passo que houve apenas um aumento transitório nas células infectadas por *L. amazonensis* e uma redução na migração das células infectadas por *L. braziliensis*. Associado a isto, nosso trabalho mostra um aumento na formação de complexos de adesão e polimerização do citoesqueleto de actina nas células dendríticas infectadas por *L. infantum* e uma redução nos grupos infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*. Adicionalmente, mostramos um aumento na migração de células dendríticas infectadas por *L. braziliensis* isoladas de pacientes com a forma disseminada da doença, em comparação com isolados de pacientes com a forma localizada da Leishmaniose. Mostramos ainda um aumento da formação de complexos de adesão e polimerização de actina nas células infectadas *L. braziliensis* isoladas de pacientes com a forma disseminada da doença, em comparação àquelas infectadas com os isolados de pacientes com a forma localizada. Por fim, observamos também um aumento da expressão de CCR7 tanto em células infectadas por *L. infantum*, quando comparadas com células infectadas por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, quanto em células infectadas por *L. braziliensis* isoladas de pacientes

com a forma disseminada da doença, em comparação com células infectadas isolados de pacientes com a forma localizada. **CONCLUSÕES:** Em conclusão, nosso trabalho sugere que células dendríticas são importantes para a visceralização da doença e disseminação de *Leishmania* no hospedeiro vertebrado.

Palavras-chave: Células Dendríticas, Migração, *Leishmania*.

REBOUÇAS, Amanda. Evaluation of *Leishmania*-infected dendritic cells migration. 2020. 65 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Leishmania* is an intracellular parasite that causes lesions in the skin, mucosa, and internal organs. The dissemination and homing of infected cells containing *Leishmania* antigens are crucial for the survival of the parasite in the host and the establishment of the infection. A recent study has shown that *Leishmania* infection reduces macrophage migration, associated with reduced expression of proteins involved in the formation of adhesion complexes, as well as their phosphorylation. The authors also show that there is an increase in the frequency of polymerization and turnover of actin filaments in macrophages after *L. amazonensis* infection. However, the migration of dendritic cells infected by *Leishmania* and the mechanisms involved in this process remain unknown. **AIM:** Thus, the present proposal aims to evaluate the migration of dendritic cells infected by different *Leishmania* species, in addition to *L. braziliensis* isolates obtained from patients with the localized or disseminated form of the disease. **MATERIAL AND METHODS:** For this, human dendritic cells obtained from healthy donors were cultivated and infected by *Leishmania* sp. and submitted to migration using a specific chemoattractant to these cells in a transwell system. Additionally, we evaluated the formation of adhesion complexes through p-FAK and p-paxillin evaluation, the polymerization of the actin cytoskeleton by phalloidin, and essential proteins in this process such as Cdc42, Rho and Rac-1, using confocal microscopy. We also evaluated CCR7 expression using flow cytometry. **RESULTS:** Our results show an increase in dendritic cell migration after *L. infantum* infection up to 48 h after infection, while there was only a transient increase in *L. amazonensis*-infected cells and a reduction in the migration of *L. braziliensis*-infected cells. We also showed an increase in the adhesion complexes formation and polymerization of the actin cytoskeleton in *L. infantum*-infected dendritic cells, which was not observed in *L. amazonensis*- or *L. braziliensis*-infected cells. Also, we found an increase in the migration of dendritic cells infected by *L. braziliensis* isolates obtained from patients with the disseminated form of the disease, but not in those infected by the isolates obtained from patients with the localized form. Together with this, we also showed an increase in the adhesion complexes formation and polymerization of the actin cytoskeleton in cells infected with the isolates from patients with the disseminated form of the disease. Finally, we also observed an increase in the expression of CCR7 in both *L. infantum*-infected cells and in cells infected by the *L. braziliensis* isolates from patients with the disseminated form of the disease. **CONCLUSIONS:** In conclusion, our results suggest that dendritic cells are important for the visceralization of the disease and dissemination of *Leishmania* parasites in the vertebrate host.

Key words: Dendritic cells, Migration, *Leishmania*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Formas clínicas da leishmaniose.....	16
Figura 2	Ciclo biológico do parasito.....	18
Figura 3	Célula Dendrítica.....	19
Figura 4	Etapas da migração celular.....	22
Figura 5	Complexo de adesão.....	23
Figura 6	Rho GTPases.....	25
Figura 7	Caracterização da população de células dendríticas humanas.....	34
Figura 8	Taxa de infecção.....	35
Figura 9	Sistema <i>Transwell</i>	36
Figura 10	Avaliação da migração de células dendríticas na infecção por <i>Leishmania</i>	37
Figura 11	Avaliação da formação de complexos de adesão em células dendríticas infectadas por <i>Leishmania</i>	39
Figura 12	Avaliação da polimerização de actina em células dendríticas infectadas por <i>Leishmania</i>	42
Figura 13	Avaliação da expressão de CCR7 em células dendríticas infectadas por <i>Leishmania</i>	46
Figura 14	Avaliação da migração de células dendríticas infectadas por isolados de <i>L. braziliensis</i>	48
Figura 15	Avaliação da formação do complexo de adesão em células dendríticas infectadas por isolados de <i>L. braziliensis</i>	50
Figura 16	Avaliação da polimerização do citoesqueleto de actina em células dendríticas infectadas por isolados de <i>L. braziliensis</i>	53
Figura 17	Avaliação da expressão de CCR7 em células dendríticas infectadas por isolados de <i>L. braziliensis</i>	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	<i>Antigen presenting-cell</i>
CCL3/MIP1α	Proteína 1- α inflamatória de macrófago
CD14	<i>Cluster of differentiation 14</i>
CD86	<i>Cluster of differentiation 86</i>
CD80	<i>Cluster of differentiation 80</i>
DAMPs	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
F-actina	Actina Fosforilada
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HCMV	Citomegalovirus
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN-γ	Interferon gamma
LV	Leishmaniose Visceral
LC	Leishmaniose Cutânea
LMC	Leishmaniose Muco-cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LD	Leishmaniose Disseminada
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldeído
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TLR2	<i>Toll-like receptor 2</i>
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TLR9	<i>Toll-like receptor 9</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE	14
1.2	CICLO BIOLÓGICO DO PARASITO	14
1.3	CÉLULAS DENDRÍTICAS NA INFECÇÃO POR <i>LEISHMANIA</i>	16
1.4	MIGRAÇÃO CELULAR	18
1.4.1	Etapas da migração celular	19
1.4.2	Complexo de adesão	20
1.4.3	Citoesqueleto de actina	24
1.5	MIGRAÇÃO CELULAR NA INFECÇÃO POR <i>LEISHMANIA</i>	24
1.5.1	Migração de células dendríticas na infecção por <i>Leishmania</i>	25
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	25
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVO GERAL	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	COMITÊ DE ÉTICA	27
4.2	SEPARAÇÃO DE PBMC E CULTIVO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	27
4.3	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS.....	28
4.4	CULTIVO DE PARASITOS.....	28
4.5	INFECÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E DETERMINAÇÃO DA TAXA DE INFECÇÃO.....	28
4.6	AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>LEISHMANIA</i>	29
4.7	AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE ADESÃO EM CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>LEISHMANIA</i>	29
4.8	AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DE ACTINA EM CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>LEISHMANIA</i>	30

4.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CCR7 EM CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>LEISHMANIA</i>	30
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
5 RESULTADOS	
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS	31
5.2 TAXA DE INFECÇÃO.....	32
5.3 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR <i>LEISHMANIA</i>	34
5.4 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE ADESÃO EM CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR <i>LEISHMANIA</i>	35
5.5 AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DE ACTINA EM CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR <i>LEISHMANIA</i>	39
5.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CCR7 EM CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR <i>LEISHMANIA</i>	44
5.7 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR ISOLADOS DE <i>L. BRAZILIENSIS</i>	45
5.8 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE ADESÃO EM CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR ISOLADOS DE <i>LEISHMANIA BRAZILIENSIS</i>	47
5.9 AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DE ACTINA EM CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR ISOLADOS DE <i>LEISHMANIA BRAZILIENSIS</i>	49
5.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CCR7 EM CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR ISOLADOS DE <i>LEISHMANIA BRAZILIENSIS</i>	
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada, endêmica em 98 países ou territórios de cinco continentes, compostos por Américas Latina e Central, África, Ásia e sul da Europa (WHO, 2017; ALVAR et al., 2012). A organização mundial da saúde estima que 12 milhões de indivíduos estejam infectados por *Leishmania* e que 350 milhões de indivíduos corram risco de serem infectados (BAÑULS et al., 2007; WHO, 2017). Essa doença é uma antroponose causada por protozoários tripanossomatídeos flagelados do gênero *Leishmania*, podendo apresentar diferentes tipos de manifestações clínicas, desde lesões localizadas na pele que cicatrizam espontaneamente, lesões de pele, que se espalham de forma disseminada, a forma mucocutânea da doença, além da leishmaniose visceral, forma mais grave das leishmanioses que podem levar à morte se não tratada (DESJEUX et al., 2004). As diferentes formas da leishmaniose estão associadas primariamente à espécie do parasito e também a condições inerentes ao hospedeiro (ROGERS et al., 2002).

As diferentes formas clínicas podem ser classificadas em Leishmaniose Cutânea (LC) e Leishmaniose Visceral (LV). A LC é caracterizada como um problema de saúde pública, que afeta 88 países, sendo registrados cerca de 1,5 milhões de casos. No Brasil, esta forma clínica desencadeia reflexos nos campos social, econômico e psicológico devido a suas conseqüentes deformidades (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). A LC pode ser clinicamente dividida em cutânea localizada (LCL), cutânea disseminada (LCD), cutânea difusa (LD) e muco-cutânea (LCM) (Figura 1). Nesse sentido, na LC, as lesões são de caráter cutâneo e tendem a cicatrizar, com úlceras geralmente indolores de formato arredondado, base eritematosa e fundo necrótico. As lesões cutâneas da LC podem se apresentar por úlceras primárias localizadas podendo ser causada por *L. braziliensis* (LCL); A LCD, cuja característica está na presença de múltiplas lesões papulares, sendo causada principalmente por *L. braziliensis*; A LCM, na qual ocorre a presença de lesões destrutivas em vias aéreas superiores, sendo causada por *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* em alguns casos; e a LD, com lesões nodulares pelo corpo, causada por *L. amazonensis* (BRASIL, MINISTERIO DA SAÚDE, 2007).

A LV é caracterizada por lesões que acometem baço, fígado, medula óssea e linfonodos concomitando em hepatoesplenomegalia no indivíduo, sendo causadas por *L. infantum* e que podem levar à morte se não tratadas (Ministério da Saúde, 2007).

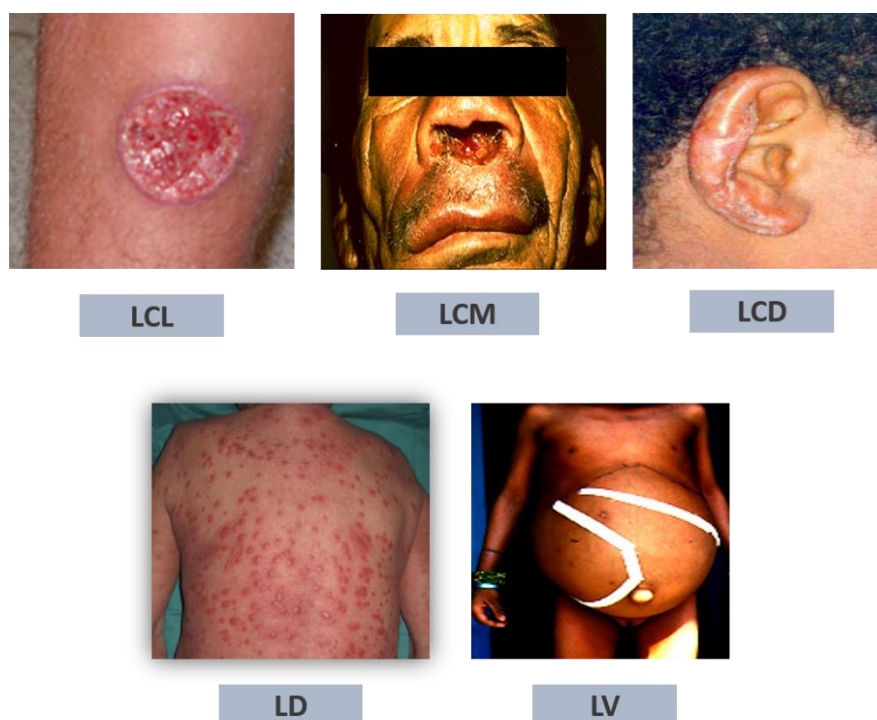


Figura 1. Formas clínicas da leishmaniose. A classificação da leishmaniose é baseada em critérios de fisiopatogenia, aspecto e localização das lesões. A LC causa lesões ulceradas e se apresenta sob as formas clínicas: LCL, LCM, LCD ou na forma disseminada LD. A forma visceralizada da doença é conhecida como LV e atinge órgãos internos como baço e fígado. Fonte: Ministério da saúde, 2007.

1.2 CICLO BIOLÓGICO DO PARASITO

O ciclo biológico da leishmaniose é dividido em dois estágios: um flagelado, onde os parasitos possuem alta motilidade, e um aflagelado, sendo este obrigatoriamente intracelular (KAYE e SCOTT, 2011). Em todas as formas da leishmaniose, a infecção se inicia com a inoculação de formas promastigotas do parasito na pele do hospedeiro por diferentes espécies de flebotomíneos, durante o repasto sanguíneo. No hospedeiro vertebrado, após ser reconhecido pelo macrófago ou células dendríticas, o parasito é internalizado e, no interior destas células, as formas promastigotas sofrem

transformações moleculares e estruturais dando origem às formas amastigotas. Nesse estágio de desenvolvimento, o parasito é obrigatoriamente intracelular e capaz de sobreviver e se multiplicar no interior de compartimentos fagolisossomais, chamados de vacúolos parasitóforos (ALEXANDER, 1992). No interior das células hospedeiras, o parasito dissemina-se pelos diferentes tecidos do hospedeiro causando lesões (LEON et al., 2007; MOLL et al., 1993).

A infecção do inseto hematófago por *Leishmania* ocorre durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo fêmea em hospedeiro vertebrado infectado. As formas amastigotas ingeridas pelo inseto vetor chegam ao seu intestino médio e iniciam um processo de diferenciação, transformando-se em formas promastigotas, as quais se multiplicam por divisão binária. Progressivamente, durante o processo de diferenciação, denominado metaciclogênese, surgem formas promastigotas metacíclicas, estágio não proliferativo e infectivo. Estas formas migram para a região do intestino anterior do vetor podendo ser transmitidas para um novo hospedeiro vertebrado durante segundo repasto sanguíneo. Em seguida, as formas promastigotas são internalizadas por células fagocíticas do hospedeiro vertebrado, principalmente macrófagos, recomeçando seu ciclo de vida (Figura 2) (GUPTA e NISHI, 2011; BATES et al., 2007).

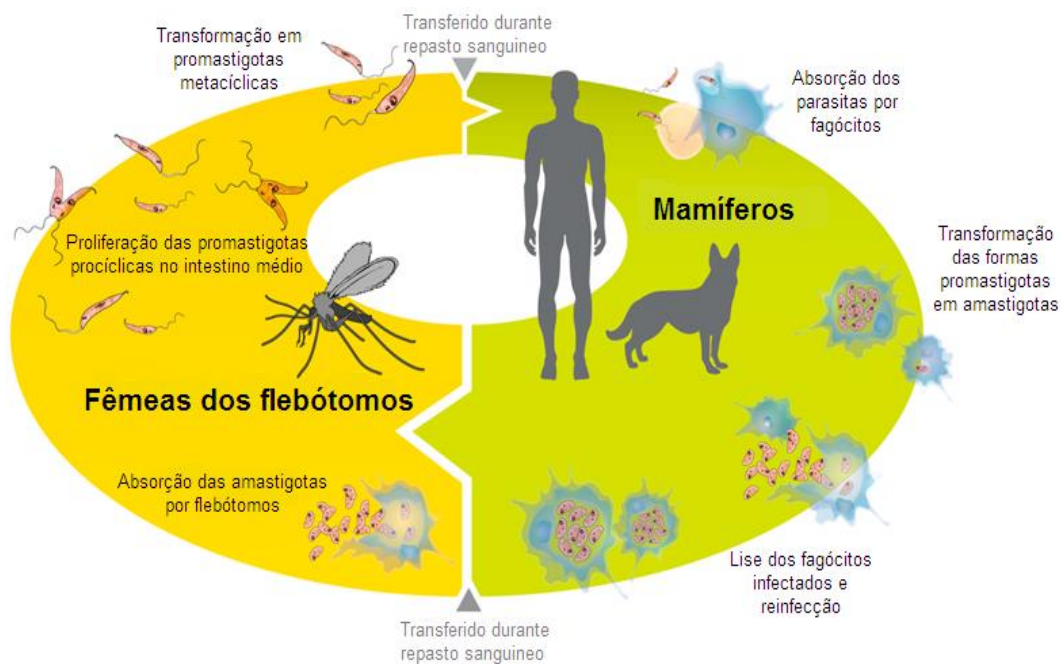


Figura 2. Ciclo biológico da *Leishmania*. O ciclo da leishmaniose se inicia quando flebotomíneos fêmeas infectadas transferem os parasitos flagelados durante o repasto sanguíneo. Células mononucleares fagocitam e durante a replicação parasitária, rompem sua membrana e liberam os parasitos que podem reinvadir novas células e dar continuidade ao seu ciclo de vida. Fonte: Adaptado de Veras e Menezes, 2016.

1.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS NA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA*

As células dendríticas são células apresentadoras profissionais de antígeno (APCs) que estão presentes em todo o corpo, incluindo órgãos de filtração e órgãos linfoides. Precusores de células dendríticas localizadas na medula óssea induzem a liberação de células à circulação e consequentemente migram para o tecido. No tecido, estas células estão no estado imaturo e tem propriedades fagocíticas (BANCHERAU et al., 2000). As células imaturas, ao capturarem e processarem antígenos, tendem a migrar para o linfonodo para apresentar antígenos a linfócitos T (BARRAGAN et al, 2012). Durante a migração, as células dendríticas passam pelo processo de maturação, caracterizado pelo aumento na expressão de MHC-classe I e II e CD11c, CD86 e CD80 (CAUX et al., 1994). O mecanismo de maturação é desencadeado por distúrbios na homeostase tecidual através da detecção de PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) ou DAMPs (padrões moleculares associados a danos), que permitem que as células dendríticas migrem para regiões que abriguem linfócitos T (Figura 3) (HAWIGER et al., 2001; STEIMAN et al., 2003;

CERBONI et al., 2013). Durante a maturação, as células dendríticas perdem sua capacidade adesiva, aumentam sua motilidade e reorganizam a actina (WINZLER et al., 1997), além de expressar altos níveis do receptor de quimiocina CCR7, fundamental para a interação entre células dendríticas e linfócitos durante a apresentação de antígenos (FOSTER et al., 1999; OHL et al., 2004).

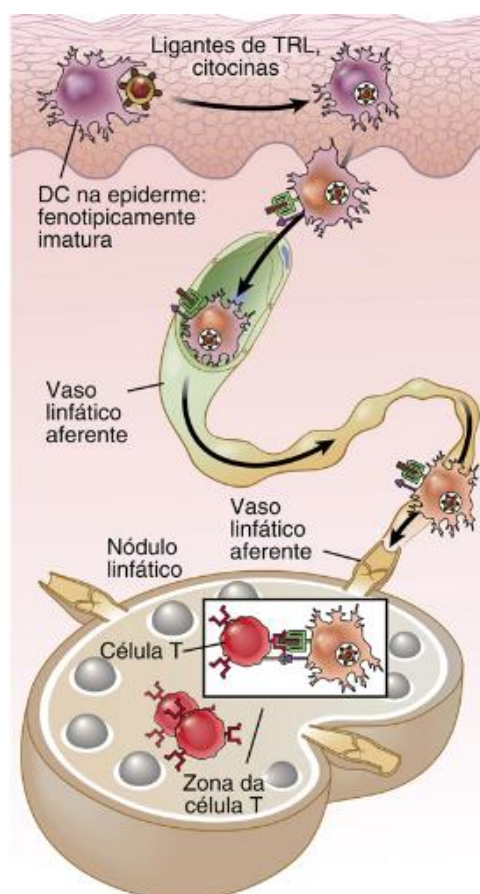


Figura 3. Célula dendrítica e apresentação de antígenos. As células dendríticas têm papel crucial no sistema imunológico. Ao fagocitarem patógenos, iniciam o processamento, migração e apresentação de antígenos a linfócitos T. Fonte: Abbas, Lichtman e Pillai, 2015.

Estudos anteriores demonstraram que células dendríticas infectadas por *Leishmania major* *in vivo* migram para os linfonodos drenantes para a apresentação de antígenos a linfócitos T (MOLL et al., 1993). Adicionalmente, foi mostrado que os receptores do tipo Toll tem um papel crucial na sentinela imunológica das células dendríticas (KAWASAKI et al., 2014), sendo o elemento central no estabelecimento

da homeostase imunológica, e dentre todos os tipos, TLR2, TLR4 e TLR9 são descritos como participantes da interação célula dendrítica-*Leishmania*.

Trabalhos publicados anteriormente demonstraram que a infecção por *L. major* em camundongos resistentes ou susceptíveis alteram as funções das células dendríticas (GIRARD-MADOUX et al., 2008 & SUZUE et al., 2015). Os dados da literatura mostram ainda que a infecção por *L. major* é capaz de inibir a resposta imune Th1 através de alteração das funções destas células. Adicionalmente, Baldwin e colaboradores (2003) mostraram que camundongos Balb/c infectados por *L. major* apresentam um número aumentado de células dendríticas plasmocitóides nos linfonodos drenantes (BALDWIN et al., 2003). Além disso, foi demonstrado que células dendríticas derivadas de monócitos são importantes para estabelecimento de uma resposta imune eficiente contra *Leishmania* (D. ASHOK & H. ACHA-ORBEA, 2014). Trabalhos anteriores demonstraram ainda que em estágios iniciais da infecção por *L. amazonensis* em modelo murino Balb/c ou em modelo humano, esta infecção pode prejudicar funções imunológicas levando a uma supressão de linfócitos T (FAVALI et al, 2007; SOONG, 2008).

1.4 MIGRAÇÃO CELULAR

A migração de fagócitos é um processo chave para uma variedade de funções fisiológicas como a homeostase, resposta a patógenos, gastrulação, desenvolvimento do sistema nervoso, morfogênese embrionária, além de contribuir para o reparo tecidual e regeneração. Não obstante, este mecanismo também está relacionado a uma desregulação de processos patológicos como inflamação e metástase em casos de câncer, onde a migração, invasão e adesão são fundamentais (WIESNER et al., 2014; RIDLEY et al., 2003; PIJUAN et al., 2019; STUELLEN et al., 2018; MAYOR et al., 2018). De forma geral, a migração é um processo fundamental para a manutenção da organização de organismos multicelulares, e permanece recorrente em aspectos fisiológicos ou patológicos. Durante um processo inflamatório, leucócitos têm a capacidade de migrar para o sítio da lesão, onde iniciam a resposta imune (LAUFFENBURGEN, 1996).

1.4.1 Etapas da migração celular

O processo de migração envolve diversos eventos moleculares integrados, sendo mediada principalmente por filamentos de actina no citoplasma e formação de complexos de adesão (VÉROLLET et al., 2011). Para que a célula migre, é necessário que ocorram modificações no corpo celular como: protrusão, na qual a membrana plasmática é empurrada para frente na face anterior da célula; ligação, na qual o citoesqueleto de actina se liga ao substrato; e, posteriormente, a tração, no qual a célula desprende sua parte posterior e todo seu corpo é tracionado para a frente (Figura 4) (WIESNER et al., 2014).

Durante este processo, a protusão da membrana plasmática deve se formar e se estabilizar ao ancorar-se ao substrato e diferentes receptores, como as integrinas, os quais são a maior família de receptores que participam da migração, apoiam a adesão da célula à matriz extracelular através de adaptadores dos filamentos de actina (RIDLEY et al., 2003). Nesta primeira fase de protusão, a célula gera forças através da polimerização de actina, que torna possível o impulsionamento da célula para frente. Durante essa fase, algumas modificações na projeção da célula são formadas, conhecidamente como lamelipódios e filopódios. Nestas estruturas, encontramos densos feixes de actina filamentosa organizados de maneiras diferentes. Os filopódios são estruturas unidimensionais longas e finas, semelhantes a microvilosidades e os lamelipódios são bidimensionais contendo uma rede de actina filamentosa. Essa organização fornece a célula uma conjuntura adequada para realização da migração de maneira eficaz (TANG e GERLACH, 2017).

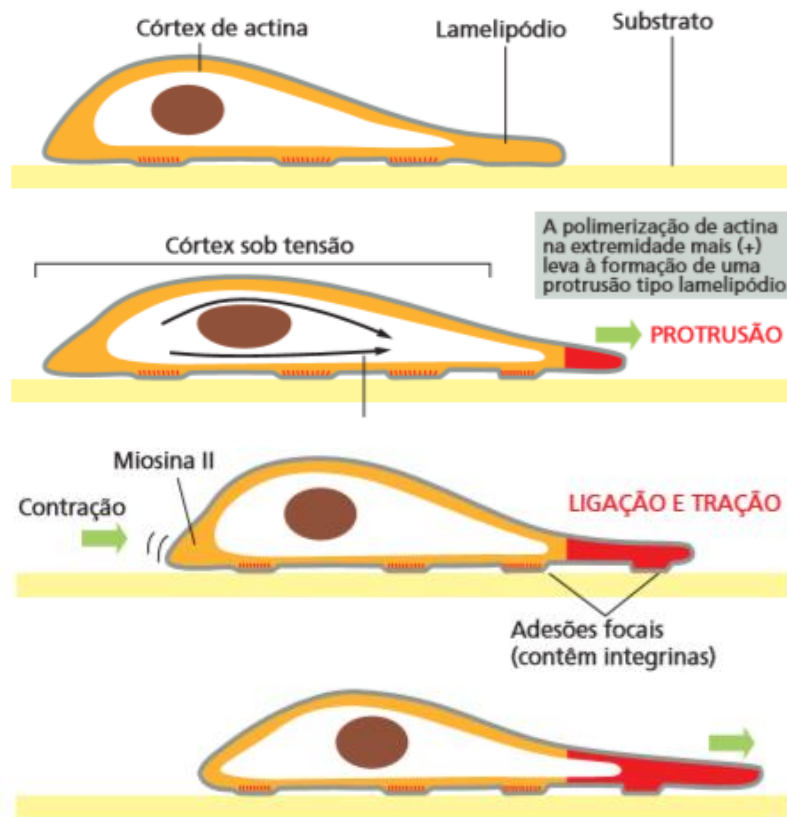


Figura 4. Etapas da migração celular. O movimento celular é dividido em etapas: formação da protrusão de membrana; adesão ao substrato; contração e desprendimento da parte posterior. Fonte: Alberts, 2015.

1.4.2 Complexo de adesão

A migração de células envolve a interação e adesão da célula ao substrato por estruturas conhecidas como contatos focais ou adesões focais (JONES, 2000). Nos complexos de adesão, paxilina se associa a diversas proteínas de sinalização, incluindo FAK e outras cinases (Figura 5). Estudos anteriores descreveram que as proteínas de adesão focal eram limitadas a proteínas estruturais como vinculina e talina, que mediavam a interação entre a actina e a integrina (BURRIDGE, et al, 1988). No entanto, com o passar dos anos, foi descoberta a grande complexidade dos domínios do complexo de adesão, sendo que, atualmente, cerca de 125 proteínas compreendem adesões focais (TURNER et al., 2000).

Estudo realizado anteriormente demonstrou que a inibição da interação FAK-paxilina resulta em uma diminuição da capacidade de adesão, invasão e migração em fibroblastos (DEREMAUDT, et al, 2014). A proteína FAK funciona como um fator de regulação da montagem e desmontagem da adesão focal durante o movimento celular, no entanto, os mecanismos de regulação ainda são pouco compreendidos (ZAIDEL-BAR et, al, 2007). As moléculas FAK agregadas fazem a fosforilação umas das outras em tirosinas específicas, criando um sítio de encaixe para os membros da família Src de tirosinas-quinase citoplasmáticas. Essas cinases fosforilam as FAKs em tirosinas adicionais, criando sítios de encaixe para inúmeras proteínas sinalizadoras intracelulares (HU et al., 2017).

Uma vez que os domínios citoplasmáticos da integrina não possuem atividade enzimática intrínseca é necessário o recrutamento de uma variedade de proteínas ou contatos de adesão, para que haja o direcionamento e condução da força necessária para a migração celular. A regulação dinâmica das adesões mediadas pela integrina é importante para a migração celular nos processos fisiológicos e patológicos (TURNER et al., 2008)

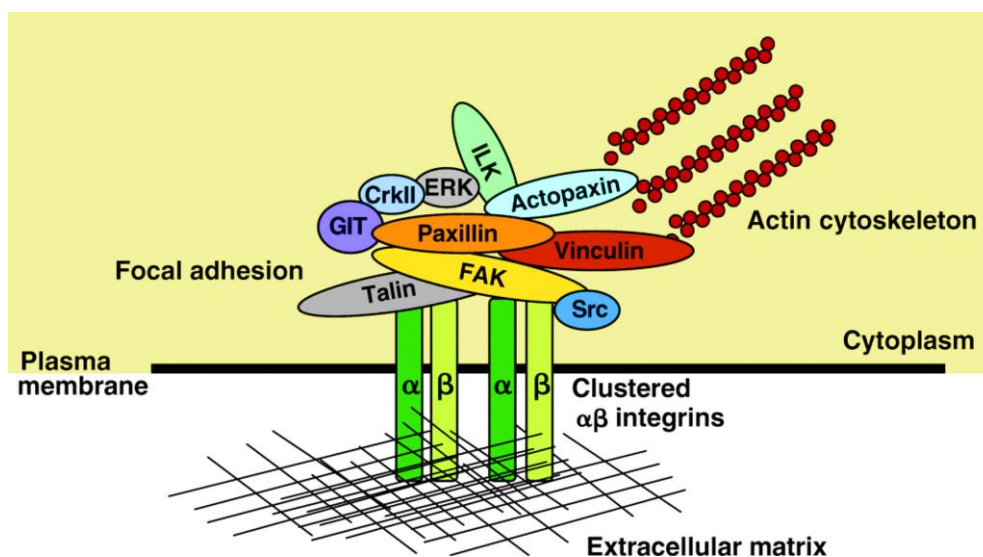


Figura 5. Complexo de adesão. Proteínas como FAK e paxilina formam o complexo de adesão, onde juntas, ancoram filamentos de actina à integrinas transmembrana. Fonte: Turner & Deakin, 2008.

1.4.3 Citoesqueleto de actina

Para que as células realizem suas funções com eficiência, elas precisam de uma estrutura interna devidamente organizada. Altamente dinâmico e adaptável, o citoesqueleto confere a célula estrutura e componentes essenciais à motilidade orientada, como a disposição dos filamentos de actina, bastante importantes para a vida da célula, bem como sua migração (TANG et al., 2017; ROSSIER et al., 2010).

A reorganização do citoesqueleto acontece muito rapidamente, a exemplo da participação do mesmo no processo de divisão celular ou durante uma resposta a patógenos, a exemplo de neutrófilos durante a fagocitose bacteriana, que ao encontrarem o determinado patógeno, seguem com a emissão de protusões citoplasmáticas contendo actina filamentosa (F-actina) recém-sintetizada e tendem a reorganizar essas estruturas em segundos, caso o patógeno tente evadir ao mecanismo fagocítico (WEIDNER et al., 1999; YANO et al., 2015).

A actina é um polímero construído a partir de pequenas subunidades, conservada evolutivamente e que se acopla reversivelmente em filamentos, fazendo parte de um dos três principais componentes do citoesqueleto (SWEENEY & HOLZBAUR 2016). A actina de células eucarióticas é descrita na literatura como possuidora de quatro subdomínios, no qual o ATP se liga principalmente nos subdomínios 3 e 4 e várias proteínas tendem a se ligar nos subdomínios 1 e 3 (DOMINGUEZ et al., 2004). Os filamentos de actina são altamente dinâmicos e sua polimerização ocorre em três etapas fundamentais: a primeira delas é a nucleação onde as subunidades se unem em um agregado inicial, seguido pela fase de alongamento no qual as subunidades são rapidamente adicionadas às extremidades, e por fim, a fase de equilíbrio, onde o crescimento do polímero é equilibrado com a dissociação dos monômeros (HOLMES et al., 1990; EGELMAN et al., 1985).

Durante o processo migratório, a célula projeta sua membrana plasmática na região anterior e retrai sua extremidade posterior, e a formação de adesões focais associado a formação de fibras de estresse da actina requerem a ativação de proteínas da família Rho-GTPases (Figura 6), aos quais se destacam RAC-1, RHO-A e CDC42 (REN et al., 1999). Essas GTPases são conhecidas por seu papel na regulação da dinâmica da actina, muito importante na migração celular, além de controlar a polarização celular, dinâmica célula-célula e tráfego de vesículas (ZEGERS et al., 2014).

As Rho GTPases pertencem a família das Ras, regulada por uma cíclica dinâmica entre o estado ativo ligado ao GTP e inativo ligado ao GDP, e dentre as principais funções reguladas por elas, encaixam-se a formação da protusão e contração da actina citoplasmática (ZEGERS AND PETER, 2014). Durante a migração, protusões citoplasmáticas são formadas e mediadas pelas Rho GTPases: Os filopódios são essencialmente controlados por CDC42 que nucleam e alongam os filamentos de actina além de controlar também a polarização celular (POLLARD et al., 2003); Rac-1 regula a rede de actina na borda celular induzindo sua polimerização e apoia a adesão da integrina à matriz extracelular, além de estabilizar mecanicamente os lamelipódios (WU et al., 2009); Rho-A controla a retração da parte posterior, e durante o processo migratório, as células tendem a apresentar uma alta atividade de Rho associada a uma força de tração maior (TAMBE et al., 2011).

A Rho-GTP possui um conjunto de alvos bastante distinto. Esta GTPase ativa a proteína formina levando à formação de feixes paralelos de actina, inibe a atividade de cofilina, resultando em estabilização do filamento de actina. A célula pode usar a via Rac para construir uma nova estrutura de actina e, subsequentemente, ativa a via Rho para gerar contratibilidade que gera tensão sobre essa estrutura e facilita o processo migratório (RIKITAKE et al., 2011).

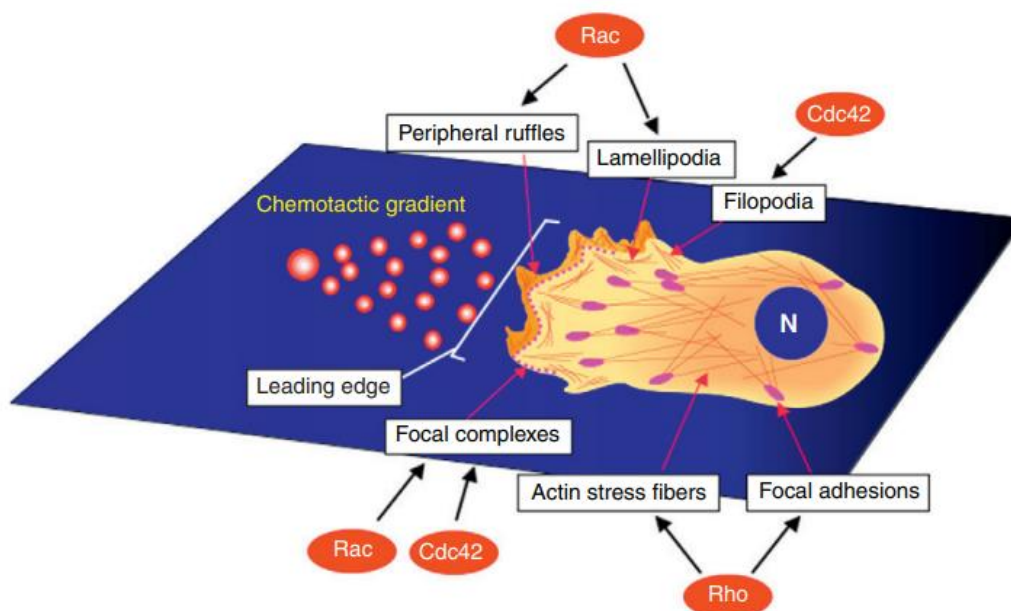


Figura 6. Rho GTPases na migração celular. A família das Rho GTPases regulam a polimerização de actina. Rac1 regula a formação de lamelipódios e complexos focais; Cdc42 regula a formação de filopódios e complexos focais e Rho regula formação de fibras de estresse e adesões focais na parte posterior da célula. Fonte: Rikitake et al., 2011.

1.5 MIGRAÇÃO CELULAR NA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA*

Leishmania são parasitos que se desenvolvem e completam seu ciclo de vida em macrófagos, células dendríticas ou monócitos (DESJEAUX, 2004). O processo de migração das células infectadas é um mecanismo chave para entender a disseminação da doença. Dados da literatura mostram que patógenos são capazes de modular a adesão e migração da célula hospedeira, a exemplo de uma inibição transitória da adesão e migração de macrófagos induzida pela infecção por *Toxoplasma gondii* (DA GAMA et al., 2004). Até a atualidade, estudos tentam descrever o processo de migração da célula hospedeira no contexto da infecção por *Leishmania*, no entanto, ainda se conhece pouco sobre isso. Trabalho publicado anteriormente mostrou que a infecção por *Leishmania* reduz a adesão de macrófagos e altera a função de moléculas envolvidas em adesão, como VLA-4, uma das moléculas relevantes para a migração de macrófagos nos tecidos (CARVALHAL et al., 2004; PINHEIRO et al., 2006).

Adicionalmente, outros estudos mostram a redução da migração de macrófagos após a infecção por *Leishmania*, onde macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania mexicana* e *Leishmania enriettii* têm migração reduzida quando em comparação com macrófagos não infectados (BLEWETT et al., 1971; BRAY et al., 1983). Trabalho publicado recentemente por Menezes e colaboradores (2016) mostrou que a infecção por *L. amazonensis* reduz a migração de macrófagos em ambiente bidimensional. Os autores mostraram uma redução da formação de complexos de adesão nestas células e que este efeito independe da carga parasitária no interior da célula hospedeira, da expansão do vacúolo parasitóforo e de fatores solúveis liberados pelas células infectadas, mas envolve a modulação da expressão de paxilina e sua fosforilação, além da fosforilação e atividade de FAK. Os autores mostraram ainda que existe um aumento na frequência de polimerização e *turnover* de filamentos de actina da célula hospedeira após a infecção por *L. amazonensis* (MENEZES et al., 2016). No entanto, ainda é necessário estudos aprofundados acerca da migração de fagócitos infectados por *Leishmania* e sua disseminação.

1.5.1 Migração de células dendríticas na infecção por *Leishmania*

A migração de células dendríticas para linfonodos é coordenada por sinais de recrutamento que envolvem ligações de quimiocinas específicas a seus respectivos receptores de membrana (TIBERIO et al., 2018). Receptores de quimiocinas são proteínas transmembrana associadas a proteína G, cuja ativação desencadeia vias de sinalização responsáveis pelo recrutamento das células (HUGHES & NIBBS, 2018). Células dendríticas imaturas expressam CCR2, CCR5, CCR6 e, após ativação e maturação, estas células passam a expressar de CCR7, favorecendo sua migração para linfonodos drenantes (OHL et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2006).

Trabalhos anteriores demonstraram que *L. amazonensis* pode reduzir a migração de células dendríticas em modelo murino (HERMIDA et al., 2014) e que o bloqueio de moléculas de adesão pode levar à redução da migração destas células após a infecção por *L. major* (BALLET et al., 2014). Em contrapartida, estudos anteriores demonstraram que a infecção por *L. major* modula a expressão de receptores de quimiocinas aprimorando a migração das células em resposta ao CCL21 (STEIGARD & MOLL, 2005).

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica a leishmaniose como uma das mais importantes doenças tropicais negligenciadas. A doença é endêmica em quase todos os continentes, exceto Oceania, estimando-se que 12 milhões de indivíduos estejam infectados por *Leishmania* e que 350 milhões de indivíduos corram risco de serem infectados (WHO, 2017). A OMS estima ainda que a incidência anual de leishmaniose varia de 1,5 a 2 milhões de novos casos por ano, sendo que destes apenas 600.000 são oficialmente declarados (ALVAR et al., 2012).

Durante o ciclo de vida da *Leishmania*, os parasitos interagem com uma diversidade de tipos celulares, entretanto, pode-se destacar macrófagos e células dendríticas (GREGORY et al., 2005). Estudos recentes demonstraram que a infecção por *Leishmania* reduz a migração de macrófagos, associado a uma redução da formação de complexos de adesão nestas células (DE MENEZES et al., 2016). Entretanto, pouco se sabe sobre o papel destas células na disseminação da doença no hospedeiro vertebrado.

Células dendríticas são células apresentadoras profissionais de antígeno, sendo responsáveis pelo processamento e apresentação de antígenos à linfócitos T naive. Adicionalmente, a migração de células dendríticas para o linfonodo inicia a resposta imune e, associado a isso, estudos mostram o papel importante das DC na geração da resposta imune na leishmaniose (VONN STEBUT et al., 1998; GORAK et al., 1998).

Sabe-se que diferentes patógenos são capazes de modular a migração de células dendríticas (KANATANI et al., 2017; WILLIAMS et al., 2014). Trabalhos recentes mostram que a infecção de células dendríticas por *Salmonella typhimurium* é capaz de reduzir a migração destas células através de mecanismos de bloqueio de proteínas efetoras particulares (Ssel) (MONACK et al., 2009) e que a infecção por *Toxoplasma gondii* é capaz de aumentar a migração destas células (OLAFSSON et al., 2018). Adicionalmente, trabalhos publicados demonstraram que a infecção por *Leishmania* é capaz de alterar a migração de células dendríticas, onde células de modelo murino infectadas por *Leishmania amazonensis* tem sua capacidade migratória reduzida (Hermida et al, 2014). Outros trabalhos, no entanto, avaliaram o perfil migratório destas células após infecção por *Leishmania major* também em modelo murino e foi observado um aumento da capacidade motora destas células, evidenciando a necessidade de estudos mais aprofundados acerca do processo de disseminação do parasito e sua relação com as diferentes espécies de *Leishmania* (Moll et al, 2005).

Na leishmaniose, a relação entre disseminação do parasito e a gravidade da doença é particularmente estreita. Estudos para melhor entender o processo de migração de células hospedeiras infectadas e sua relação com a disseminação da doença são fundamentais para a concepção de novas estratégias para terapêutica e prevenção do desenvolvimento de formas graves e desfigurantes da leishmaniose. Deste modo, o presente trabalho visa compreender o processo de migração de células dendríticas e como isto pode contribuir para a disseminação do parasito no hospedeiro. Nossa hipótese é que a infecção por *Leishmania* aumenta a migração de células dendríticas humanas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a migração de células dendríticas infectadas por *Leishmania* e os mecanismos envolvidos neste processo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Avaliar a migração direcional de células dendríticas infectadas por diferentes espécies de *Leishmania* utilizando quimioatrator;
- ❖ Avaliar a formação de complexos de adesão em células dendríticas infectadas por diferentes espécies de *Leishmania*;
- ❖ Avaliar a dinâmica do citoesqueleto de actina em células dendríticas infectadas por diferentes espécies de *Leishmania*;
- ❖ Avaliar a expressão de CCR7 em células dendríticas infectadas por diferentes espécies de *Leishmania*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COMITÊ DE ÉTICA

O projeto está de acordo com os princípios de ética na pesquisa adotado pela Resolução CNS 466/12 II.4 e foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisas (CEP) do IGM, conforme parecer de número 2.751.345.

4.2 SEPARAÇÃO DE PBMC E CULTIVO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

Células mononucleares do sangue periférico de doadores saudáveis foram obtidas por separação de PBMC (células polimorfonucleares de sangue periférico) em Ficoll-Hystopaque (Sigma- Aldrich). Monócitos foram separados utilizando coluna magnética (MACS Mylteni Biotec) para isolamento de células CD14+, que então foram ressuspensas e plaqueadas em RPMI com GM-CSF [50ng/mL] + IL-4 [100UI/mL] (Peprotech) por 7 dias para diferenciação em células dendríticas.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS

As células dendríticas humanas diferenciadas foram distribuídas em tubos de citometria e submetidas a marcação com mix de anticorpos para CD11c (Biolegend), através de incubação no gelo por 30 minutos sob proteção da luz. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com 1mL de stain buffer gelado (2% SBF em PBS 1X) e centrifugadas a 300 x g por 10 minutos a 4°C. Por fim, o sobrenadante foi aspirado, o pellet ressuspensionado em 200µL de stain buffer gelado e as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (BD FACS DIVA).

4.4 CULTIVO DE PARASITOS

Parasitos de *L. amazonensis* (MHOM/BR88/Ba-125), *L. braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) e *L. infantum* (MCAN/BR/89/BA262) derivados de amastigotas isoladas de linfonodo da pata de camundongos C57BL/6 foram mantidos em meio ágar-sangue NNN em estufa B.O.D. a 24°C. Os isolados de *L. braziliensis* de paciente com a forma localizada (LCL) ou disseminada da doença (LD), oriundos de Corte de Pedra – BA, foram cedidos pelo grupo de Edgar Carvalho. Após a cultura atingir a fase estacionária de crescimento, os parasitos foram utilizados para realização dos experimentos até a 7ª passagem.

4.5 INFECÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E DETERMINAÇÃO DA TAXA DE INFECÇÃO

Para realização determinação da taxa de infecção e carga parasitária, as células dendríticas foram obtidas e plaqueadas em quadruplicata em placas de 24 poços, na concentração de 2×10^5 /poço, e infectadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* na proporção de 10:1 e *L. infantum* na proporção de 20:1 por 4 horas. Em seguida, as células dendríticas foram expostas aos parasitos por 0, 6, 24 e 48 horas a fim de obter a taxa de infecção e carga parasitária e, posteriormente, fixadas com PFA 4%, citocentrifugadas e coradas com DAPI (Invitrogen) para marcação nuclear das células e dos parasitos. Um total de 400 células foram contadas por grupo de forma randomizada por microscopia de fluorescência convencional (Microscópio Olympus).

Para realização dos ensaios de migração e imunofluorescência, um total de 2×10^5 de células dendríticas foram plaqueadas em placas de 24 poços e infectadas por *L. amazonensis* na proporção 10:1, *L. braziliensis* 10:1, *L. infantum* 20:1 por 4 horas. Adicionalmente, para os ensaios de migração, um grupo de células foi incubado com zymosan A de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma Aldrich) como controle, na proporção 10:1 ou 20:1 por 4 horas a 37°C e 5% CO₂. As células foram então lavadas e reincubadas por adicionais 6, 12, 24 ou 48 horas para os ensaios de migração e 48 horas para os ensaios de imunofluorescência.

4.6 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR DIFERENTES ESPÉCIES DE *LEISHMANIA*

A avaliação da migração direcional de células dendríticas infectadas ou não por diferentes espécies de *Leishmania* e isolados de *L. braziliensis* ou incubadas com zymosan foi avaliada na presença de CCL3, utilizando câmaras Transwell com membranas de policarbonato (24 poços, 5µm Corning® Transwell® *polycarbonate membrane cell culture inserts*). Células infectadas ou não, na concentração de 5×10^4 células foram plaqueadas nos insertos por 4 horas, lavadas com PBS e fixadas com PFA 4%. A parte superior da membrana foi raspada com *swab*, a fim de remover as células que não migraram. Em seguida, as membranas foram removidas do inserto com auxílio de um bisturi. As membranas removidas foram então montadas em lâminas e posteriormente, coradas com DAPI (Invitrogen) para marcação nuclear. Após randomização das lâminas, a análise da migração das células dendríticas foi realizada pela contagem do núcleo de células que atravessaram a membrana do inserto da *transwell* (10 campos randômicos por grupo), com auxílio de microscopia de fluorescência (Olympus).

4.7 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE ADESÃO EM CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR *LEISHMANIA*

Células dendríticas infectadas ou não por diferentes espécies de *Leishmania* e isolados de *L. braziliensis* foram lavadas com PBS 1x, fixadas com PFA 4% por 15 minutos e submetidas a citospin. As células foram incubadas com NH₄CL₂ [15 mM]

por 20 minutos, lavadas 3 vezes com PBS 1x, incubadas com solução de bloqueio (3% bovine serum albumin [BSA] em PBS 1x por 1 hora, lavadas 3 vezes com PBS 1x, permeabilizada com PBS-Saponina 0.15% por 15 min e incubadas com anti-p-paxilina 1:100 ou anti-p-FAK 1:500 (pY¹¹⁸) (Invitrogen) por 1 hora. Posteriormente, as células foram lavadas 3x com PBS 1x, e incubadas com anti-rabbit Alexa Fluor 552 (Molecular Probes) por 45 minutos. As lamínulas foram lavadas com PBS 1x e incubadas com DAPI Prolong Gold Antifade (Invitrogen) [10 mg/mL] para marcação nuclear. As imagens foram adquiridas através do microscópio confocal (Leica SP8) e a intensidade de fluorescência das imagens foi quantificada por software FIJI, em um total de 30 células por grupo.

4.8 AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DO CITOESQUELETO DE ACTINA EM CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR *LEISHMANIA*

Células dendríticas infectadas ou não por *Leishmania* e isolados de *L. braziliensis* foram lavadas com PBS, fixadas com PFA 4% por 15 minutos e submetidas a citospin. As células foram incubadas com NH₄CL₂ [15 mM] por 20 minutos, lavadas 3 vezes com PBS 1x, incubadas com solução de bloqueio (3% BSA em PBS por 1 hora, lavadas 3 vezes com PBS 1x, permeabilizada com PBS-Saponina 0.15% por 15 minutos e incubadas com anti-Rac-1, anti-RhoA, anti-Cdc42 (Invitrogen) por 1 hora. Posteriormente, as células foram lavadas 3x com PBS 1x, e incubadas com anti-rabbit Alexa Fluor 552 ou anti-mouse Alexa Fluor 552 (ambos da Molecular Probes) e Faloidina (Invitrogen) por 45 minutos. As lamínulas foram lavadas com PBS 1x e incubadas com DAPI Prolong Gold Antifade (Invitrogen) [10 mg/mL] para marcação nuclear. As lamínulas foram lavadas com PBS 1x e incubadas com DAPI Prolong Gold Antifade (Invitrogen) (10 mg/mL) para marcação nuclear. As imagens foram adquiridas através do microscópio confocal (Leica SP8) e um total de 30 células foram quantificadas por software FIJI.

4.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CCR7 EM CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR *LEISHMANIA*

Células dendríticas humanas foram obtidas como descrito anteriormente. As células infectadas ou não, na concentração de 5×10^5 , foram distribuídas em tubos de citometria e submetidas a marcação com mix de anticorpos para CD11c (Violet Brilliant Biolegend) e anti-CCR7 (FITC Biolegend), incubadas no gelo por 30 minutos sob proteção da luz. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com 1mL de *stain buffer* gelado (2% SBF em PBS 1X) e centrifugadas a $300 \times g$ por 10 minutos a 4°C . Posteriormente, o sobrenadante foi aspirado, o pellet ressuspendido em $200\mu\text{L}$ de *stain buffer* gelado, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (BD FACS DIVA) e as análises foram feitas com auxílio do software FlowJo v7.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa GraphPad Prism 5.0 foi utilizado para a realização das análises estatísticas. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade, Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk e D'Agostino e Person, para determinação do uso de testes paramétricos ou não paramétricos. Os experimentos de migração, complexo de adesão e dinâmica de actina foram repetidos três vezes, os dados analisados por teste *t* student e os dados obtidos foram representados como média \pm desvio padrão (SD). O ensaio da avaliação da expressão de CCR7 foi feito uma única vez, os dados analisados por Mann-Whitney e representados por mediana. O ensaio da taxa de infecção foi realizado apenas uma vez e analisado por teste *t* student e representado como média \pm desvio padrão (SD). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando o valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS

Inicialmente, com o objetivo de verificar a fenotipagem das células humanas separadas após a diferenciação com GM-CSF e IL-4, realizamos ensaio de caracterização da população destas células. Para isso, foi avaliado a expressão do marcador de superfície CD11c (BV 605 Biolegend) para células dendríticas humanas

por citometria de fluxo. A expressão do marcador foi positivamente equivalente a população de células dendríticas (Figura 7).

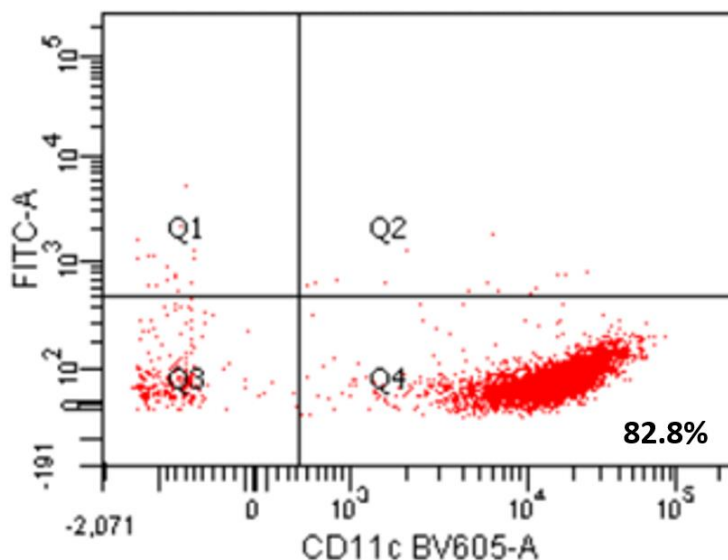
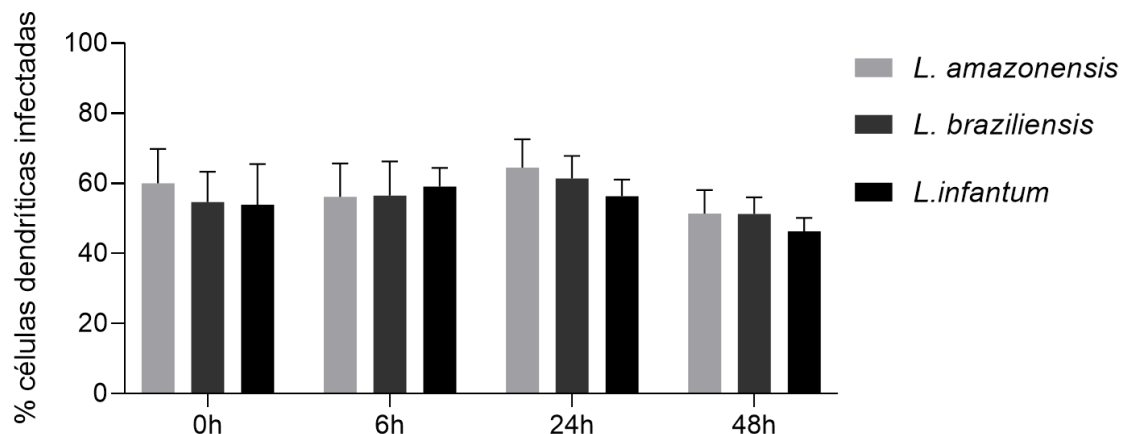


Figura 7. Caracterização da população de células dendríticas humanas. Células dendríticas obtidas após 7 dias de cultivo em presença de GM-CSF e IL-4 foram analisadas por citometria de fluxo. Neste experimento, foi avaliada a expressão do marcador de superfície CD11c. No quadrante 4 (Q4) é demonstrado a porcentagem de células presentes positivas para CD11c. Resultado representativo de 2 experimentos.

5.2 AVALIAÇÃO DA TAXA DE INFECÇÃO

Com o objetivo de padronizar a infecção inicial com as três espécies de parasitos, foi realizado um ensaio para avaliar a taxa de infecção de células dendríticas humanas infectadas por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*. Nossos resultados mostram uma taxa de infecção semelhantes entre os grupos avaliados no tempo 0 após a infecção, nas proporções de 10 parasitos por célula para *L. amazonensis* e *L. braziliensis* e 20 parasitos por célula para *L. infantum*. A média de parasitos por célula nestes grupos foi de 4 a 5 parasitos e o percentual de infecção de 55% (Figura 8).

(a)



(b)

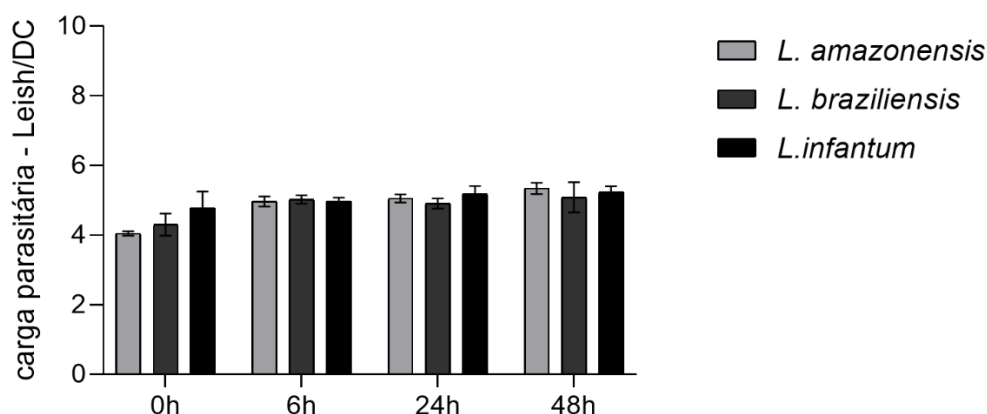


Figura 8. Avaliação da taxa de infecção de células dendríticas infectadas por *Leishmania*. Células dendríticas [2×10^5 /poço] foram infectadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* na proporção de 10:1 e *L. infantum* na proporção de 20:1 por 4 horas. Um total de 400 células foram avaliadas randomicamente por microscopia de fluorescência. **(a)** Percentual de infecção **(b)** Carga parasitária. Análise estatística feita por Shapiro-wilk e Test-t student, não foi observado diferenças estatísticas entre as taxas de infecções e carga parasitária nos respectivos grupos. Resultado representativo de um experimento.

5.3 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR *LEISHMANIA*

Para avaliar a migração de células dendríticas infectadas ou não por *Leishmania*, foram realizados ensaios de migração direcional na presença do quimioatratante específico (CCL3) utilizando câmaras *Transwell* (Figura 9). Os resultados demonstraram que nos tempos de 6, 12, 24 ou 48 horas após a infecção há um aumento na taxa de células migrantes nos grupos infectados por *L. infantum*. Entretanto, foi observada apenas um aumento transitório na migração de células infectadas por *L. amazonensis*, nos tempos de 6 e 12 horas após a infecção e uma redução na migração das células infectadas por *L. braziliensis*, quando comparados com o grupo controle. Adicionalmente, não foi observada alteração entre a taxa de migração dos grupos não infectados e expostos à fagocitose por zymosan (Figura 10).

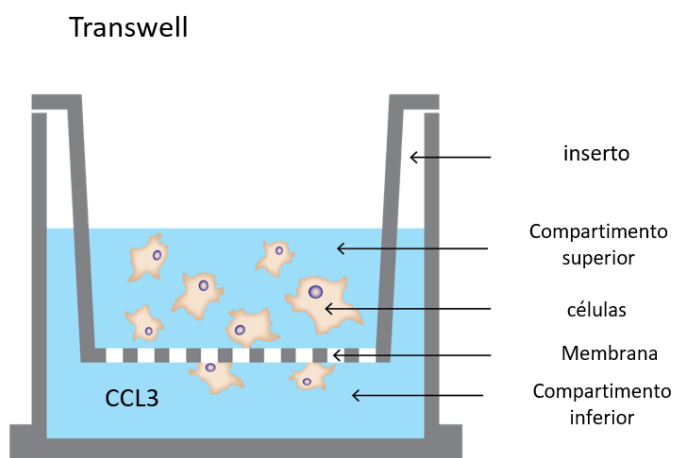


Figura 9. Sistema *Transwell*. Imagem representativa do inserto do sistema, as células são adicionadas na parte superior da membrana e, após incubação, as células que migraram para parte inferior são observadas por microscopia.

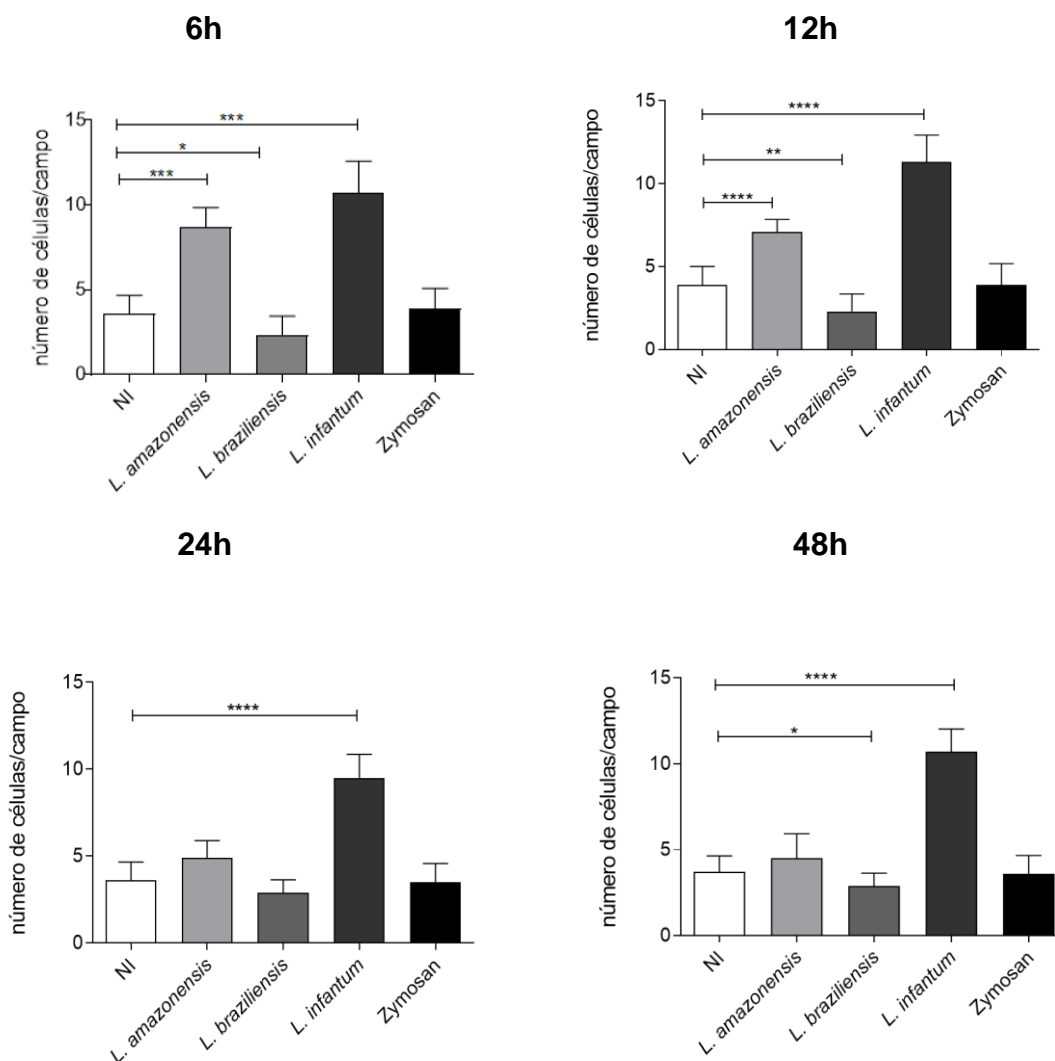


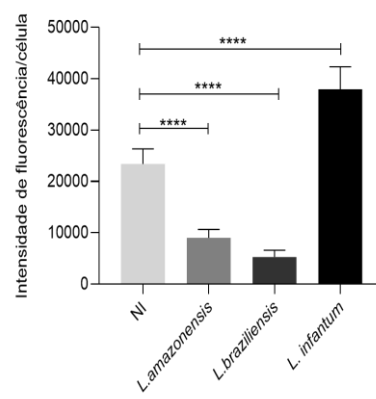
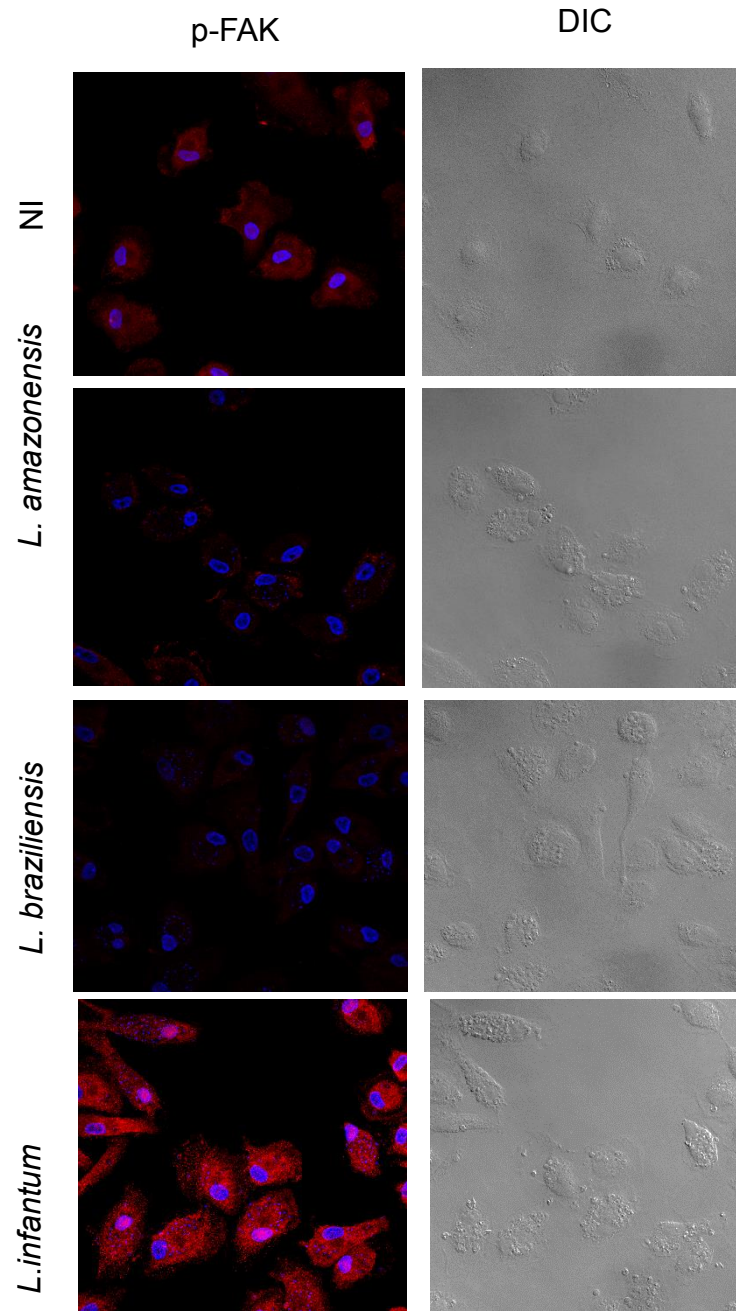
Figura 10. Avaliação da migração de células dendríticas na infecção por *Leishmania*. Células dendríticas foram infectadas por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou *L. infantum* por 4 horas e outro grupo foi exposto a fagocitose por partículas de zymosan FITC (Zy) por 4 horas. Após 6, 12, 24 ou 48h a infecção, as células foram submetidas a migração com CCL3 em sistema *Transwell* por adicionais 4 horas. Os insertos foram lavados e fixados, retirados e corados com DAPI para marcação nuclear. As células migrantes foram contadas (10 campos) aleatoriamente por microscopia de fluorescência. Número de células migrantes 6, 12, 24 ou 48h após infecção. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$, **** $P < 0,001$ (teste de *t* student). Resultado representativo de três experimentos.

5.4 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE ADESÃO EM CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR *LEISHMANIA*

Estudos da literatura demonstraram que o aumento da sinalização de FAK promove a motilidade celular, ao passo que, sua inibição traz como consequência defeitos no

processo de migração (MITRA, et al 2005; YANO, et al, 2004). Para avaliar a formação de complexos de adesão em células dendríticas infectadas por *Leishmania*, foi realizado a imunomarcação para FAK e paxilina fosforiladas e, posteriormente, a quantificação da intensidade de fluorescência com o auxílio do software FIJI. A análise da fluorescência mostra um aumento na expressão de FAK e paxilina fosforiladas em células dendríticas infectadas por *L. infantum* 48h após a infecção. Em contraste, o resultado mostra ainda uma redução na expressão de FAK e paxilina fosforilada após a infecção por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* no mesmo tempo (Figura 11).

(a)



(b)

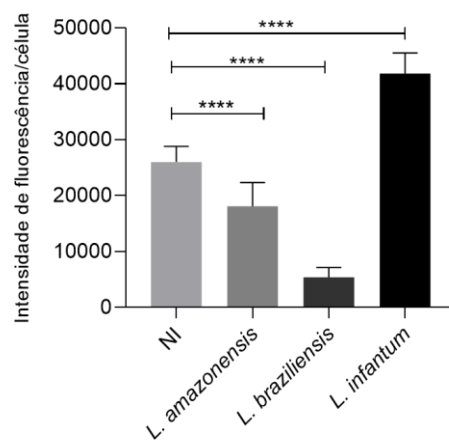
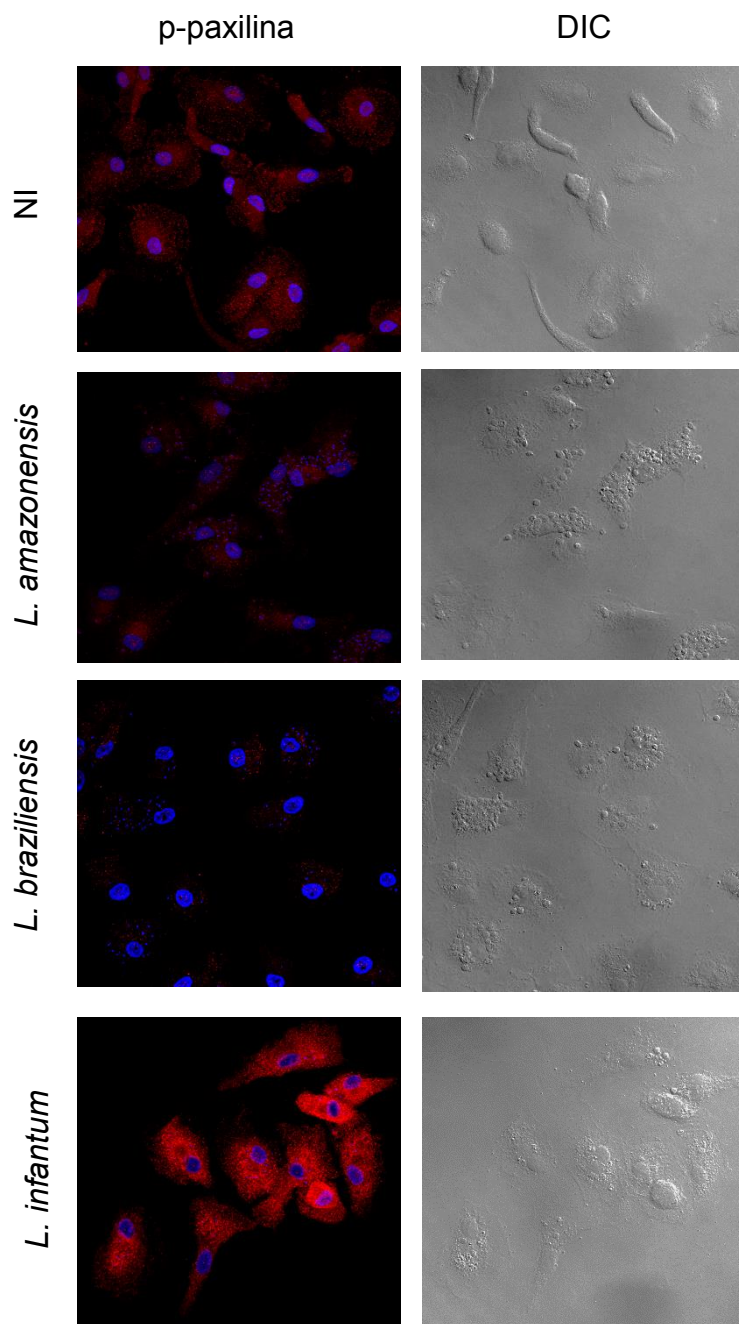
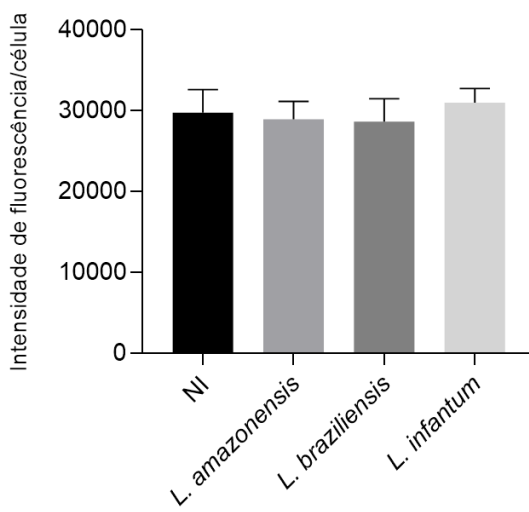
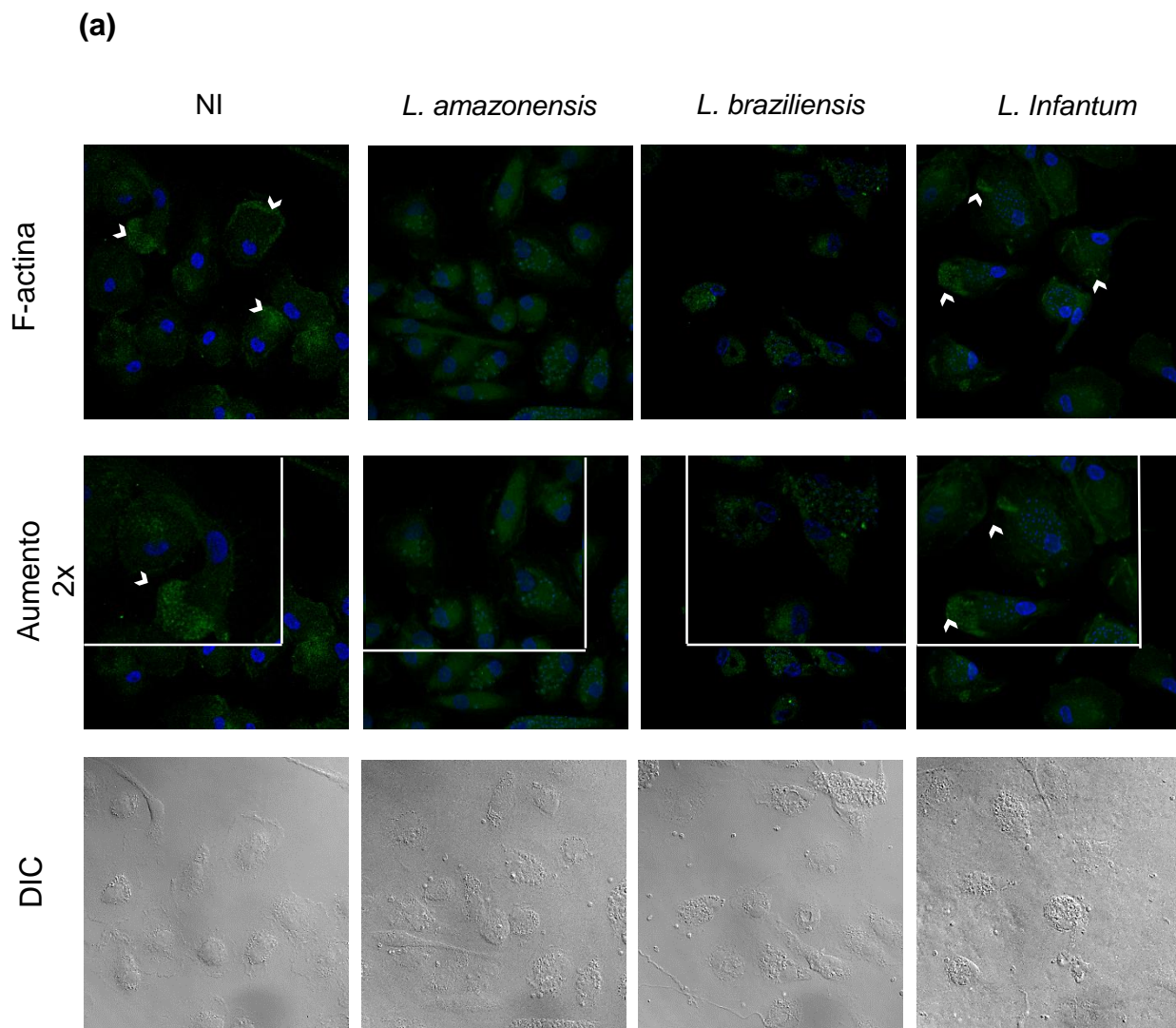


Figura 11. Avaliação da formação de complexos de adesão em células dendríticas infectadas por *Leishmania*. Células dendríticas infectadas ou não por *L. amazonensis* (na proporção de 10:1), *L. braziliensis* (na proporção de 10:1) ou *L. infantum* (na proporção de 20:1) foram marcadas com anticorpo anti-FAK e anti-paxilina fosforiladas. (a) Expressão da intensidade de fluorescência para p-FAK. (b) Expressão da intensidade de fluorescência para p-paxilina. 25 a 30 células para cada grupo foi quantificado utilizando o software FIJI. Vermelho, anti-FAK ou paxilina fosforilada; azul, DAPI; escala de cinza, DIC; NI, não-infectado. ****, $p < 0,001$ (teste *t* de Student). Resultado representativo de 3 experimentos.

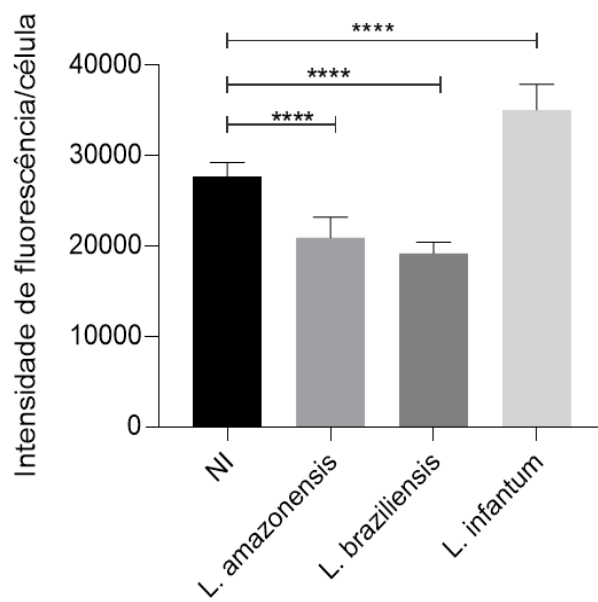
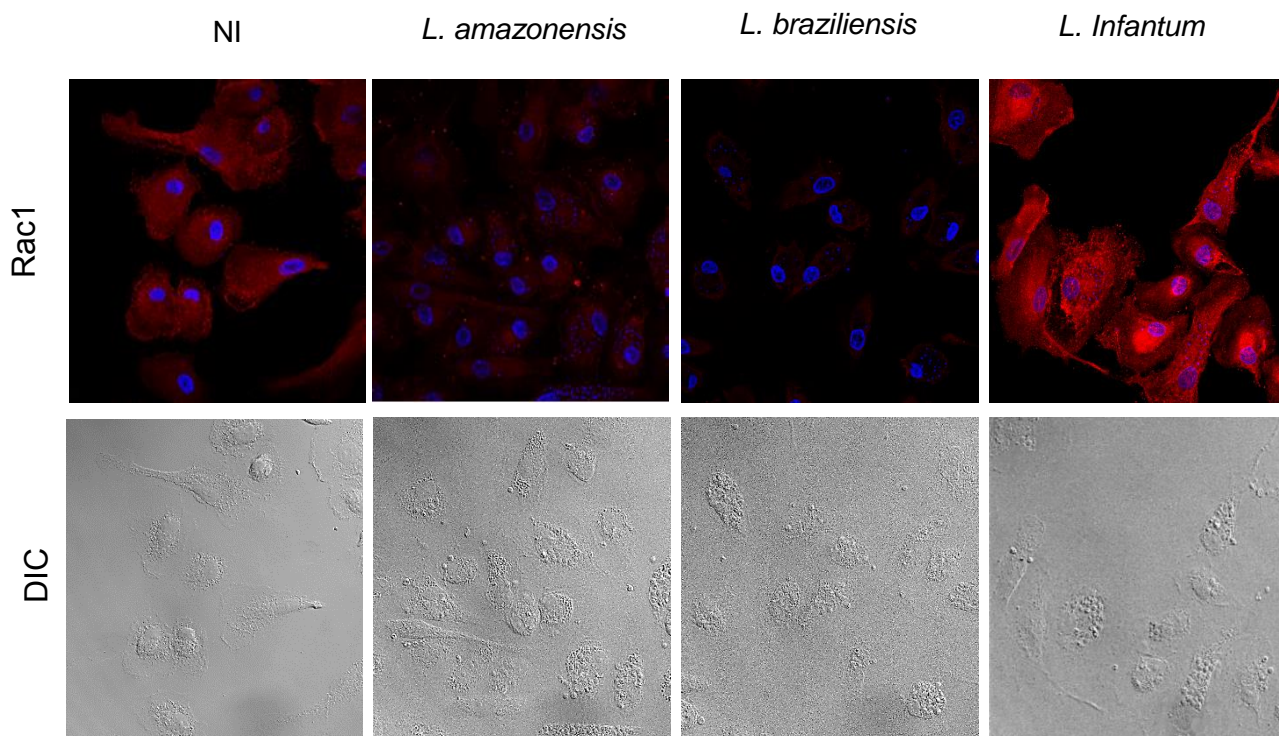
5.5 AVALIAÇÃO DA POLIMERIZAÇÃO DE ACTINA EM CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR *LEISHMANIA*

Para analisar a organização dos filamentos de actina em células dendríticas infectadas por diferentes espécies de *Leishmania*, foi realizada a marcação de actina com faloidina fluorescente e, posteriormente, quantificação da intensidade de fluorescência com o auxílio de um software FIJI. A análise da fluorescência demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos infectados ao comparar com o controle. No entanto, observamos um direcionamento dos feixes de actina polimerizada para a borda celular nos grupos controle e infectado por *L. infantum*, o que não foi observado para as células infectadas por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* (Figura 12a).

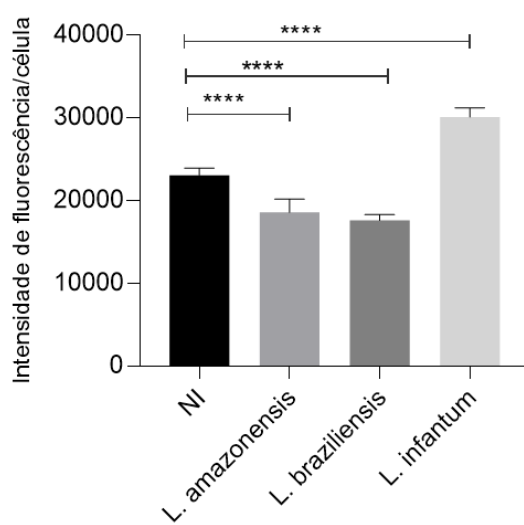
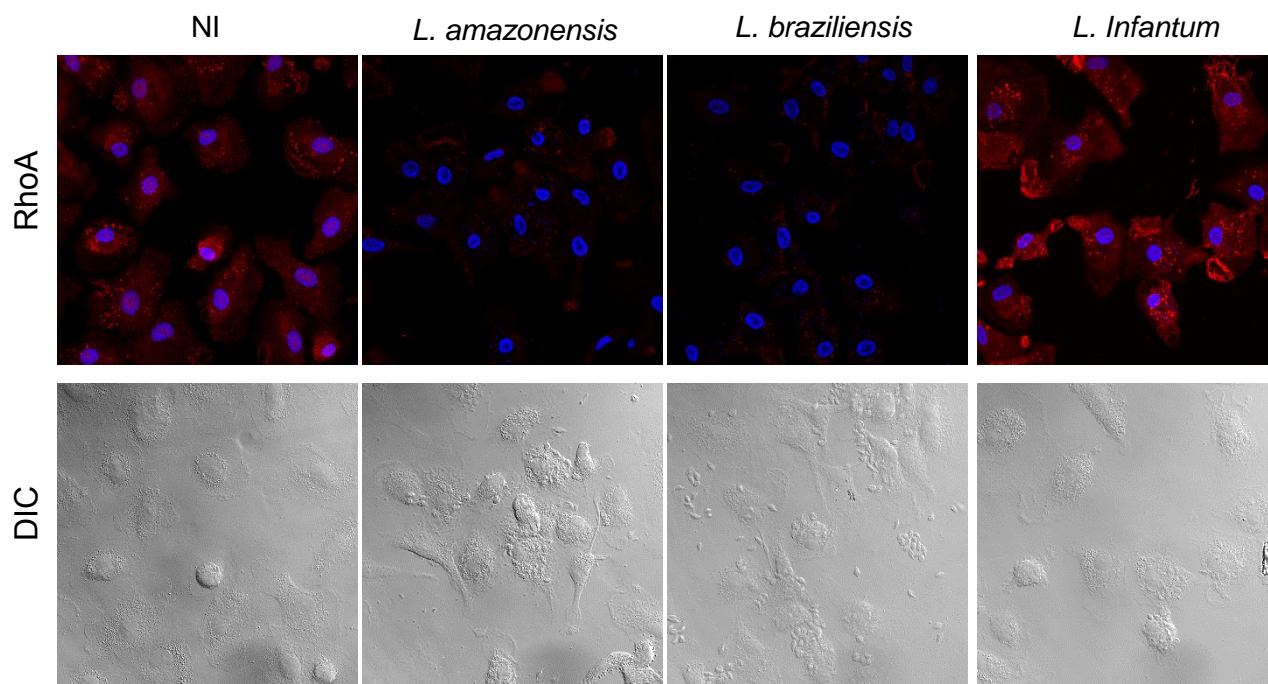
A fim de melhor entender o processo da polimerização da actina citoplasmática em células dendríticas infectadas por *Leishmania*, partimos para avaliar a expressão de proteínas da família Rho GTPases, que juntas, participam da regulação da polimerização do citoesqueleto de actina. Para isso, realizamos imunofluorescência para estas proteínas utilizando anticorpos específicos e quantificamos a intensidade de fluorescência com auxílio do software FIJI. Os resultados destes experimentos sugerem que há um aumento na expressão de Rac1, RhoA e Cdc42 em células dendríticas infectadas por *L. infantum*, quando comparadas ao controle não infectado, o que não foi observado para células infectadas por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* (Figura 12b, c e d).



(b)



(c)



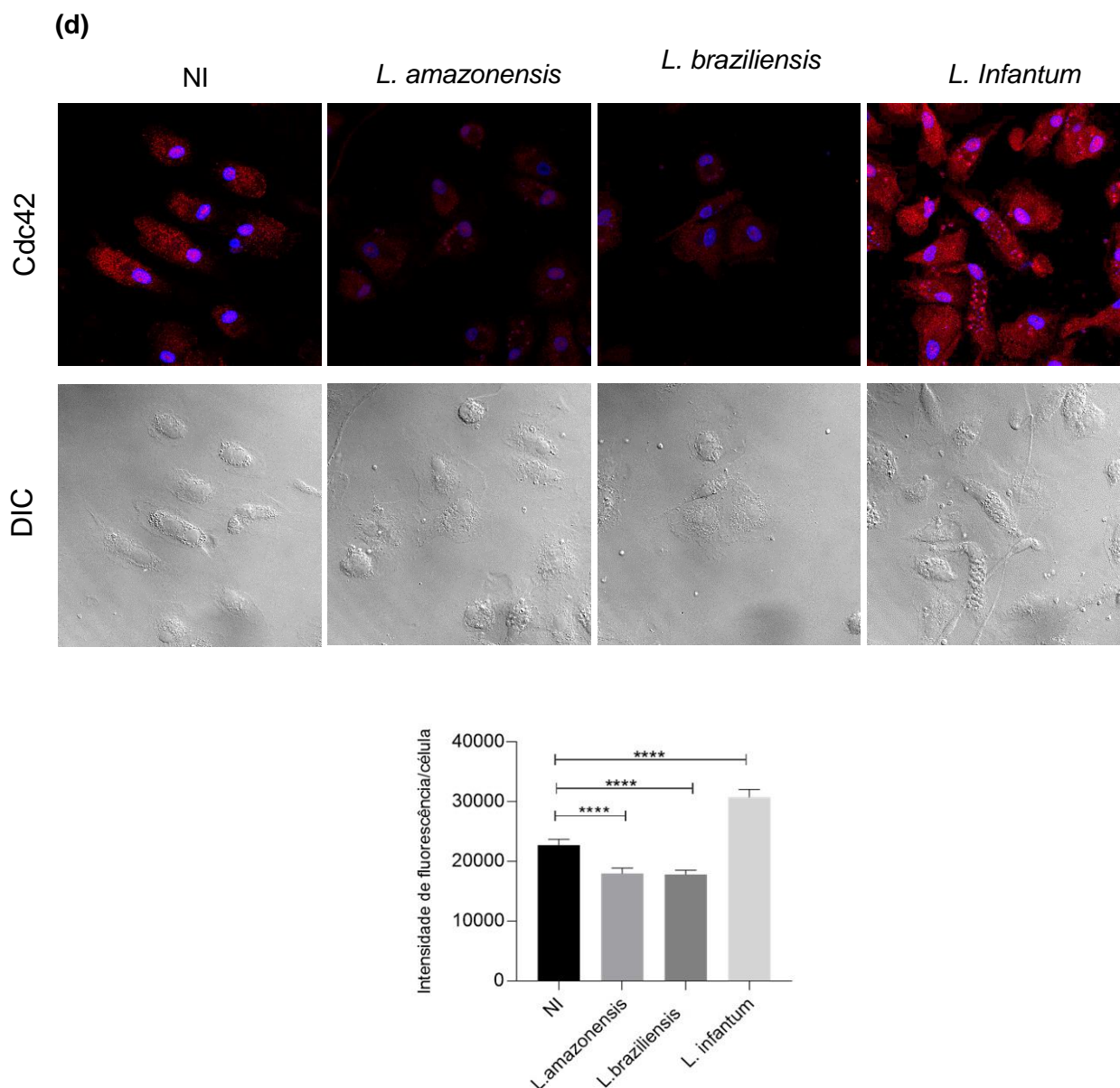


Figura 12. Avaliação da polimerização de actina em células dendríticas infectadas por *Leishmania*. Células dendríticas infectadas ou não por *L. amazonensis* (na proporção de 10:1), *L. braziliensis* (na proporção de 10:1) ou *L. infantum* (na proporção de 20:1) foram marcadas com anticorpo anti-Rac1, anti-RhoA e anti-Cdc42. (a) Expressão da intensidade de fluorescência em marcação de faloidina (b) Expressão da intensidade de fluorescência em marcação de Rac1 (c) Expressão da intensidade de fluorescência em marcação de RhoA (d) Expressão da intensidade de fluorescência em marcação de Cdc42. A intensidade de fluorescência das marcações foi quantificada através da média de 25 a 30 células para cada grupo utilizando o software FIJI. Vermelho, anti-Rac1, anti-RhoA ou anti-Cdc42; azul, DAPI, núcleo da célula; NI, não-infectado. ****, $p < 0,001$ (teste t de Student). Resultado representativo de 3 experimentos.

5.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CCR7 EM CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR *LEISHMANIA*

As células dendríticas, ao serem ativadas, expressam em sua superfície CCR7, aumentando seu potencial migratório para linfonodos drenantes por vasos linfáticos aferentes em resposta a quimiocinas como CCL19 e CCL21 (Feijó et al., 2017) Com o objetivo de avaliar a expressão de CCR7 em células infectadas por *Leishmania*, realizamos a imunomarcagem para esta molécula por citometria de fluxo. Nossos resultados mostram um aumento da expressão de CCR7 em células dendríticas infectadas por *L. infantum*, em comparação com aquelas infectadas por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* (Figura 13).

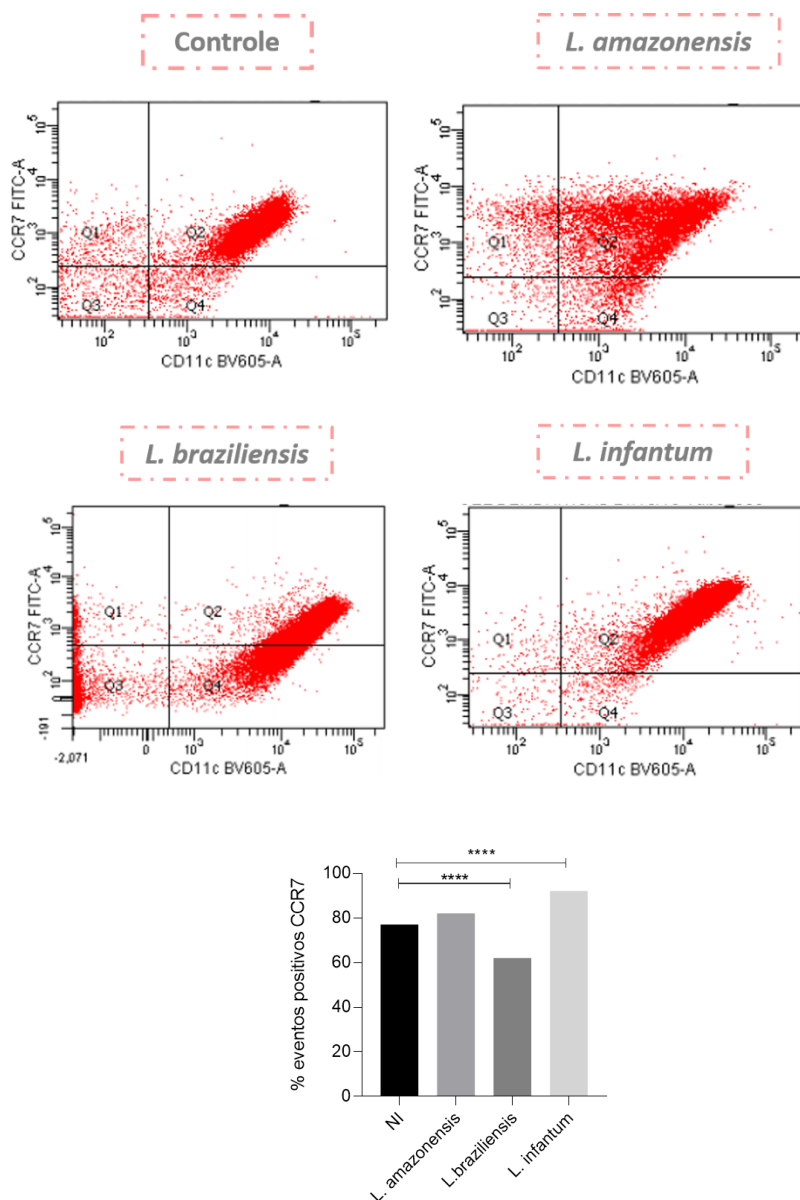


Figura 13. Avaliação da expressão de CCR7 em células dendríticas infectadas por *Leishmania*. A Expressão de CCR7, 6 horas após a infecção, foi avaliada por citometria de fluxo (FACS DIVA). A porcentagem de eventos positivos para CCR7 foi analisada por FlowJo e a montagem dos gráficos feita com auxílio do Graphpad Prism. Mann-Whitney ****, $p < 0,001$. Resultado representativo de um experimento.

5.7 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR DIFERENTES ISOLADOS DE *L. BRAZILIENSIS*

A LCL e LD são formas clínicas da LC, causadas por *L. braziliensis* (Costa et al, 1986). Na Bahia, na região de Corte de Pedra, é considerada emergente, com um aumento de aproximadamente 4% dos casos de 2004 a 2008 (Jirmanus et al, 2012). Diante disto e dos resultados obtidos neste trabalho sugerindo que células dendríticas tem um papel importante na visceralização da doença, resolvemos avaliar o papel destas células na disseminação de *L. braziliensis* no hospedeiro vertebrado.

Utilizando as mesmas metodologias anteriormente citadas, avaliamos a migração de células dendríticas infectadas por isolados de *L. braziliensis* causadores de LCL e LD, que foram cedidos pelo grupo do Dr. Edgar Carvalho. Nossos resultados mostram que, após a infecção por LD, há um aumento da migração de células dendríticas, quando comparadas com as células infectadas por LCL (Figura 14).

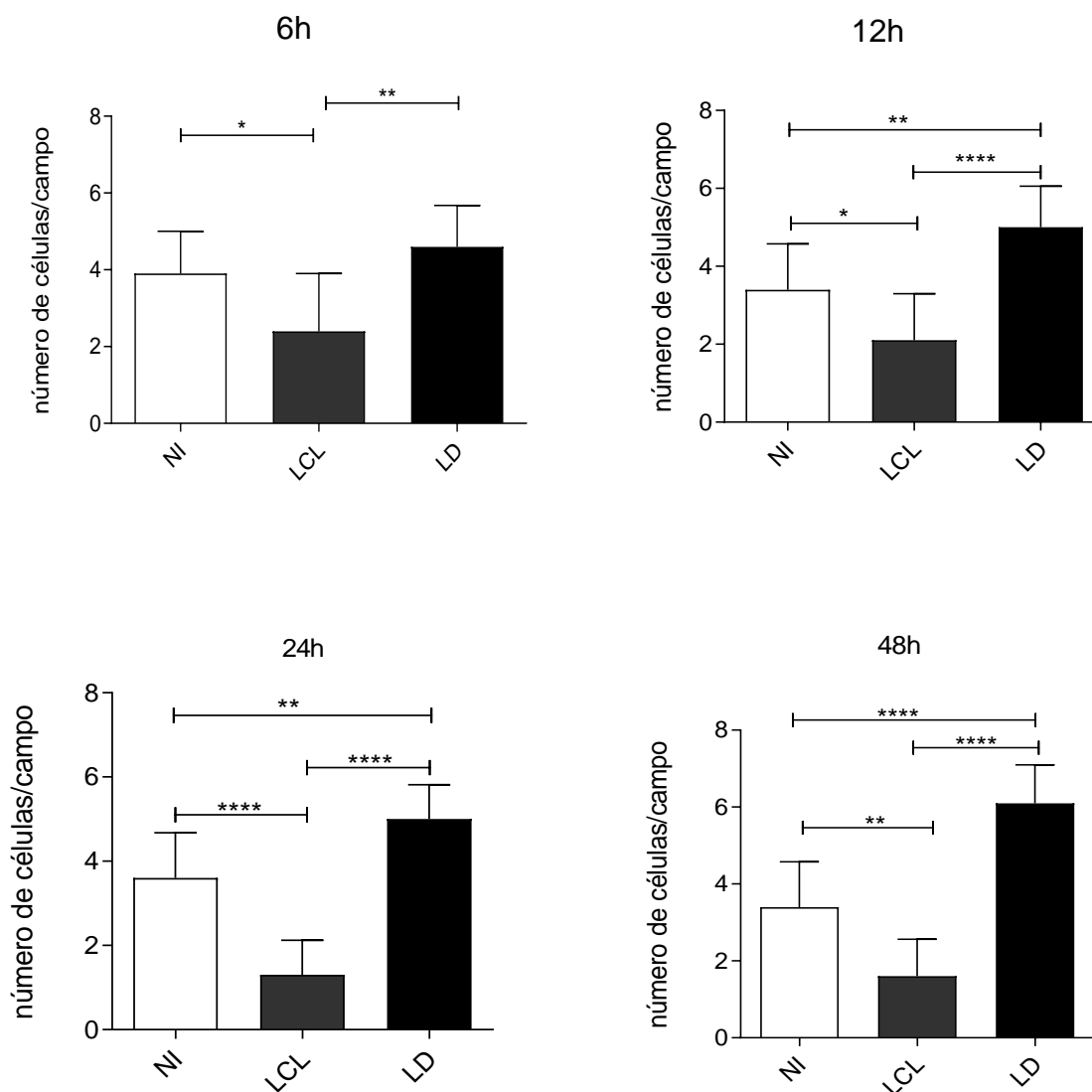


Figura 14. Avaliação da migração de células dendríticas infectadas por isolados de *L. braziliensis*. Células dendríticas foram infectadas por diferentes isolados de *L. braziliensis* (LCL ou LD) por 4 horas e outro grupo foi exposto a fagocitose por partículas de zymosan FITC (Zy) por 4 horas. Após 6, 12, 24 ou 48 horas de infecção, as células foram submetidas a migração na presença de CCL3 em sistema *Transwell* por adicionais 4 horas. Os insertos foram lavados e fixados, retirados e corados com DAPI para marcação nuclear. As células migrantes foram contadas (10 campos) aleatoriamente por microscopia de fluorescência. Número de células migrantes 6, 12, 24 ou 48 horas após infecção. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.05$ ***, $p < 0.001$, ****, $p < 0.001$. (teste de *t* student). Resultado representativo de três experimentos.

5.8 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE ADESÃO EM CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR ISOLADOS DE *L. BRAZILIENSIS*

Uma vez que observamos uma maior migração de células dendríticas infectadas por LD, partimos para avaliar os mecanismos envolvidos no processo de migração destas células. Utilizamos a metodologia anteriormente citada para avaliar a formação de complexos de adesão. Nossos resultados mostram que há uma maior formação de complexos de adesão em células dendríticas infectadas por LD, em comparação com as infectadas por LCL (Figura 15).

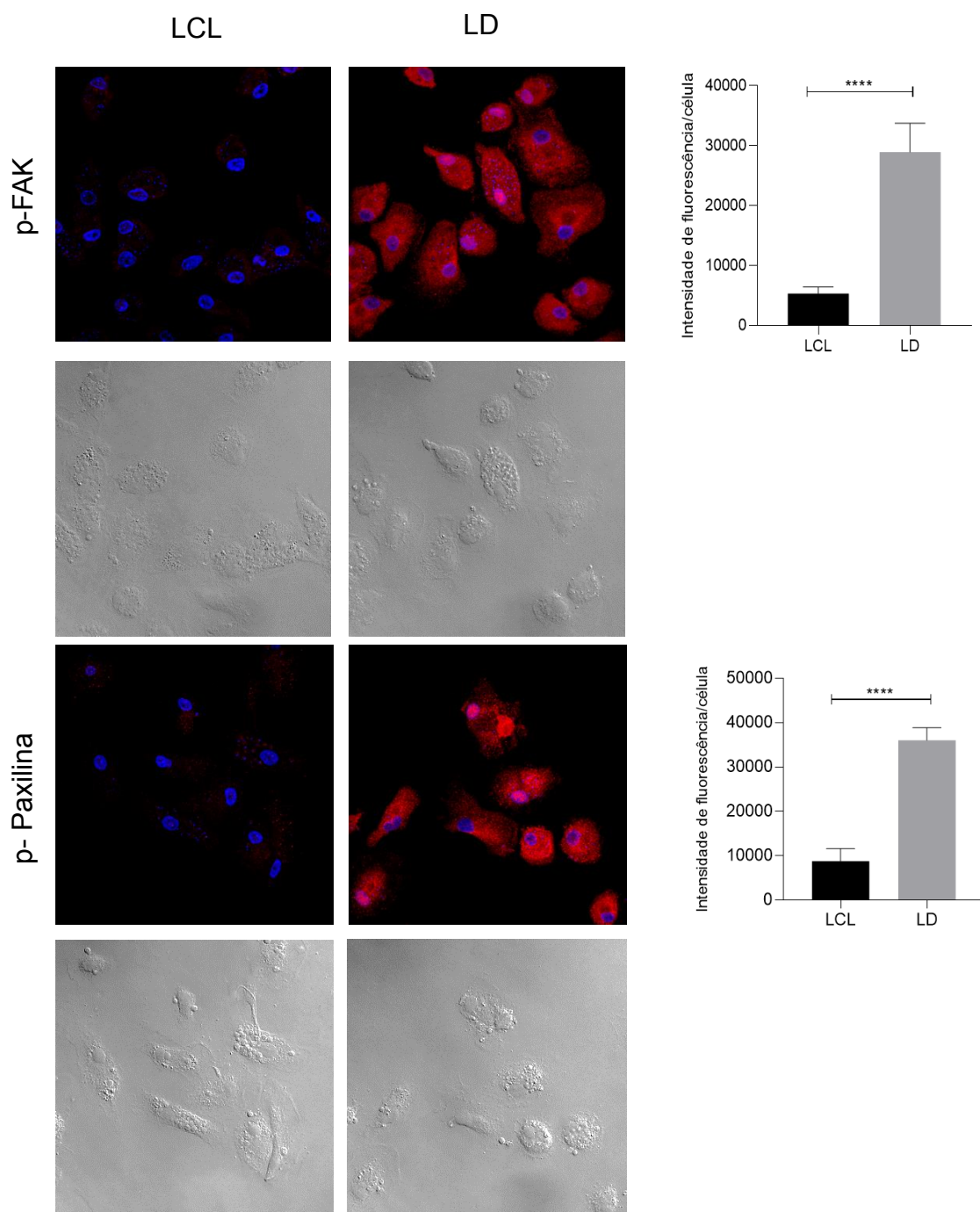


Figura 15. Avaliação da formação de complexos de adesão em células dendríticas infectadas por isolados de *L. braziliensis*. Células dendríticas infectadas (4 horas de infecção e adicionais 48h de reincubação) ou não por LCL ou LD foram marcadas com anticorpo anti-FAK e anti-paxilina fosforiladas. A expressão da intensidade de fluorescência foi analisada em 25 a 30 células para cada grupo e foi quantificada utilizando o software FIJI. Vermelho, anti-FAK ou paxilina fosforiladas; azul, DAPI, núcleo da célula; escala de cinza, DIC; NI, não-infectado. ****, $p < 0,001$ (teste *t* de Student). Resultado representativo de 3 experimentos.

5.9 AVALIAÇÃO DA POLIMERIZAÇÃO DE ACTINA EM CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR ISOLADOS DE *L. BRAZILIENSIS*

Utilizando a mesma metodologia anteriormente citada, partimos para investigar a polimerização da actina citoplasmática em células dendríticas infectadas por isolados de *L. braziliensis*. O nosso objetivo era observar a dinâmica da actina nessas células, utilizando os anticorpos marcadores de proteínas da família Rho-GTPases, que são proteínas que regulam a dinâmica da actina nas células eucarióticas. Nossos resultados mostram que há uma maior expressão de Rac1, RhoA e Cdc42 nas células infectadas por LD, quando comparadas com aquelas infectadas por LCL (Figura 16).

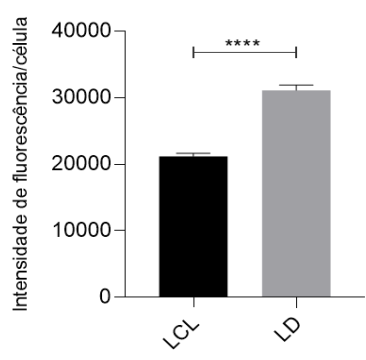
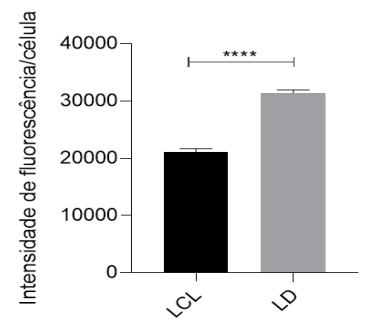
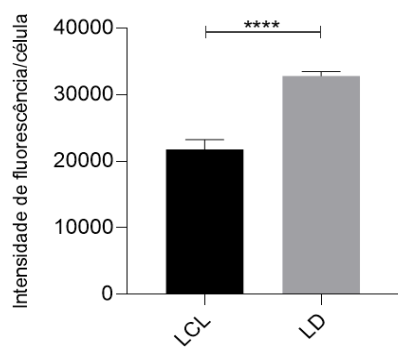
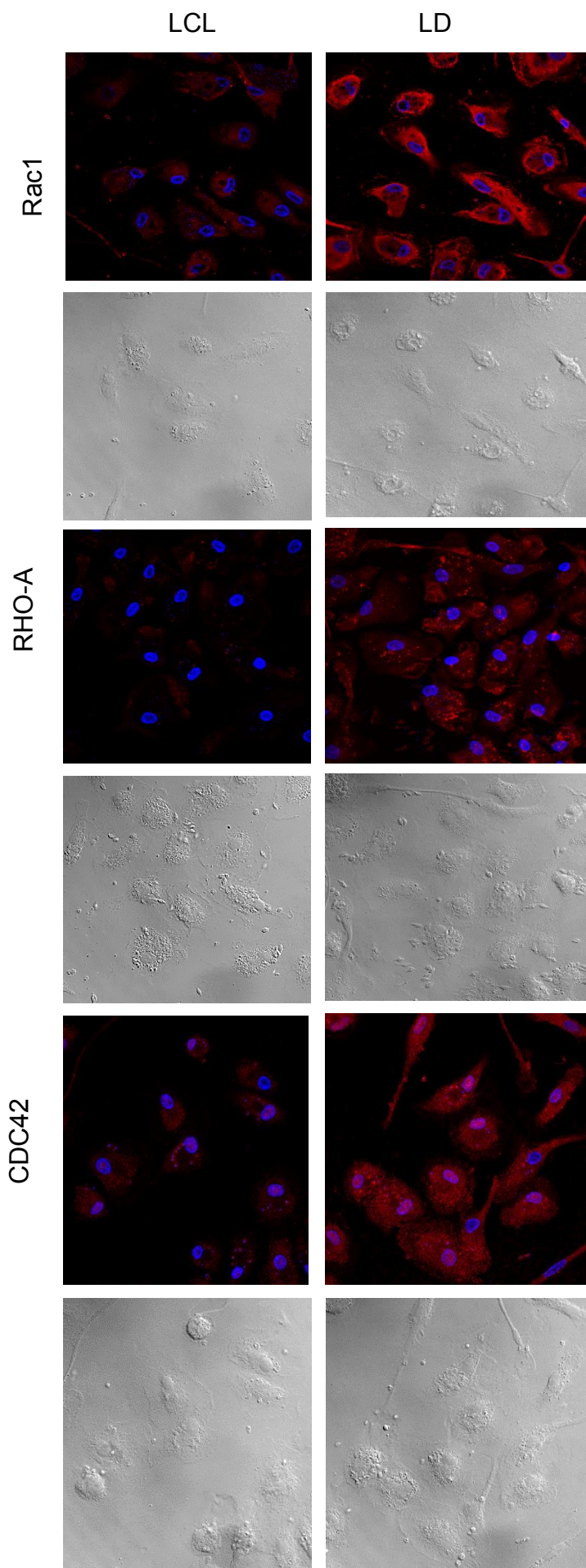


Figura 16. Avaliação da expressão de proteínas da família Rho gtpases em células dendríticas infectadas por isolados de *L. braziliensis*. Células dendríticas infectadas ou não por *L. braziliensis* (proporção de 10:1) foram marcadas com anticorpo anti-Rac1, anti-RhoA e anti-Cdc42 48h após a infecção. (a) Expressão da intensidade de fluorescência em marcação de Rac1 (b) Expressão da intensidade de fluorescência em marcação de RhoA (c) Expressão da intensidade de fluorescência em marcação de Cdc42. A intensidade de fluorescência das marcações foi quantificada através da média de 25 a 30 células para cada grupo utilizando o software FIJI. Vermelho, anti-Rac1, anti-RhoA ou anti-Cdc42; azul, DAPI; NI, não-infectado. ****, $p < 0,001$ (teste *t* de Student). Resultado representativo de 3 experimentos.

5.10 Avaliação da expressão de CCR7 em células dendríticas infectadas por isolados de *Leishmania*

Com o objetivo de avaliar a expressão de CCR7 em células infectadas por LCL ou LD, realizamos a imunomarcação para esta molécula por citometria de fluxo. Nossos resultados mostram um aumento da expressão desta molécula em células dendríticas infectadas por LD, em comparação àquelas infectadas por LCL (Figura 17).

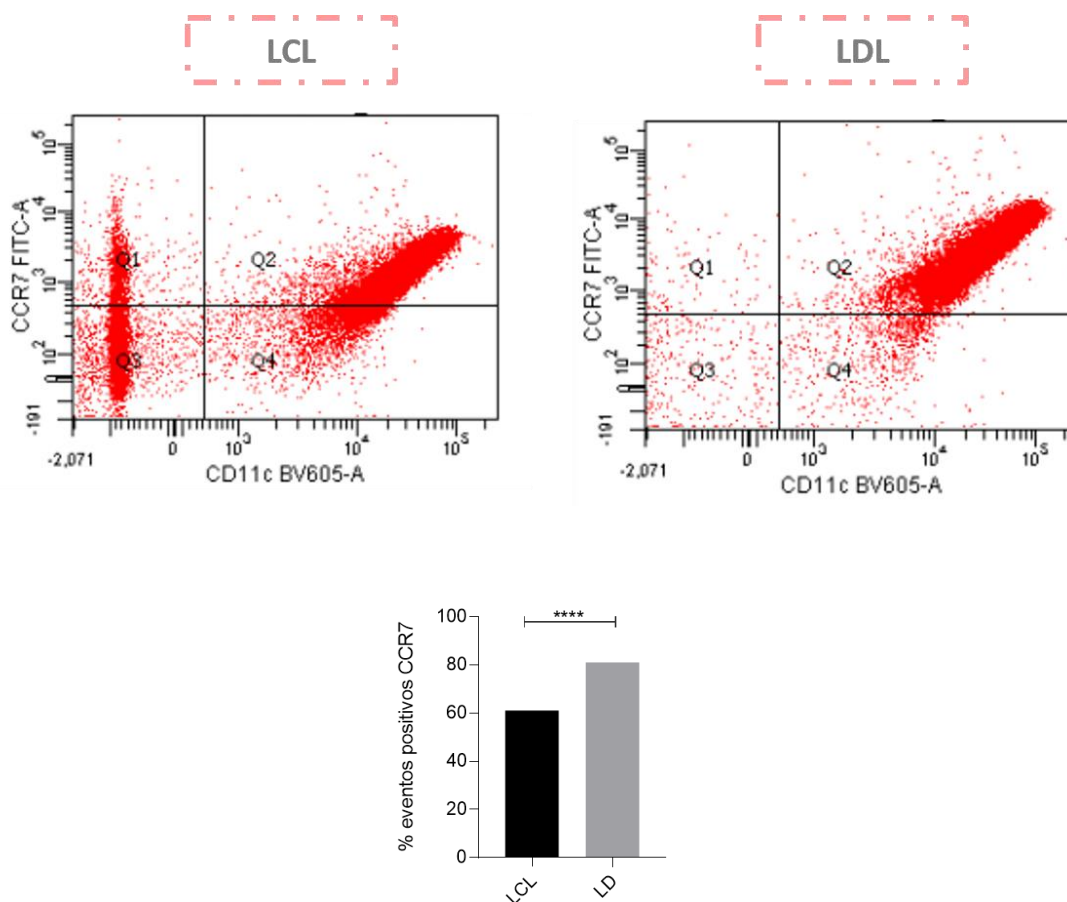


Figura 17. Avaliação da expressão de CCR7 em células dendríticas infectadas por *Leishmania*. A Expressão de CCR7, 6 horas após a infecção, foi avaliada por citometria de fluxo (FACS DIVA). A porcentagem de eventos positivos para CCR7 foi analisada por FlowJo e a montagem dos gráficos feita com auxílio do Graphpad Prism. Teste Mann-Whitney, **** $p < 0,001$. Resultado representativo de um experimento.

6. DISCUSSÃO

A leishmaniose constitui um grave problema de saúde pública no Brasil (Ministério da Saúde, 2007). Por possuir diferentes formas clínicas, sua patogênese é bastante complexa e mecanismos que favorecem a sobrevivência do parasito no hospedeiro vertebrado ainda precisam ser melhor estudados (Bates, 2007). A disseminação ou permanência de células infectadas no hospedeiro é fundamental para o desenvolvimento da doença (Gordon et al., 2016).

A migração e *homing* de células infectadas por *Leishmania* ainda são pouco estudadas. Estudo recente publicado por Menezes e colaboradores (2016) mostrou uma redução da migração de macrófagos após a infecção por *L. amazonensis* (Menezes, et al, 2016), entretanto, pouco se sabe sobre o papel de células dendríticas no processo de disseminação da doença no hospedeiro vertebrado. Sabe-se que células dendríticas são capazes de capturar antígenos via diferentes receptores, como os PRRs e TLRs, e que estas tem um papel fundamental na imunopatogênese da leishmaniose (Geijtenbeek, et al, 2004). Estudos realizados anteriormente demonstraram que células dendríticas infectadas por *Leishmania* migram pela pele e transportam antígenos a linfonodos drenantes e podem chegar ao linfonodo 24 horas após a infecção (Mandell et al, 2008; Misslitz, et al, 2004), onde apresentarão antígenos à células T (Léon et al, 2007). Deste modo, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar a migração de células dendríticas humanas infectadas por diferentes espécies de *Leishmania*.

Neste trabalho, inicialmente, com o objetivo de tentar entender o papel de células dendríticas na disseminação do parasito, avaliamos a migração de células infectadas por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou *L. infantum*. Nossos resultados mostraram uma maior migração destas células após a infecção por *L. infantum*, em comparação a células não infectadas, que não foi observado para células infectadas por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*. No grupo de células infectadas por *L. amazonensis*, observamos apenas um aumento da migração celular transitória em tempos iniciais após a infecção, enquanto nas células infectadas por *L. braziliensis* foi observada uma redução da migração desde tempos iniciais da infecção (Figura 10). Utilizando modelo de LC, estudo publicado por Hermida e colaboradores (2014), demonstraram que a infecção por *L. amazonensis* reduz a migração de células dendríticas do sítio de infecção para linfonodos drenantes (Hermida et al, 2014),

corroborando com nossos dados. Adicionalmente, trabalho recente utilizando modelo *in vitro* de LC mostra que LPG de *L. major* contribui para o atraso na migração de células dendríticas (Ponte Sucre et al, 2011).

Interessantemente, observamos uma maior migração após a infecção por *L. infantum* em todos os tempos estudados. Essa maior taxa de migração de células infectadas com a espécie associada à forma visceral da doença pode estar associada a disseminação do parasito em indivíduos que apresentam esta forma clínica. Em concordância com os nossos dados, estudo realizado por Ato e colaboradores (2012) mostrou que após a infecção por *L. donovani*, há um aumento do número de células dendríticas nos linfonodos em tempos iniciais (Ato et al, 2002). Em outros modelos, já foi demonstrada a importância de células dendríticas na disseminação da doença (Feijo et al, 2016; Soong, 2008). Entretanto, na literatura, poucos trabalhos avaliam a migração de células hospedeiras infectadas por espécies relacionadas a forma visceral da leishmaniose, reforçando a importância do estudo do papel destas células na disseminação e visceralização desta doença no hospedeiro vertebrado.

O movimento migratório executado pela célula é decorrente de uma complexa mudança na morfologia celular dependente da reorganização do citoesqueleto de actina e da modulação na adesão (Rikitaki et al, 2011). Com o objetivo de melhor entender os mecanismos associados ao aumento da migração observado em células dendríticas infectadas por *L. infantum*, partimos para avaliar a formação de complexos de adesão e polimerização de actina nestas células após a infecção por *Leishmania*, uma vez que estes são fatores fundamentais para o processo de migração celular. Nossos resultados mostram que a infecção por *L. infantum* induz a formação de complexos de adesão em células dendríticas, ao passo que a infecção por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* reduz a formação desses complexos (Figura 11). De forma semelhante, trabalhos recentes mostraram que há um aumento na ativação de FAK após a infecção por *T. cruzi*, contribuindo para a evolução da cardiomiopatia chagásica e sugerindo uma associação do aumento da migração destas células com a disseminação da doença (Melo, 2019). Apesar dos poucos trabalhos que avaliam a migração de células hospedeiras infectadas por *Leishmania* serem realizados em macrófagos, observa-se uma associação da redução da adesão e redução da migração. Trabalho anterior publicado por Menezes e colaboradores (2016), demonstrou uma redução na formação de complexos de adesão em macrófagos infectados por *L. amazonensis*, associada a uma alteração da frequência de

polimerização de actina e redução da migração destas células (Menezes et al, 2016). Adicionalmente, já havia sido demonstrado que a infecção por *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* reduz a capacidade de adesão de macrófagos *in vitro* (Pinheiro et al, 2006).

Estudos recentes demonstraram que sinais oriundos da membrana plasmática e do citoesqueleto de actina estão relacionados com a protusão celular (Driscoll et al., 2014). Dada a importância da modulação do citoesqueleto de actina na migração, avaliamos ainda a expressão de moléculas associadas a polimerização destes filamentos. Os nossos resultados mostram um aumento da expressão de moléculas associadas a polimerização de actina, como Rac1, RhoA e Cdc42, em células infectadas por *L. infantum*, em comparação com células controle não infectadas. Em contraste, em células infectadas por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* foi observada uma redução da expressão destas moléculas em relação à células controle não infectadas (Figura 12). Estudos prévios utilizando modelo *in vitro* demonstraram que inibição da expressão de Rho GTPases, levava a defeitos na motilidade celular (Sander et al, 1999). Utilizando o modelo de doença de Chagas, foi demonstrado que a infecção de DC por *T. gondii* inicia uma série de eventos, incluindo um rápido remodelamento do citoesqueleto, que leva ao aumento da migração destas células (Weidner, 2013). Outros estudos mostraram ainda que a infecção micobacteriana induz mudanças na distribuição dos filamentos de actina, associado ao remodelamento de proteínas associadas como RAC e Rho, em fibroblastos reduzindo a motilidade destas células (Castañeda-Sánchez, 2013). Adicionalmente, foi mostrado ainda que em macrófagos nocautes para Rac1, as células perdiam sua capacidade de invadir ambientes mais densos como matrigel (Wheeler et al, 2006). Além disso, foi demonstrado que defeitos na expressão de Cdc42 resulta em diminuição da capacidade migratória em modelo vascular (Laviña et al, 2018).

Um dos aspectos fundamentais da função de sentinela de células dendríticas é o seu recrutamento a tecidos periféricos e sua capacidade de migração a linfonodos drenantes (MCColl, 2002). Para que a migração até os linfonodos ocorra, a expressão de determinados receptores de membrana são importantes em células dendríticas, onde em estágios imaturos dependem da expressão de receptores de superfície tais como CCR2 e CCR5 e durante o processo de migração células dendríticas em estágio maduro, apresentam expressão intermediária do CCR7, sendo esta molécula importante para a migração dessas células para órgãos linfoides (Ohl et al, 2004;

McColl et al, 2002). No nosso estudo, avaliamos ainda a expressão de CCR7 nestas células frente a infecção por diferentes espécies de *Leishmania*, 6 horas após a infecção. Mostramos que há uma maior expressão de CCR7 nas células infectadas por *L. infantum*, em comparação com células controle não infectadas, o que não foi observado após a infecção por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* (Figura 13), sugerindo uma associação da expressão desta molécula com a disseminação da doença. Trabalho publicado por Moll e colaboradores (2005), demonstrou que a infecção por *L. major* modula receptores de quimionas em células dendríticas humanas, alterando sua capacidade migratória. Os autores mostram que o aumento na expressão de CCR7 está associado a um aumento da migração de células dendríticas, de aproximadamente 3 vezes, em resposta ao CCL21, ligante do CCR7 (Steigard & Moll, 2005). Esse trabalho vai de encontro aos nossos dados, no qual não observamos um aumento da expressão de CCR7 em células infectadas com as espécies associadas a forma localizada da doença. Entretanto, estudos na literatura demonstraram a participação do CCR7 na migração de CDs em outros modelos experimentais. Anteriormente, foi descrito na literatura que infecções virais como as provocadas pelo citomegalovírus humano (HCMV) é capaz de não só inibir a regulação do CCR7 ao infectar células dendríticas imaturas, mas também dificultar a migração destas células em resposta ao CCL19 (Grosche, 2017). Adicionalmente, foi demonstrado que o tráfego precoce de DCs dos pulmões para o linfonodo drenante dependia da sinalização mediada pelo CCR7. Além disso, os autores mostraram que a migração prejudicada de célula dendríticas em camundongos CCR7 nocaute resultou em disseminação tardia de bactérias para LN e baço (Olmos, 2009).

Estudos acerca da migração de células hospedeiras é importante para entender mecanismos de disseminação de infecções. Em modelo de infecção por HIV, foi demonstrada a participação de células dendríticas na disseminação viral em tecidos linfóides em modelo *in vivo* de camundongos susceptíveis (Wu & KewalRamani, 2006). Adicionalmente, trabalho publicado anteriormente demonstrou que células dendríticas inflamatórias infectadas por *L. major* em modelo murino, na ausência de IL-4, são capazes de fornecer um ambiente favorável para a replicação e disseminação de parasitos no hospedeiro (Hurdal et al, 2020). Em nosso estudo, mostramos que a infecção por isolados de *L. braziliensis* de pacientes com LCL e LD modulam de forma diferente a migração de células dendríticas. Nosso resultado mostra que isolados de *L. braziliensis* obtidos de pacientes com LD levam ao aumento

da migração de células dendríticas humanas 6, 12, 24 e 48 horas após a infecção. Por outro lado, observamos uma redução da migração de células infectadas por isolados de *L. braziliensis* de pacientes com LCL (Figura 14). Associado a isso, observamos ainda maior formação de complexos de adesão e polimerização de actina nas células dendríticas infectadas por isolados de *L. braziliensis* de pacientes LD, mas não por isolados de *L. braziliensis* de pacientes com LCL (Figura 15). Adicionalmente, mostramos uma maior expressão de proteínas envolvidas na regulação da actina filamentosa (Rac, Rho, Cdc42) nos grupos infectados por isolados de *L. braziliensis* de pacientes com LD (Figura 16) e um aumento da expressão de CCR7 nestas células (Figura 17). A LD é considerada uma das formas mais graves de LC. Na região de Corte de Pedra, Bahia, há uma incidência relevante desta forma clínica (Machado et al., 2017; Jirmanus et al., 2012). O aumento da migração de células dendríticas infectadas por isolados de *L. braziliensis* de pacientes com LD corrobora com nossos resultados comparando a infecção destas células por diferentes espécies de *Leishmania*, sugerindo um papel importante de células dendríticas na disseminação da doença no hospedeiro vertebrado.

Na leishmaniose, a relação entre disseminação do parasito e a gravidade da doença é particularmente estreita. Estudos para melhor entender o processo de migração de células hospedeiras infectadas e sua relação com a sobrevivência intracelular do parasito e disseminação da doença são fundamentais para a concepção de novas estratégias para terapêutica e prevenção do desenvolvimento de formas graves e desfigurantes da leishmaniose. Neste contexto, nosso estudo avaliou a migração de células dendríticas infectadas por *Leishmania* e seu possível papel na disseminação do parasito no hospedeiro vertebrado e visceralização da doença. Nossos resultados mostram um papel importante de células dendríticas em ambos os processos. Novos estudos para avaliar a migração de células dendríticas em ambientes tridimensionais, outras células hospedeiras em ambiente bidimensional e tridimensional, além de estudos *in vivo*, são fundamentais para o melhor entendimento da disseminação da doença no hospedeiro e visceralização da doença.

7. CONCLUSÕES

- A infecção por *L. infantum* leva a um aumento na migração de células dendríticas sugerindo uma associação destas células com o processo de visceralização da doença.
- A infecção por isolados de *L. braziliensis* que causam a forma disseminada da doença, mas não de isolados que causam a forma localizada, leva a um aumento da migração de células dendríticas, sugerindo que estas células apresentam um papel na disseminação do parasito no hospedeiro vertebrado.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, S. *et al.* New records of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 1, p. 123-130, 1992.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and global estimates of its incidence. **Plos one**, v. 5, n.3, p. 35, 2012.
- ATO, M. *et al.* Loss of dendritic cell migration and impaired resistance to *L. donovani* infection in mice deficient in CCL19 and CCL21. **Journal Immunology**, v. 176, n.12, p. 5486-5493, 2006.
- AZEVEDO, E. *et al.* Interactions between *Leishmania braziliensis* and macrophages are dependent on the cytoskeleton and myosin Va. **Journal of Parasitology**, v. 96, n.4, p. 509-515, 2012.
- BALDWIN, T. *et al.* The site of *Leishmania major* infection determines disease severity and immune responses. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 12, p. 6830-6834, 2003.
- BANCHEREAU, J; STEINMAN, RM. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n.8, p. 245-252, 1998.
- BANULS, A. *et al.* *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans, **Advances in Parasitology**, v. 64, n.5, p. 1-109, 2007.
- BATES, P. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal Parasitology**, v. 37, n.3, p. 97-106, 2007.
- BLEWETT, T. *et al.* Cutaneous leishmaniasis in the guinea pig. Delayed-type hypersensitivity, lymphocyte stimulation, and inhibition of macrophage migration. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v.56, n.10, p.35-42, 1971.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância leishmaniose tegumentar**, v.3, n.12, p. 89-99, 2007.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância leishmaniose visceral**, v.5, n.4, p. 19-27, 2007
- BRAY, R. *et al.* The effect of parasitization by *Leishmania mexicana* on macrophage function in vitro. **Acta Tropica**, v. 20, n.2, p. 546-551, 1983.
- CARVALHAL, D. *et al.* The modelling of mononuclear phagocyte-connective tissue adhesion in vitro: application to disclose a specific inhibitory effect of *Leishmania* infection. **Experimental Parasitology**, v. 107, n.6, p. 188-199, 2004.

CARVALHO, E. *et al.* Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 56, n.12, p. 315-325, 1994.

CASTAÑEDA-SÁNCHEZ, C. *et al.* Defensin Production by Human Limbo-Corneal Fibroblasts Infected with Mycobacteria. **Plos Pathogens**, v. 2, n.11, p. 13-32, 2013.

CERBONI, S.; GENTILI, M.; MANEL, N. Diversity of pathogen sensors in dendritic cells. **Advances Immunology**, v. 120, n.9, p. 211–237, 2013.

DASHOK, A; ACHA-ORBEA, H. Timing is everything: dendritic cell subsets in murine Leishmania infection. **Trends in Parasitology**, v. 10, n.7, p. 499-507, 2014.

DA GAMA, LM. *et al.* Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion molecules and in vivo migration of murine macrophages infected with Toxoplasma gondii. **Microbes Infectology**, v. 14, n.3, p. 1287-1296, 2004.

DERAMAUDT, T. *et al.* Altering FAK-Paxillin Interactions Reduces Adhesion, Migration and Invasion. **Plos one**, v.9, n.4, p. 92-99, 2014.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. Comparative Immunology, **Microbiology and Infectious Diseases**, vol 27, n. 5, p. 305-18, 2004.

De MENEZES, J. P. B. *et al.* Leishmania infection inhibits macrophage motility by altering F-actin dynamics and the expression of adhesion complex proteins. **Cellular Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 252-261, 2017.

DOMINGUEZ, R. Actin-binding proteins. A unifying hypothesis. **Trends Biochemical Sciences**, v. 29, n.2, p. 572–578, 2004.

DRISCOLL, L. *et al.* Cellular contact guidance through dynamic sensing of nanotopography. **Acs Nano**, v.8, n.4, p. 3546-3555, 2014.

EGELMAN, E. The structure of F-actin. **Journal Muscle Cellular Motility**, v.6, n.7, p. 159-161, 1985.

FAVALI, C. *et al.* Leishmania amazonensis infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, n.3, p. 1401-1406, 2007.

FEIJÓ, D. *et al.* Dendritic Cells and Leishmania Infection: Adding Layers of Complexity to a Complex Disease. **Journal of Immunology Research**, v. 56, n.5, p. 423-429, 2017.

FÖRSTER, R. *et al.* CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. **Cell**, v. 99 , n.3, p. 23–33, 1999.

GEIJTENBEEK, S.J. VAN. *et al.* Self-and non self-recognition by C-typelectins on dendritic cells. Annual **Review of Immunology**, v. 22, n.2, p. 33-54, 2004.

GIRARD-MADOUX. *et al.* IL-10 signaling in dendritic cells attenuates anti-*Leishmania major* immunity without affecting protective memory responses. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n.4, p. 2890-2894, 2015.

GORAK, PM. *et al.* Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. **European Journal Immunology**, vol 28, n.2, p.87-695, 1998.

GORDON S. Phagocytosis: an immunobiologic process. **Immunity**, v. 44, n.1, p. 463-475, 2016.

GROSCHE, *et al.* Human cytomegalovirus-Induced degradation of CYTIP modulates dendritic cell adhesion and migration. **Frontiers in immunology**, v. 21, n.3, p.461-467, 2017.

MOLL, H. *et al.* Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. **European Journal of Immunology**, v.7, n.6, p.1595-1601, 1993.

HAWIGER *et al.* Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, v.194, n.1, p. 769-779, 2001.

HOLMES, KC. *et al.* Atomic model of the actin filament. **Nature**, v.347, n.9, p. 44-49, 1990.

HU, Y. L. e CHIEN, S. Dynamic motion of paxillin on actin filaments in living endothelial cells. **Biochemical Biophysical Research Community**, v. 357, n.4, p.871–876, 2007.

HUGHES, CE; NIBBS, RJB. A guide to chemokines and their receptors. **FEBS Journal**, v. 285, n.4, p. 2944-2971, 2018.

HURDAYAL, R. *et al.* Inflammatory Dendritic Cells, Regulated by IL-4 Receptor Alpha Signaling, Control Replication, and Dissemination of *Leishmania major* in Mice. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.9, n.2, p. 479, 2020.

JIRMANUS, L; M. J. GLESBY. *et al.* Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 86, n.4, p. 426-433, 2012.

JONES, GE. *et al.* Cellular signaling in macrophage migration and chemotaxis. **Journal Leukocyte Biology**, v. 65, n.11, p. 593-602, 2000.

KAWASAKI, T; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in Immunology**, v.5, n.3, p. 461, 2014.

KAYE e SCOTT. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature**, v.8, n.4, p. 604-615, 2011.

MANDELL, L. *et al.* Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. **PLoS pathogens**, v. 11, n.5, p. 100-112, 2008.

LAVIÑA, S. *et al.* Defective endothelial cell migration in the absence of Cdc42 leads to capillary-venous malformations. **The company of biologists**, v. 145, p. 161-182, 2018.

LEON, M. LOPEZ-BRAVO. *et al.* Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. **Immunity**, v. 4, p. 519-531, 2007.

BALDWIN, M. *et al.* MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. **European Journal of Immunology**, v. 10, n.2, p. 2822-2831, 2003.

MACHADO *et al.* Treatment of Disseminated Leishmaniasis With Liposomal Amphotericin B. **Major article**, v. 61, n.3,p. 945-949, 2017.

MAYOR, R; ETIENNE-MANNEVILLE, S. The front and rear of collective cell migration. **Molecular Cell Biology**. vol 17, n.4, p. 97–109, 2016.

MCCOLL, S. R. Chemokines and dendritic cells: a crucial alliance. **Immunology Cell Biology**, v. 80, p. 489-496, 2002.

MELO *et al.* *Trypanosoma cruzi* down-regulates mechanosensitive proteins in cardiomyocytes. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v.114, n.5, p. 180-186, 2019.

MISSLITZ, AC. *et al.* Two waves of antigen-containing dendritic cells in vivo in experimental *Leishmania major* infection. **European Journal of Immunology**, v.34, n.5, p. 715-735, 2004.

MITRA, S. *et al.* Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. **Molecular Cell Biology**, v. 6, n.4, p. 56-68, 2005.

MONACK, D. *et al.* *S. Salmonella* exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid model. **The Journal Experimental Medicine**, v.192, n.2, p.249-258, 2009.

OHL, L. *et al.* CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. **Immunity**, v.2, n.7, p. 279-288, 2004.

ÓLAFSSON, EB; VARAS-GODOY, M; BARRAGAN, A. *Toxoplasma gondii* infection shifts dendritic cells into an amoeboid rapid migration mode encompassing podosome dissolution, secretion of TIMP-1, and reduced proteolysis of extracellular matrix. **Cell microbiology**, v.20, n.8, p. 158-163, 2018.

OLMOS, S. *et al.* Ectopic Activation of Mycobacterium tuberculosis-Specific CD4+ T Cells in Lungs of CCR7^{2/2} Mice. **Journal of Immunology**, v. 184, n.1, p. 895-901, 2009.

WEINER, O. *et al.* Spatial control of actin polymerization during neutrophil chemotaxis. **Biology Immunology**, v.2, n.6, p. 75-81, 1994.

PINHEIRO *et al.* Leishmania Infection Impairs 1-Integrin Function and Chemokine Receptor Expression in Mononuclear Phagocytes. **Infection and immunity**, v. 74, n.5, p. 3912-3921, 2006.

PODNOVSKAIA, S. *et al.* Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction, **journal of immunology**, v. 10, n.3, p. 111-129, 2017.

POLLARD, TD; BORISY, GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. **Cell**, v.112, n.2, p. 453-465, 2003.

PONTE-SUCRE, A; HEISE, D; MOLL, H. Leishmania major lipophosphoglycan modulates the phenotype and inhibits migration of murine langerhans cells. **Immunology**, v.104, n.4, p.462-467, 2001.

REN, X. *et al.* Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. **The EMBO Journal**, v.18, n.3, p. 578-585, 1999.

RIKITAKE, Y; TAKAI, Y. Directional cell migration. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 287, n.4, p. 97-143, 2011.

ROBERTS AND ROBINSON. Mycobacterium tuberculosis infection of human dendritic cells decreases integrin expression, adhesion and migration to chemokines. **Immunology**, v. 141, n.2, p. 39-41, 2013.

ROGERS *et al.* Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **Microbiology Letters**, v. 209, n. 1, p. 1-7, 2002.

SANDER, E. *et al.* Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. **Journal Cell Biology**, v. 147, n.6, p. 1009-1022, 1999.

SCHLAEPFER, D. e MITRA, S.K. Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. **Current Opin Genetic Development**, v. 14, n.11, p. 92–101, 2004.

SCHREIER, T; DEGEN, E; BASCHONG, W. Fibroblast migration and proliferation during in vitro wound healing. A quantitative comparison between various growth factors and a low molecular weight blood dialysate used in the clinic to normalize impaired wound healing. **Research Experimental Medicine**, v. 193, n.1, p. 95–205, 1993.

SOONG, L. Modulation of dendritic cell function by *leishmania* parasites. **Journal of Immunology**, v.180, n.7, p. 4355–4360, 2008.

STEIGERWALD, M e MOLL H. *Leishmania major* Modulates Chemokine and Chemokine Receptor Expression by Dendritic Cells and Affects Their Migratory Capacity. **Infectious Immunology**, v. 73, n.7, p. 2564-2567, 2005.

STEINMAN *et al.* Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. **Annals New York Academy Science**, v. 97, n.6, p. 15-25, 2003.

STUELTEN, C. H; PARENT, C; MONTELL, D. Cell motility in cancer invasion and metastasis: insights from simple model organisms. **Nature Review Cancer**, v. 18, n.8, p. 296–312, 2018.

SUZUE *et al.* Critical role of dendritic cells in determining the Th1/Th2 balance upon *Leishmania major* infection. **International Immunology**, v.20, n.4, p. 337-343, 2008.

SWEENEY, L; HOLZBAUR, E. Motor Proteins. **Cold Spring Harb Perspect Biology**, v.10, n.2, p. 51-55, 2016.

TAMBE *et al.* Collective cell guidance by cooperative intercellular forces. **Nature Mater**, v.10, n.3, p. 469-475, 2011.

TEIXEIRA, MJ. *et al.* Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. **Trends Parasitology**, v. 22, n.4, p. 32-40, 2006.

TIBERIO *et al.* Chemokine and chemotactic signals in dendritic cell migration. **Cell Molecular Immunology**, v.15, n.5, p. 346-352, 2018.

TURNER C. Paxillin comes of age. **Journal Cell Science**, v. 121, n.6, p. 2435–2444, 2008.

VON STEBUT, E. *et al.* Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. **Journal Experimental Medicine**, v. 188, n.2, p. 1547-1552, 1998.

WHEELER. *et al.* Rac1 and Rac2 regulate macrophage morphology but are not essential for migration. **Journal of cell Science**, v.119, n.5, p. 2749-2757, 2012.

WEIDNER. *et al.* Rapid cytoskeleton remodelling in dendritic cells following invasion by *Toxoplasma gondii* coincides with the onset of a hypermigratory phenotype. **Cellular Microbiology**, v.10, n.4, p. 1735-1752, 2013.

WINZLER *et al.* Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. **Journal Experimental Medicine**, v. 185, n.2, p. 317-328, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniases. **World Health Organization technical report series**, n. 38, p. 557-558, 2010.

WU, YI. *et al.* A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. **Nature**, v. 461, n.6, p.104-108, 2009.

YANO, H. *et al.* Roles played by a subset of integrins. **Journal Cell Biology**, v. 166, n.3, p. 283-295, 2004.

ZEGERS AND PETER FRIEDL. Rho GTPases in collective cell migration. **Landes Biosciences**, v.5, n.4, p. 28-97, 2014.